

**ATOPIK DERMATİT HÜCRE KÜLTÜR MODELİNDE SERT SUYUN
KALLIKREİN İLİŞKİLİ PEPTİDAZLAR VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF HARD WATER ON KALLIKREIN-
RELATED PEPTIDASES AND OXIDATIVE STRESS IN ATOPIC DERMATITIS
CELL CULTURE MODEL**

ALİ DORUK UZUNKAYA

PROF. DR. İBRAHİM ÇAĞATAY KARAASLAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

ÖZET

ATOPIK DERMATİT HÜCRE KÜLTÜR MODELİNDE SERT SUYUN KALLİKREİN İLİŞKİLİ PEPTİDAZLAR VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Ali Doruk UZUNKAYA

Yüksek Lisans Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

Eylül 2023, 113 Sayfa

Atopik dermatit (AD), çocuklarda daha sık görülmekle birlikte her yaştan insanı etkileyen en yaygın inflamatuvar deri hastalığıdır. Cilt kuruluğu, kaşıntı ve kızarıklıkla karakterize olan AD, deri bariyer fonksiyon bozukluğu ve immün sistemin aşırı aktivasyonu ile tanımlanmaktadır. AD patogenezinde sıklıkla tip-2 immün cevap mekanizması gözlenmektedir.

Hastalıkla ilişkili sigara ve hava kirliliği gibi etkenlerin yanı sıra, kireçli su ile karşılaşmanın da deri bariyer bütünlüğünü bozarak, AD şiddetinde etkili olduğu bulunmuştur. İçeriğindeki yüksek kalsiyum ve magnezyum iyonlarıyla, normal sulara göre daha alkalidir ($\text{pH} > 8.5$) ve derinin fizyolojik pH seviyesinin ($\text{pH}: 4.5-5.3$) arttırmaktadır. Derideki proteaz gruplarından olan kallikrein-iliskili peptidazlar (KLK) sağlıklı bir deride yaşanan derinin dökülmesinde rol oynarken yüksek pH seviyelerinde ise artan proteolitik aktiviteleri sonucunda derinin geçirgenliğinin artmasına ve alerjenlere karşı savunmasız kalmasına neden olmaktadır. pH değişikliğine bağlı aktivitesi artan KLK-5 ve -7'nin, deride epitel hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerden TLR-2 veya PAR-2 aracılığıyla inflamasyona neden oldukları bulunmuştur. Hücre dışına salınan KLK'ların, anti-mikrobiyal peptit olan LL-37'yi aktive ederken, inflamatuvar hücrelerde ise reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına neden olduğu bilinmektedir.

Tez çalışması kapsamında kireçli su ile gerçekleşen pH ve iyon değişiminin KLK-5 ve -7 ile LL-37 üzerindeki etkisi hem AD durumunda (AD(+)) hem de AD olmayan (AD(-)) durumdaki farklılaştırılmış keratinositlerde gen (gerçek zamanlı PZR) ve protein (ELISA) düzeyinde araştırılmıştır. Keratinositlerde, TLR-2 ve PAR-2 blokanları kullanılarak KLK'ların epitel hücrede hangi reseptör/reseptörler üzerinden etkili olduğu incelenmiştir. Yapılan keratinosit-eozinofil ko-kültür modeli ile kireçli su ile uyarılan epitel hücreden salınan KLK'ların ve LL-37'nin eozinofillerde ROT üretimindeki rolü gerçek-zamanlı PZR deneyi aracılığıyla araştırılmıştır. HaCaT hücrelerinin hem tek başına olduğu hem de Eol-1 hücre hattı ile ko-kültüre alındıktan sonra gerçekleştirilen uyarımlar sonucu HaCaT hücrelerinden üretilen KLK-5 seviyesi ELISA yöntemi ile KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri ise gerçek-zamanlı PZR deneyi ile tayin edilmiştir. Gerçekleştirilen ELISA ve gerçek-zamanlı PZR deneyleri sonucunda KLK-5 seviyesi 12 saat ve 24 saatlik uyarımlarda 180 ve 200 mg/L CaCO_3 ile özellikle AD(-) koşullarında artış gösterirken, bu artış C29 ve SsnB blokanlarının varlığıyla tersine çevrilmiş veya engellenmiştir. Bu sonuçların yanında, KLK-5 seviyesi AD(+) koşullarda değişkenlik göstermiş, bazı koşullarda CaCO_3 uyarımıyla azalırken C29 ve SsnB blokanlarının kullanıldığı her iki CaCO_3 konsantrasyonunda da artmış tespit edilmiştir. KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri ise 12 saatlik AD(-) uyarım koşulunda CaCO_3 ile azalmış, ancak C29 blokanı bu etkiyi tersine çevirerek gen ifadelerini önemli ölçüde artırmıştır. Buna karşılık, AD(+) koşulda, KLK-7 ifadesi 200 mg/L CaCO_3 ile yükselmiş, C29 ile düşmüş, ancak SsnB ile tekrar yükselmiştir. LL-37 ifadesi ise tüm koşullarda artış göstermiştir. 24 saatlik AD(-) deney düzeneğinde, KLK-7 ifadesi tüm koşullarda artış göstermiştir. LL-37 ifadesi de CaCO_3 ve C29 ile artmıştır. Bununla birlikte, AD(+) koşullarda KLK-7 ifadesi 200 mg/L CaCO_3 ile 32 katlık bir artış gösterirken bu artış ortama blokanların eklenmesiyle hafiflemiştir.

Eol-1 hücre hattından izole edilen RNA'lar ile yapılan ROS gen profillerinin incelendiği deneyde SOD1 ve ApoE gibi AD hastalığında biyobelirteç olarak da kullanılan genlerin ifadelerinde 180 mg/L CaCO_3 ile karşılaştırılması sonucu artış tespit edilirken, kalsiyum karbonatın etkisi TLR-2 reseptör blokanlarının varlığıyla tersine çevrilmiştir. Elde edilen bu sonuca rağmen SsnB blokanının varlığıyla geriye kalan oksidatif stres genlerinin ifadesi ile AD-modelden bağımsız olarak hem 12 hem de 24 saatlik uyarımlar sonucu yükselmiştir.

Gerçekleştirilen tüm deneyler sonucunda 2 farklı konsantrasyonda CaCO_3 ile uyarılan HaCaT hücre hattında AD durumundan bağımsız bir şekilde KLK-5, KLK-7 ve LL-37 hem gen (gerçek-zamanlı PZR) hem de protein (ELISA) seviyelerinde 12 ve 24 saatte belirli koşullarda artış gözlenmiştir. CaCO_3 uyarımlarının yanı sıra TLR-2 reseptör blokanı olarak kullanılan inhibitörlerin ortamda bulunmasıyla ilgili genlerin hem ifadesinde hem de protein düzeylerinde artış tespit edilmiştir. TLR-2 reseptör blokanlarıyla elde edilen bu sonuçlar CaCO_3 'ün HaCaT hücreleri üzerindeki etkisinin TLR-2 reseptörü yerine başka reseptör üzerinden gidebileceği ve kullanılan reseptör blokanlarının da HaCaT hücrelerinde farklı hücresel yolları etkileyerek KLK-5, KLK-7 ve LL-37'nin gen ve protein düzeyinde daha yüksek seyretmesine neden olabileceği gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Atopik dermatit, Eozinofil, Kallikrein-iliskili peptidaz (KLK), Keratinosit, Kireçli su, Toll-benzeri reseptörler

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF HARD WATER ON KALLIKREIN-RELATED PEPTIDASES AND OXIDATIVE STRESS IN ATOPIC DERMATITIS CELL CULTURE MODEL

Ali Doruk UZUNKAYA

Master of Science, Department of Molecular Biology

Supervisor: Prof.Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

September 2023, 113 Pages

Atopic dermatitis (AD) is the most common inflammatory skin disease affecting people of all ages, although it is more common in children. AD, which is characterized by skin dryness, itching and redness, is defined by skin barrier dysfunction and overactivation of the immune system. Type-2 immune response mechanism is frequently observed in the pathogenesis of AD.

In addition to factors such as smoking and air pollution associated with the disease, exposure to chalky water has been found to affect the severity of AD by disrupting the integrity of the skin barrier. With its high calcium and magnesium ions, it is more alkaline (pH>8.5) than normal water and increases the physiological pH level of the skin (pH:4.5-5.3). While kallikrein-related peptidases (KLK), one of the protease groups in the skin, play a role in the shedding of aging skin in a healthy skin, at high pH levels, as a result of their increased proteolytic activity, they increase the permeability of the skin and make it vulnerable to allergens. It has been found that KLK-5 and -7, whose activity increases due to pH change, cause inflammation through the receptors TLR-2 or PAR-2 located on the epithelial cell surface of the skin. It is known that KLKs released out of the cell activate the anti-microbial peptide LL-37 and cause an increase in reactive oxygen species (ROS) in inflammatory cells.

Within the scope of the thesis, the effects of pH and ion exchange with calcareous water on KLK-5, KLK-7 and LL-37 were investigated at gene (real-time PCR) and

protein (ELISA) levels in differentiated keratinocytes in both AD and non-AD states. In keratinocytes, TLR-2 and PAR-2 blockers were used to investigate which receptor KLKs are more effective on epithelial cells. With the keratinocyte-eosinophil co-culture model, the role of KLKs and LL-37 released from epithelial cells stimulated with lime water in ROS production in eosinophils was investigated.

Within the scope of the thesis, the effects of pH and ion exchange with lime water on KLK-5 and -7 and LL-37 were investigated at gene (real-time PCR) and protein (ELISA) levels in differentiated keratinocytes in both AD (AD(+)) and non-AD (AD(-)) states. In keratinocytes, TLR-2 and PAR-2 blockers were used to examine the receptor(s) through which KLKs act on epithelial cells. With the keratinocyte-eosinophil co-culture model, the role of KLKs and LL-37 released from the epithelial cell stimulated with lime water and the role of LL-37 in ROS production in eosinophils was investigated by real-time PCR assay. The level of KLK-5 produced from HaCaT cells as a result of stimulation of HaCaT cells both alone and after co-culturing with Eol-1 cell line was determined by ELISA method and KLK-7 and LL-37 gene expressions were determined by real-time PCR assay. As a result of ELISA and real-time PCR experiments, KLK-5 level increased in 12 h and 24 h stimulation with 180 and 200 mg/L CaCO_3 , especially in AD(-) conditions, and this increase was reversed or prevented by the presence of C29 and SsnB blockers. In addition to these results, KLK-5 levels were variable in AD(+) conditions, decreasing in some conditions with CaCO_3 stimulation, but increasing in both CaCO_3 concentrations with C29 and SsnB blockers. KLK-7 and LL-37 gene expressions were decreased by CaCO_3 in the 12 h AD(-) stimulation condition, but C29 blocker reversed this effect and significantly increased gene expressions. In contrast, in AD(+) condition, KLK-7 expression increased with 200 mg/L CaCO_3 , decreased with C29, but increased again with SsnB. LL-37 expression increased in all conditions. In the 24 h AD(-) experimental setup, KLK-7 expression increased in all conditions. LL-37 expression also increased with CaCO_3 and C29. However, in AD(+) conditions, KLK-7 expression increased 32-fold with 200 mg/L CaCO_3 and this increase was attenuated by the addition of blockers to the medium.

In the experiment in which ROS gene profiles were examined with RNAs isolated from Eol-1 cell line, the expression of genes such as SOD1 and ApoE, which are also used as biomarkers in AD disease, increased as a result of exposure to 180 mg/L

CaCO₃, while the effect of calcium carbonate was reversed by the presence of TLR-2 receptor blockers. Despite this result, the expression of the remaining oxidative stress genes was increased by the presence of SsnB blocker in both 12 and 24 hours of stimulation, independent of the AD-model.

As a result of all the experiments performed, an increase in both gene (real-time PCR) and protein (ELISA) levels of KLK-5, KLK-7 and LL-37 was observed in the HaCaT cell line stimulated with CaCO₃ at 2 different concentrations at 12 and 24 hours under certain conditions, independent of AD status. In addition to CaCO₃ stimulation, the presence of inhibitors used as TLR-2 receptor blockers in the environment increased both the expression and protein levels of the related genes. These results obtained with TLR-2 receptor blockers suggest that the effect of CaCO₃ on HaCaT cells may go through another receptor instead of the TLR-2 receptor, and the receptor blockers used may affect different cellular pathways in HaCaT cells and cause KLK-5, KLK-7 and LL-37 to be higher in gene and protein levels.

Keywords: Atopic Dermatitis, Eosinophil, Kallikrein-related peptidase (KLK), Keratinocyte, Hard Water, Toll-like receptor

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bilime ve araştırmaya teşvikiyle ufkumu genişleten, saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN'a,

Yüksek lisans hayatım boyunca bana destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ECRG laboratuvar ekibine,

Yüksek lisans hayatımda tanıştığım, her zaman her koşulda yanımda olan Muhammed Arif DEMİR'e, Cihan ÖZAY'a, Arif DUYAR'a, İlayda DURLUPINAR'a, Ulaş ÖZFUÇUCU'ya,

Bana arkadaştan da öte olan, beni zorlu süreçte her daim destekleyen ve yanımda olan Ece Ceren CEYLAN'a,

Hayatım boyunca aldığım kararlarda her zaman arkamda duran sevgili annem Şebnem UZUNKAYA'ya, babam İsmail Hakkı UZUNKAYA'ya ve ağabeyim Mehmet Belen UZUNKAYA'ya,

Tez çalışmamın tamamlanmasında FHD-2021-11965 proje koduyla maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Yüksek lisans eğitimim süresince '2210/A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı' kapsamında bursiyer olarak beni desteklediği için TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Atopik Dermatit	2
2.1.1. Atopik Dermatitin Dünyada ve Türkiye’de Görülme Sıklığı.....	2
2.1.2. Atopik Dermatitin Patogenezi	4
2.1.3. Atopik Yürüyüş	5
2.1.4. Atopik Dermatit ve İmmün Cevap	6
2.2. Atopik Dermatiti Etkileyen Faktörler	11
2.2.1. Genetik Etkenler	11
2.2.2. Çevresel Etkenler	12
2.3. Atopik Dermatit ve Deri Epitelinin İlişkisi	18
2.3.1. Deri Bariyeri ve Fonksiyonu	18
2.3.2. Deri Bariyeri ve Reseptörleri	21
2.3.3. Deri Bariyer Disfonksiyonu	25
2.4. Kallikrein-İlişkili Peptidazlar (KLK’lar)	28
2.4.1. KLK İnhibitörleri	30
2.4.2. KLK’ların Çalışma Prensibi.....	30
2.4.3. KLK ve AD İlişkisi	31
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	33
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	33
3.2. Hücre kültürü çalışmaları	34

3.2.1.	HaCaT ve Eol-1 hücre hatlarının kültürlenmesi	34
3.2.2.	Sert Su Uyarımına Bağlı Sitotoksikite Deneyleri	34
3.2.3.	Uygun Reseptör Blokanının Seçilmesi	35
3.2.4.	HaCaT Hücrelerinin Hava-Sıvı Arayüz (ALI) Yöntemi ile Farklılaştırılması ve AD Modelinin Oluşturulması	37
3.2.5.	HaCaT hücrelerinin Eol-1 hücreleri ile ko-kültür edilmesi, reseptör bloklamasının gerçekleştirilmesi ve sert su ile uyarılması	38
3.3.	Hücrelerde Gen İfadesinin İncelenmesi	38
3.3.1.	RNA İzolasyonu	38
3.3.2.	Komplementer DNA (cDNA) Eldesi	39
3.3.3.	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	40
3.3.4.	ROS Genlerinin İncelenmesi	41
3.4.	Hücrelerin Protein Seviyelerinin Ölçülmesi	43
3.4.1.	Enzim Bağlı İmmünoresorbent Deneyi (ELISA)	43
3.4.2.	İmmunofluoresan (IF) boyama	44
3.5.	İstatistiksel Analiz	45
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	46
4.1.	Sitotoksikite Deneyleri	46
4.1.1.	CaCO ₃ 'ün HaCaT Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	46
4.1.2.	CaCO ₃ 'ün Eol-1 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	48
4.1.3.	Reseptör Blokanlarının Sitotoksik Etkisi	50
4.2.	Deney Koşullarının Belirlenmesi	59
4.2.1.	Uygun Reseptör Blokanının Seçilmesi	59
4.2.2.	HaCaT hücrelerinin farklılaştırılması	63
4.2.3.	AD Modeli	67
4.2.4.	Uyarım Sisteminin Oluşturulması	68
4.3.	Sert Suyun KLK-5, KLK-7 ve LL-37 genleri/proteinleri üzerindeki etkilerinin gerçek-zamanlı PZR ve ELISA deneyleri ile incelenmesi	69
4.3.1.	Gerçek-zamanlı PZR Sonuçları	69
4.3.2.	ELISA Sonuçları	79
4.4.	Sert Suyun Eol-1 Hücre Hattı Üzerinde ROS Genlerine Etkisi	90
5.	YORUM	94

6.	KAYNAKLAR.....	101
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	113



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Atopik dermatitin küresel prevalansı. Her 100.000 kişide görülen AD vaka sayısı en düşük açık mor (0-1.750 kişi) ve en yoğun koyu mor (7.000 ve daha fazla kişi) renkte olacak şekilde derecelendirilerek hazırlanmıştır [3].	3
Şekil 2.2 Atopik yürüyüş [15].	5
Şekil 2.3 AD'nin akut ve kronik fazları [22].	8
Şekil 2.4 Derinin yapısı ile "tuğla ve harç" yapısı [74].	19
Şekil 2.5 Deri mikrobiyotası [96].	27
Şekil 2.6 KLK'ların normal derideki işlevi. KLK-5 ve KLK-7 korneodesmozomun yapısal proteinlerini parçalamaktadır. Bu iki proteazın aktivitesi LEKTI tarafından düzenlenmektedir [101]. DSG1: Desmogellin-1, DSC1: Desmokolun-1, CDSN: korneodesmozin, Korneositleri (turuncu kısım) birbirlerine bağlayan yapısal proteinler.	29
Şekil 2.7 KLK'ların aktivasyon kaskadı [99].	31
Şekil 3.1 Tez kapsamında kullanılan blokanların TLR-2 ve PAR-2 reseptörleri üzerinden bloklama yaptığı bölgelerin ve moleküllerin gösterimi.	36
Şekil 3.2 6 gün boyunca farklılaştırılan HaCaT hücreleri, 7.günde 24 saat boyunca AD modelinin oluşturulması için IL-4 ve TNF- α ile uyarılmıştır.	37
Şekil 3.3 <i>In vitro</i> ortamda oluşturulan olan ko-kültür modeli.	38
Şekil 4.1 HaCaT hücrelerinin artan CaCO ₃ konsantrasyonlarında 6 (A), 12 (B) ve 24 (C) saat uyarılmaları sonrasında elde edilen MTT sonucu; n=3, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.	46
Şekil 4.2 HaCaT hücrelerinin artan CaCO ₃ konsantrasyonlarında 6, 12 ve 24 saat uyarılmaları sonrasında elde edilen MTT sonucu; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001.	47
Şekil 4.3 Eol-1 eozinofil hücrelerinin artan CaCO ₃ konsantrasyonlarında 6 (A), 12 (B) ve 24 (C) saat uyarılmaları sonrasında elde edilen MTT sonucu; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.	48
Şekil 4.4 Eol-1 hücrelerinin artan CaCO ₃ konsantrasyonlarında 6, 12 ve 24 saat uyarılmaları sonrasında elde edilen MTT sonucu; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.	49
Şekil 4.5 Blokanın kullanılmadığı HaCaT hücrelerinin (A) 1 ve (B) 2 saatlik canlı (yeşil) / ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 μ m.	50
Şekil 4.6 C29 blokani ile (A) 50, (B) 100 ve (C) 150 μ M konsantrasyonda 1 saat boyunca bloke edilen HaCaT hücrelerinin canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 μ m.	51
Şekil 4.7 C29 blokani ile (A) 50, (B) 100 ve (C) 150 μ M konsantrasyonda 2 saat boyunca bloke edilen HaCaT hücrelerinin canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 μ m.	52

Şekil 4.8 1 saat boyunca 100 µM konsantrasyonda C29 ile bloklanan HaCaT hücrelerinin canlılık sonucu, n=3.....	53
Şekil 4.9 SAM-11 ile (A) 20 ve (B) 25 µg/mL konsantrasyonda 2 saat bloke edilen HaCaT hücrelerinin canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 µm.	54
Şekil 4.10 2 saat boyunca 20 µg/mL konsantrasyonda SAM11 ile bloklanan HaCaT hücrelerinin canlılık sonucu, n=3.	55
Şekil 4.11 Herhangi bir blokanın kullanılmadığı HaCaT hücrelerinin 24 saatlik canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 µm.	56
Şekil 4.12 SsnB ile (A) 50 ve (B) 100 µM konsantrasyonda 24 saat bloke edilen HaCaT hücrelerinin canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 µm.	56
Şekil 4.13 24 saat boyunca 50 µM konsantrasyonda SsnB ile bloklanan HaCaT hücrelerinin canlılık sonucu, n=3.	57
Şekil 4.14 MyD88 ile (A) 50 ve (B) 100 µM konsantrasyonda 24 saat bloke edilen HaCaT hücrelerinin canlı(yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 µm.	58
Şekil 4.15 24 saat boyunca 50 µM konsantrasyonda MyD88 inhibitör peptit ile bloklanan HaCaT hücrelerinin canlılık sonucu, n=3.	59
Şekil 4.16 5 ve 10 µg/mL LPS ile 24 saat boyunca uyarılan HaCaT hücrelerinin IL-6 seviyesi; n=3; LPS: Lipopolisakkarit, US: Uyarılmamış; ****p<0,0001.....	60
Şekil 4.17 Belirlenen konsantrasyonlarda HaCaT hücrelerinin hem blokan hem de LPS ile uyarımı sonucunda elde edilen IL-6 profilleri; n=3; LPS: Lipopolisakkarit, US: Uyarılmamış; *p>0,5, **p<0,01,****p<0,0001.....	61
Şekil 4.18: HaCaT hücre hattının SLIGLR PAR-2 aktivatör peptit ve SAM11 blokanı ile PAR-2 reseptörünün bloklanması sonucunda elde edilen IL-6 seviyeleri; n=2, US: Uyarılmamış, *p<0,05,****p<0,0001.....	62
Şekil 4.19 Düşük kalsiyum içeren DMEM ile hem apikal hem de bazal kısımdan beslenen HaCaT'ların K1 protein ifadesinin hücre boyama fotoğrafları, 20 X, bar 123 µm.	64
Şekil 4.20 Düşük kalsiyum içeren DMEM ile apikal kısımdan beslenen HaCaT'ların K1 protein ifadesinin hücre boyama fotoğrafları, 20 X, bar 123 µm.	65
Şekil 4.21 Yüksek kalsiyum içeren DMEM ile apikal kısımdan beslenen HaCaT'ların K1 protein ifadesinin hücre boyama fotoğrafları, 20 X, bar 123 µm.	65
Şekil 4.22 Farklı koşullarda ekilen HaCaT hücrelerinin IF boyama sonucunda elde edilen K1 protein ifadeleri, n=4, ****p<0,0001.	66
Şekil 4.23 AD-benzeri model oluşturulan HaCaT hücrelerinin gerçek zamanlı PZR deneyi sonucunda elde edilen FLG gen ifadesi, n=3, *p<0,05.	67
Şekil 4.24 12 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO ₃ ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5, KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.....	69

Şekil 4.25 12 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-7 ve LL-37 gen profilleri; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05.....	70
Şekil 4.26 24 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5, ve LL-37 gen profilleri; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.....	71
Şekil 4.27 Mono-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde 12 saatlik IL-4 ve TNF- α ile uyarımı sonucunda değişen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01.	73
Şekil 4.28 Mono-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde 24 saatlik IL-4 ve TNF- α ile uyarımı sonucunda değişen LL-37 gen ifadesi; n=3, US: Uyarılmamış.....	74
Şekil 4.29 12 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, ****p<0,0001.....	75
Şekil 4.30 12 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.....	76
Şekil 4.31 24 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.....	77
Şekil 4.32 24 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen LL-37 gen ifadeleri n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, ****p<0,0001.....	78
Şekil 4.33 Eol-1 ile ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde 12 saatlik IL-4 ve TNF- α ile uyarımı sonucunda değişen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, ***p<0,001.	80
Şekil 4.34 Eol-1 ile ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde 24 saatlik IL-4 ve TNF- α ile uyarımı sonucunda değişen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, ***p<0,001.	80
Şekil 4.35 12 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, * ****p<0,0001.	82
Şekil 4.36 12 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.....	83
Şekil 4.37 24 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, *p<0,05, ****p<0,0001.....	84

Şekil 4.38 24 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.....	85
Şekil 4.39 12 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.....	86
Şekil 4.40 12 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.....	87
Şekil 4.41 24 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.....	88
Şekil 4.42 12 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, *p<0,05, ****p<0,0001.....	89
Şekil 4.43 AD-model kurulmadan, 12 saat boyunca ko-kültür sisteminde uyarılan eol-1 hücre hattında değişen oksidatif stres genleri, n=3, US=Uyarılmamış, *p<0,05, ****p<0,0001.	91
Şekil 4.44 AD-model kurularak, 12 saat boyunca ko-kültür sisteminde uyarılan eol-1 hücre hattında değişen oksidatif stres genleri, n=3, US=Uyarılmamış, ****p<0,0001.	92
Şekil 4.45 AD-model kurulmadan, 24 saat boyunca ko-kültür sisteminde uyarılan eol-1 hücre hattında değişen oksidatif stres genleri, n=3, US=Uyarılmamış, ****p<0,0001.	93
Şekil 4.46 AD-model kurularak, 24 saat boyunca ko-kültür sisteminde uyarılan eol-1 hücre hattında değişen oksidatif stres genleri, n=3, US=Uyarılmamış, ****p<0,0001.	93

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Tez çalışması kapsamında kullanılan genlerin ileri ve geri primer dizileri.....	40
Çizelge 3.2 Gerçek zamanlı PZR reaksiyon ve döngü koşulları; *: Aşama, 35 döngüde tamamlanmıştır.	41
Çizelge 3.3 Tez çalışması kapsamında Eol-1 hücrelerinden salınan ROS'ların tespiti için kullanılan gen profili.....	42
Çizelge 4.1 Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen doz süre belirleme deneyleri sonucunda kararlaştırılan deney düzeneği.	68
Çizelge 4.2 Gerçek-zamanlı PZR deneyleri sonucunda HaCaT hücrelerinde değişen gen profilleri.	73
Çizelge 4.3 Gerçek-zamanlı PZR deneyleri sonucunda ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde değişen gen profilleri.....	79
Çizelge 4.4 ELISA deneyleri sonucunda HaCaT hücrelerinde değişen protein seviyeleri.	86
Çizelge 4.5 ELISA deneyleri sonucunda ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde değişen protein seviyeleri.....	90

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

mg/L	Miligram/Litre
mM	Milimolar
ng/mL	Nanogram/Mililitre
β	Beta
Rpm	1 dakika içerisinde gerçekleştirilen devir sayısı
°C	Derece santigrat
μ L	Mikrolitre

Kısaltmalar

AD	Atopik Dermatit
FLG	Filaggrin
Ig	İmmunoglobulin
IL	İnterlökin
AA	Alejik Astım
AR	Alejik Rinit
SC	Stratum Korneum
TSLP	Timik Stromal Lenfopoietin
TNF-a	Tümör Nekroz Faktör-Alfa
ECP	Eozinofil Katyonik Protein
EDN	Eozinofil-türevli Nörotoksin
MBP	Majör Temel Protein
AMP	Anti-mikrobiyal Peptit
UV	Ultra-viyole
ROS	Reaktif oksijen türleri

NMF	Doğal Nemlendirici Faktör
TEWL	Trans-epidermal Su Kaybı
KLK	Kallikrein-ilışkili Peptidaz
TJ	Sıkı Bağlantı
TLR	Toll-benzeri Reseptör
PRR	Örüntü Tanıma Reseptörü
PAR	Proteazla Aktive Reseptör
SsnB	Sparstolonin B



1. GİRİŞ

Atopik dermatit (AD) dünya üzerinde başta çocuklarda olmak üzere her yaştan insanda görülebilen en yaygın bulaşıcı olmayan inflamatuvar bir deri hastalığıdır. Hastalık deride kuruluk ve kaşıntı ile karakterize edilmiştir. Deri bariyer bütünlüğünün kaybolması ve immün sistemin aşırı tepki vermesi hastalığın ortaya çıkmasında etken olan başlıca iki faktördür. AD akut fazında Th2 baskın bir immün yanıt görülürken, kronik fazda immün yanıt Th1 ve Th17 hücrelerince baskın bir immün yanıt ile tanımlanmaktadır.

AD oldukça kompleks bir hastalık olup, hastalığın ortaya çıkmasında hem genetik altyapı hem de çevresel etkenler rol oynamaktadır. Genetik etkenler içerisinde AD ile ilişkilendirilen en önemli etken filaggrin (FLG) geninde meydana gelen mutasyonlardır. Çevresel etkenler içerisinde tütün dumanı, iklim değişikliği, havada bulunan kirleticiler ve sert sular dahil olmak üzere birçok faktör bulunmaktadır ve bu etkenler AD patogenezinine doğrudan veya dolaylı olarak katkı sağlamaktadır.

Sert su yüksek konsantrasyonlarda mineraller, özellikle CaCO_3 ve MgCO_3 , içeren su olarak tanımlanmaktadır. Suyun sertlik derecesi içerdiği CaCO_3 konsantrasyonuna göre hesaplanırken, suyun içeriğinde 121-180 mg/L konsantrasyonda CaCO_3 'ün bulunması sert su olarak ifade edilirken 180 mg/L'den daha yüksek konsantrasyonda kalsiyumun bulunması çok sert su olarak tanımlanmaktadır.

Sert su olarak tanımlanan suya ve bunun yanında özellikle COVID-19 pandemisi sonrası artan dezenfektan, sabun ve deterjanlar gibi hijyen malzemelerinin kullanımı sağlıklı derinin fizyolojik pH'sını (4.5-5.3) bozarak deri bariyer bütünlüğünü zayıflatmaktadır. Sert su kullanımı da içeriğinde barındırdığı bazik iyonlar ile derinin pH seviyesini 7-9 arasına yükseltmektedir yani derinin daha alkali pH'ya sahip olmasına sebebiyet vermektedir.

Deride bulunan proteaz grupları arasında yer alan kallikrein-ilişkili peptidazlar (KLK'lar) sahip oldukları enzimatik aktivite ile derinin su dengesinin korunmasında, derinin nemlendirilmesinde ve deri bariyer bütünlüğünün korunmasında görev almaktadırlar. KLK'lar sağlıklı bir deride aktivitelerini oldukça düşük düzeylerde gösterirken, deri pH'sının değişmesiyle aktiviteleri artar ve AD patogenezinine katkıda bulunurlar.

Sert su ve AD arasındaki ilişkileri gösteren çalışmalar hasta çocuklardan alınan örnekler ile gösterilmiş olsa da moleküler düzeyde bu ilişkiyi açıklayan bir çalışma yürütülmemiştir ve önerilen tez kapsamında bu ilişkinin gösterilmesi planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

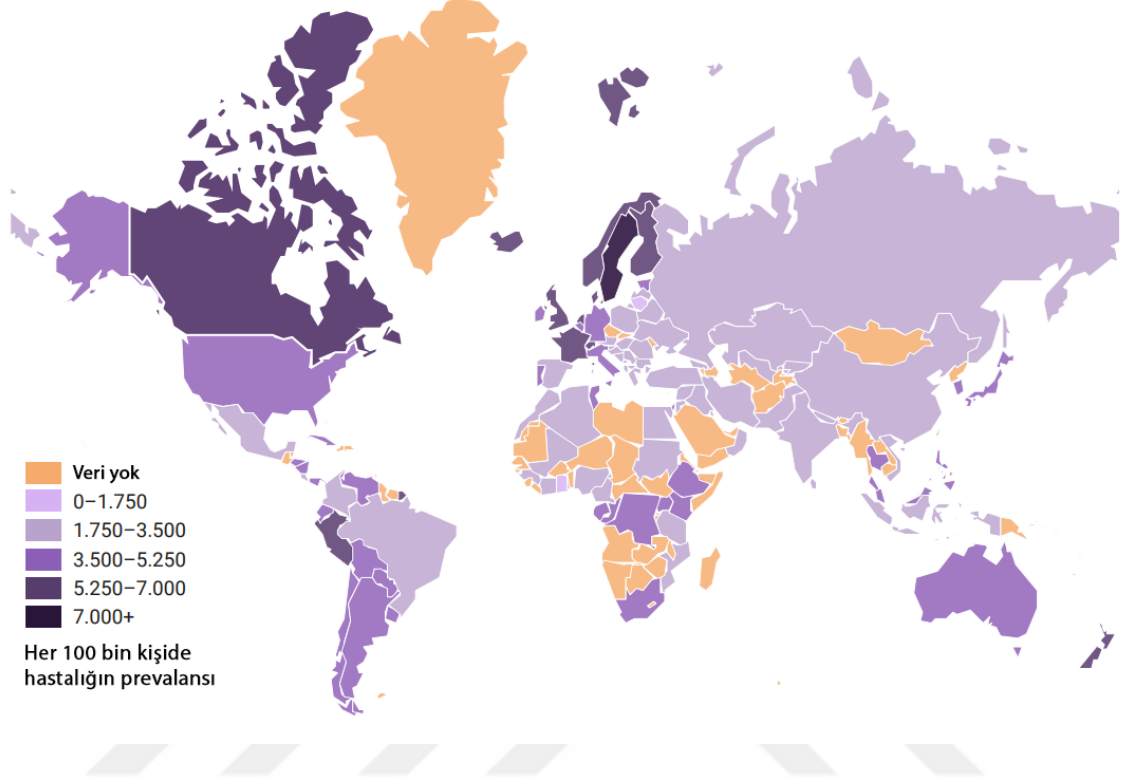
2.1. Atopik Dermatit

Atopik dermatit (AD), tekrarlayan ekzematöz lezyonlar, yoğun kaşıntı ve rahatsızlık ile karakterize, hastaların yaşam kalitesini etkileyen kronik inflamatuvar bir deri hastalığıdır [1]. AD semptomlarının ortaya çıkmasında birden çok faktör etkili olurken özellikle çocukluk çağında sıklıkla karşılaşılmaktadır. AD, deri bariyer bütünlüğünün bozulması ve immün sistemin verdiği düzensiz yanıt ile de tanımlanmaktadır. Hastalığa sahip bireylerin derilerinde erken evrelerde deride eksüdasyon, kabarma ve kabuklanma ile kötü tanımlanmış, eritemli (kırmızı) yamalar ve daha sonraki evrelerde pullanma, çatlama ve likenleşme (kalınlaşma) görülmektedir [2].

2.1.1. Atopik Dermatitin Dünyada ve Türkiye’de Görülme Sıklığı

Gelişmiş ülkelerde yaşam boyu prevalansı %15-20 olan AD, dünyada en sık görülen inflamatuvar deri hastalığıdır [2]. AD’nin görülme sıklığı ülkeden ülkeye göre değişkenlik göstermektedir ve dünya genelinde hastalığın en sık olduğu ülkeler sırasıyla İsveç, Birleşik Krallık, İzlanda ve Finlandiya olurken, hastalığın en az görüldüğü yerler Kazakistan, Özbekistan, Ermenistan ve Çin olarak tespit edilmiştir (Şekil 2.1) [3]. Hastalığın görülme sıklığı hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde son yıllarda düzenli olarak artış göstermektedir [4]. Bu durum en sık çocukluk döneminde gözlenmekte olup, vakaların %50-60’ı yaşamlarının ilk yılında, %90’ı ise 5 yaşına kadar bu hastalığın semptomlarını göstermeye başlamaktadır [4]. Çocukluk döneminde gelişen AD vakalarının yaklaşık %60’ı 7 yaşından sonra bu hastalıktan etkilenmezken, geriye kalan kesimde ise AD semptomları ilerleyen yaşlarda devam etmektedir. Çocukluk döneminde AD geçirmeyip erişkin dönemde bu hastalıktan etkilenenler ise AD hastalarının %1-3’ünü oluşturmaktadır. Çocukluk döneminden itibaren AD’ye sahip yetişkinlerin yanında 20-40 yaşlarında herhangi bir AD geçmişine sahip olmadan da hastalık semptomları ortaya çıkabilmektedir. Sonradan AD geliştiren yetişkinler tüm yetişkin AD’li bireylerin %15-20’sini oluşturmaktadır [5]. AD patogenezinde rol oynayan genetik faktörlerin belirli popülasyonlara özgü olabileceğini

düşündüren sonuçlar da bulunmaktadır. Örneğin, filaggrin (FLG) genindeki mutasyonların Avrupalılarda Asyalılardan daha yaygın olduğu bulunmuştur [6]. Bu durum, AD'nin genetik yapısının farklı etnik gruplar arasında değişken olabileceğini göstermektedir.



Şekil 2.1 Atopik dermatitin küresel prevalansı. Her 100.000 kişide görülen AD vaka sayısı en düşük açık mor (0-1.750 kişi) ve en yoğun koyu mor (7.000 ve daha fazla kişi) renkte olacak şekilde derecelendirilerek hazırlanmıştır [3].

Türkiye’de şehir bazında gerçekleştirilen AD vaka tespit çalışmaları bulunmaktadır. Ankara’da 2004-2006 yılları arasında 0-16 yaş aralığındaki 6.300 kişilik grubun hastane verileri kullanılarak yapılan çalışmada AD görülme sıklığının %11,8, Güneydoğu Anadolu bölgesinde çocukluk çağındaki (1-18 yaş) 1.377 hasta arasında ise bu oranın %4,3 olduğu tespit edilmiştir [7-9]. Eskişehir’de yürütülen bir çalışmada 1-99 yaş arasında hastaneye deri hastalıkları nedeniyle başvuran 11.040 kişilik grup içerisinde AD’li hasta oranı %2,2 çıkmıştır [8].

2.1.2. Atopik Dermatitin Patogenezi

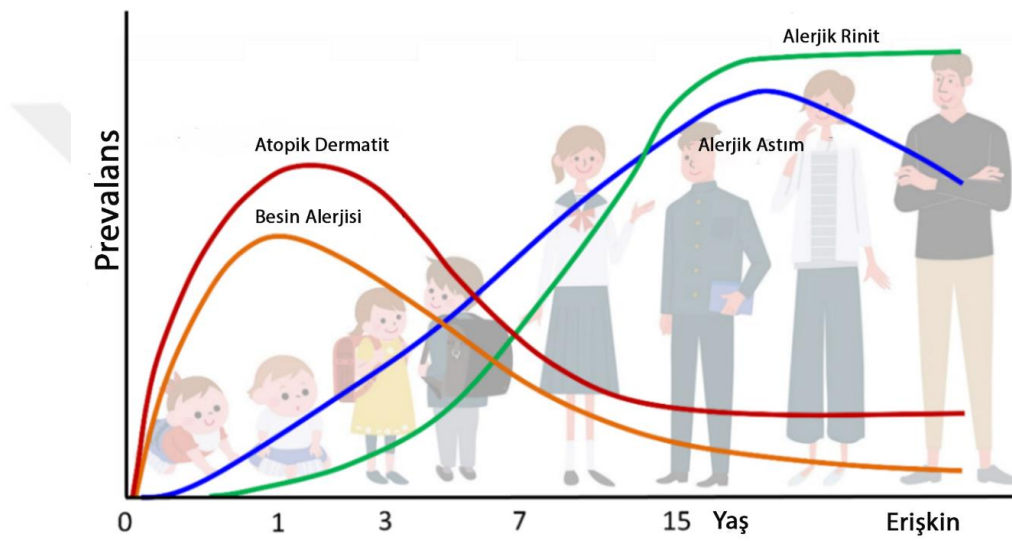
AD'nin patogenezi, genetik yatkınlık, çevresel etkenler, bağışıklık düzensizliği, deri bariyeri disfonksiyonu ve deri mikrobiyomunun disbiyozu arasındaki kompleks etkileşimleri içermektedir [10]. AD, Tip 1 aşırı duyarlılık yanıtı olarak da bilinen bir alerjik hastalık olarak tanımlanmaktadır.

Tip 1 aşırı duyarlılık yanıtı, çeşitli alerjenler tarafından tetiklenebilen çok yönlü bir bağışıklık tepkisidir. Bu alerjenler polen, ev tozu akarları, böcek zehiri, hayvan tüyleri gibi çeşitli kaynaklara sahip olabilmektedir. Bireyin herhangi bir alerjene karşı duyarlılaşması sonrasında aynı alerjen ile tekrar karşılaşması sonucunda güçlü bir yardımcı T hücre (Th)2 CD4+ T hücresi yanıtı meydana gelmektedir. Bu yanıt, Th2 hücreleri tarafından İnterlökin (IL)-4, IL-5 ve IL-13 gibi sitokinlerin üretilmesi ve yoğun immünoglobulin (Ig) E sentezi ile karakterizedir. Tip 1 aşırı duyarlılık yanıtları AD, astım, alerjik rinit gibi atopik hastalıklarının yanı sıra ürtiker, anafilaksi, besin ve ilaç alerjileri gibi rahatsızlıklara da sebebiyet vermektedir [11].

AD, gıda ve çevresel alerjenlere karşı IgE aracılı hassasiyete yol açan bir hastalık olmasının yanında yoğun lenfosit, monosit ve eozinofil infiltrasyonu ile karakterizedir ancak patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. AD patogenezinin dair öne sürülen hipotezlerden biri intrinsik yanıt olarak adlandırılmaktadır. Bu hipotezde epitel hücrelerindeki içsel bir kusurun bariyer disfonksiyonuna yol açtığı ve immünolojik yönlerin ise bu durumdan kaynaklı olarak ortaya çıkan ikincil bir tepki olarak kabul edildiği öne sürülmektedir [12]. Bir diğer hipotez olan ekstrinsik yanıtta ise AD hastalarında görülen semptomların IgE aracılı duyarlılığa neden olan immünolojik bir bozukluktan kaynaklı olduğu önerilmektedir. Bu hipotez kapsamında, epitelyal bariyer disfonksiyonu lokal inflamasyonun bir sonucu olarak kabul edilmektedir. Ekstrinsik AD'ye ve semptomlarına “atopik yürüyüş” durumunda sıklıkla karşılaşılmaktadır [13].

2.1.3. Atopik Yürüyüş

Atopik yürüyüş, alerjik hastalıkların AD'den ve besin alerjisinden, alerjik astıma (AA) ve/veya alerjik rinite (AR) doğru sıralı bir şekilde ilerlemesini tanımlamaktadır (Şekil 2.2). Epidemiyolojik kanıtlar, AD'nin atopik yürüyüşün ilk belirtisi olduğunu ve yaşamın erken yıllarında ortaya çıktığını göstermiştir. Bazı epidemiyoloji çalışmalarda ile çocukların %85'inin 5 yaşından önce bu rahatsızlığa sahip olduğu tespit edilmiştir [14].



Şekil 2.2 Atopik yürüyüş [15].

AA ve AR, atopik yürüyüşün son evreleridirler. AA, inflamasyon, aşırı duyarlılık ve hava yollarının yeniden şekillenmesi ile karakterize olan yaygın bir kronik hava yolu hastalığıdır. AR ise burun mukozasının inflamasyonunu içerir. Dharmage ve arkadaşları, 2 yaşından önce AD geçiren bebeklerin 6-7 yaşlarında AA ve AR geliştirme riskinin daha yüksek olduğunu bulmuştur [16]. Ayrıca, Tayland'da 2 yaşından önce AD tanısı konulan çocuklarda ilerleyen yaşlarda %61,8'ine AR ve %29,4'üne AA teşhisi konulmuştur [17]. Prospektif bir kohort çalışmasında ise özellikle orta-şiddetli, erken dönemde ortaya çıkan ve daimi AD hastası olan çocukların AA ve AR geliştirmeye daha meyilli olduğunu bildirilmiştir [18].

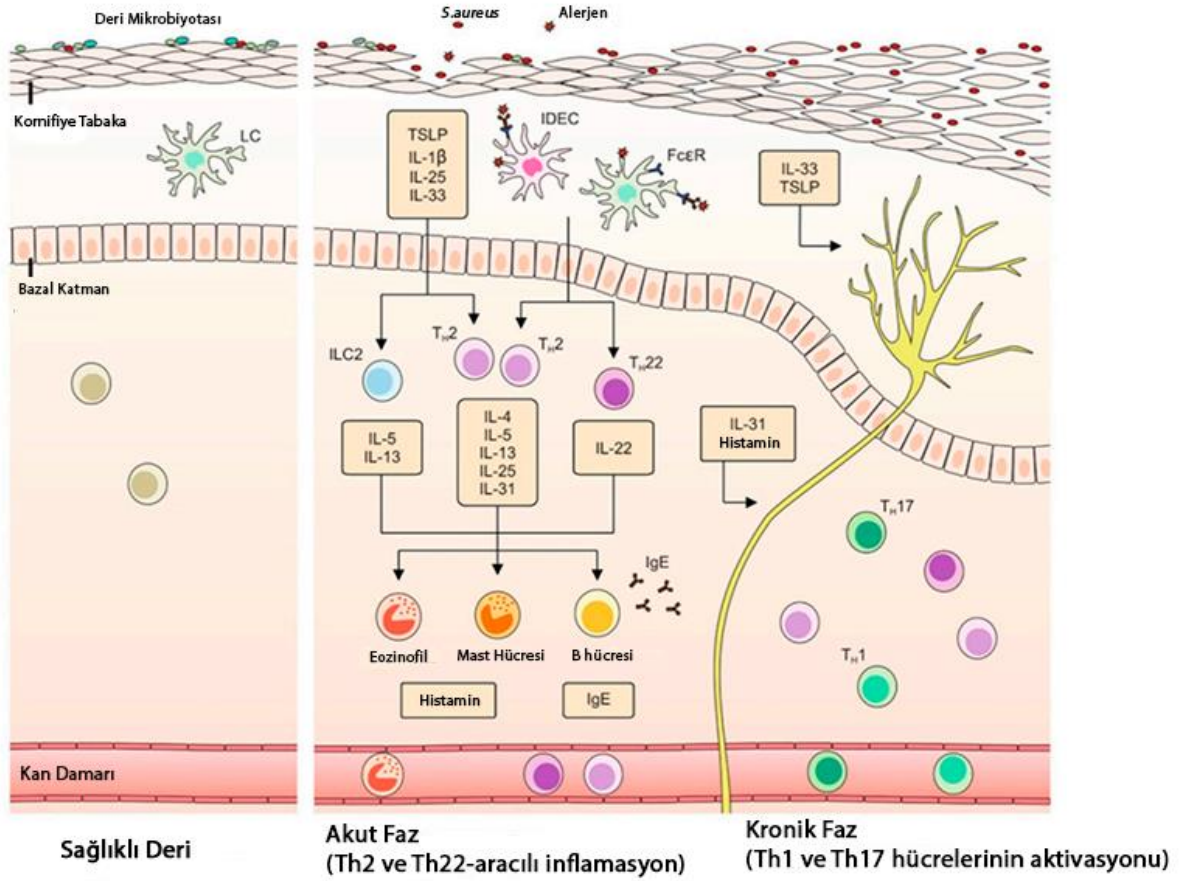
Atopik yürüyüşün altında yatan olası mekanizmalar arasında deri bariyerinin işlev bozukluğu, FLG geni ile timik stromal lenfopoietin (TSLP), IL-33 ve IL-25 gibi ‘alarmin’ adı verilen sitokin grubu yer almaktadır. Alerjenler vücuda hasarlı deri yoluyla girerek ilk olarak AD'ye, ardından AA ve AR'ye neden olabilir. Bir deri bariyer proteini olan FLG, kornifiye tabaka (stratum corneum, SC)’un yapısı ve bütünlüğünün korunması açısından önemli rollere sahiptir. FLG genindeki gerçekleşen mutasyonlar sonucunda deri bariyer bütünlüğü bozularak alerjik reaksiyonlar meydana gelebilir. Bununla beraber, FLG mutasyonları erken dönemde AD ile AD geçirmiş bireylerde AA riskini artırmaktadır [14]. Zhang ve arkadaşları, keratinositlerde TSLP aşırı ifadesinin hem intraperitoneal hem de intranazal olarak ovalbumin (OVA) duyarlılaştırmasına ve uyarımına maruz bırakılan farelerde AA benzeri hava yolu inflamasyonunun şiddetlendirdiğini bulmuşlardır [19].

Alarminlerin üretimi atopik yürüyüşün ilerlemesine katkı sağlamaktadırlar. Bu sitokinler Th2 bağışıklık tepkilerinin gelişimini indükleyerek ve bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonunu teşvik ederek deri, solunum yolları ve burun mukozasında lokal inflamasyona yol açarlar. Deri bariyerindeki işlev bozuklukları, alarminlerin üretimi ile birleştiğinde, atopik yürüyüşün ilerlemesini sağlayan bir döngü yaratmaktadır [20]. TSLP'nin farelerde AD benzeri deri iltihabı ve AA benzeri bronşiyal aşırı duyarlılık fenotiplerinin gelişiminde etkili olduğunu gösterilmiştir. IL-33’ün ise AD, AA ve AR’ye sahip hastaların derisinde, solunum yollarında ve özofagusunda ifadesinin arttığını tespit etmiştir. IL-25’in de AD, besin alerjisi ve AA gelişiminde rol oynadığı belirtilmiştir [14].

2.1.4. Atopik Dermatit ve İmmün Cevap

AD’nin ortaya çıkmasında en temel etkenler deri bariyer bütünlüğünün bozulması ve immün sistemin düzensiz bir cevap oluşturmasıdır, ancak hastalığın ortaya çıkmasında hangi etkenin baş rol oynadığı halen daha tam bilinmemektedir. AD’li bireylerin derilerinde var olan harabiyet nedeniyle sağlıklı bireylere kıyasla alerjenler, mikroorganizmalar ve çevrede bulunan çeşitli partiküller için daha rahat penetrasyon sağlayabilecekleri bir yapıya sahiptir. Bu nedenle deri içerisine giren her türlü etkene karşı AD’li bireyler daha hassastırlar. Hastalığın alevlenmesinde hem doğal hem de adaptif immün sistem rol oynamaktadır. Deri

harabiyeti sonrasında başta keratinositler olmak üzere deride bulunan diğer hücrelerden alarminlerin salınımı gerçekleşir ve bu sayede inflamasyonun gerçekleştiği bölgeye diğer immün hücreler çağrılır. Bu immün yanıtta en etkin rol oynayan CD4⁺ Th2 hücreleridir ve bu hücrelerin yanı sıra eozinofiller gibi kan dolaşımında bulunan ve mast hücreleri gibi deride yerleşik olarak yer alan diğer hücre tipleri de bu inflamatuvar yolakta etkin rol almaktadır. AD patogeneğinde rol oynayan diğer immün hücreleri arasında CD8⁺ T hücreleri, tip 2 doğuştan gelen lenfoid hücreler (ILC2'ler) ve Th22 hücreleri de bulunmaktadır ve bu hücreler AD'nin akut fazında daha etkilidir. Bu hücrelerin etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da doku hasarının erken algılanmasında ve adaptif immün yanıtlarının gelişmesinden önce inflamatuvar yolağın başlatılmasında rol oynaması muhtemel olduğu belirtilmiştir. Bir diğer T hücre tipleri olan Th1 ve Th17 hücreleri de AD kronik fazında yer almaktadırlar (Şekil 2.3) [21].



Şekil 2.3 AD'nin akut ve kronik fazları [22].

2.1.4.1. Th2 İmmün Cevabı

Tip-2 immün yanıt, AA ve AD gibi hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar. Bu yanıt, alerjene maruz kalınan bölgeye inflamatuvar hücrelerin toplanmasına neden olan ve bu immün yanıtta katkıda bulunan çeşitli bağışıklık hücreleri, sitokinler ve kemokinleri içeren karmaşık bir süreçtir [23].

Epitel hasarı, keratinositler tarafından pro-inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınması ve deride yerleşik Langerhans hücreleri ve dermal dendritik hücreler tarafından antijen sunumu dahil olmak üzere doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonuna yol açmaktadır [6]. Bu pro-inflamatuvar yanıt, T hücreleri, eozinofiller ve ILC2 gibi farklı inflamatuvar

hücre alt gruplarının hızlı göçüyle karakterize edilmektedir. Çeşitli hasta popülasyonlarının kullanıldığı transkriptom analizine dayanan bir çalışmada hastaların lezyonlu bölgelerinden alınan örneklerde IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokinlerinin üretimini sağlayan CD4⁺ Th2 hücrelerinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. AD'li hastalardan alınan lezyonsuz deri örneklerinde de artmış oranda Th2 hücresi tespit edilmiştir [11].

Alerjik duyarlılık, Th2 efektör hücrelerinin aracılık ettiği immün süreçlerin bir sonucudur. Alerjik duyarlılık, 2 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada bireyin herhangi bir alerjene maruz kalmasıyla bazofil ve mast hücrelerinin hassaslaşma evresi gerçekleşmektedir. İkinci aşamada ise aynı alerjen ile karşılaşılması sonucunda o alerjene özgü üretilen IgE antikorları, bazofil ve mast hücrelerinin yüzeyinde yer alan yüksek afiniteli IgE reseptörüne (FcεRI) bağlanmaktadır. Bağlanma ile mast hücreleri aktifleşir ve hücrelerden alerjik yanıtın kimyasal aracılarının salınımı gerçekleşir. Bu sayede alerjene karşı alerjik duyarlılık yanıtı başlatılmış olur. Salınan kimyasal araçılar arasında yer alan histamin, tip-2 yanıt sürecinde vazodilatasyon, vasküler geçirgenliğin artırılması ve düz kasın geçici olarak kasılması görevlerini yerine getirmektedir. Mast hücrelerinin aktifleşmesi, prostaglandinler ve lökotrienler dahil olmak üzere eikosanoidlerin hızlı sentezini ve salınımını uyarmaktadır. Mast hücreleri tarafından salınan son aracı grubu, eozinofiller ve nötrofiller dahil olmak üzere inflamatuvar hücreleri aktive eden ve onları alerjene maruz kalan bölgeye çeken IL-4, IL-5, IL-13 ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) gibi pro-inflamatuvar sitokinlerdir [23-25].

Eozinofiller, tip-2 immün yanıtta yer alan kilit inflamatuvar hücrelerden biri tanesidir. Eozinofillerin hem hava yollarına hem de deriye infiltrasyonu AA'nın ve AD'nin karakteristik bir özelliğidir. Eozinofiller IL-3, IL-5 ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörü (GM-CSF) varlığında kemik iliği öncüllerinden farklılaşmaktadır ve oksidatif strese neden olarak doku hasarını teşvik eden eozinofil katyonik protein (ECP), majör temel protein (MBP), eozinofil türevli nörotoksin (EDN) ve eozinofil peroksidaz gibi çeşitli sitotoksik katyonik proteinler salgılamaktadırlar. Eozinofiller, AD patogenezinde birçok şekilde katkıda bulunabilmektedir. Eozinofiller, lipid mediatörleri, kompleman faktörler, sitokinler ve kemokinler gibi fonksiyonel yanıtları tetikleyen ikincil sinyaller ile aktifleşir. Bu aktifleşme, eozinofillerde degranülasyon sürecini başlatarak AD patogenezinde etkili olan ECP, MBP

ve EDN moleküllerinin salınımı gerçekleşmektedir. MBP, negatif yüklü moleküllere bağlanma yeteneğine sahiptir ve lipid çift tabakasında ya porlar oluşturarak ya da membran yapısını bozarak derinin yeniden şekillenmesine neden olurken, EDN ile TLR2-MyD88 sinyal yolu aracılığıyla dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve aktivasyonunu indükleyerek Th2 yanıtını artırır. ECP ise RNaz ve nörotoksik aktivite göstererek deri bariyerinde hasara neden olarak AD patogenezinde rol oynamaktadır. Aynı zamanda eozinofiller IL-6, IL-31, kemokin ligandı 1 (CXCL1), CXCL8, CCL2, CCL18 ve CCL26 gibi pro-inflamatuvar sitokinleri ve kemokinleri salgılayarak AD'de bağışıklık yanıtını düzenleyebilir. Alerjik yanıt için ortama gelen eozinofiller, bütünlüğü bozulmuş deriden içeri giren bakteri, mantar ve virüslere karşı hücre dışı eozinofil tuzakları oluşturarak konak savunmasını da gerçekleştirebilmektedir [26-28]. Eozinofiller bağışıklık yanıtında koruyucu bir rol de oynamaktadır. Eozinofiller başka bir tip 2 efektör hücre olan makrofajın aktivasyonunu düzenleyebilmektedir ve böylece tip 2 yanıtlarının düzenleyicisi olarak da işlevini göstermektedir [26, 27, 29].

Dokuda eozinofil sayısının artışı AD'nin hem akut hem de kronik evrelerinde görülmektedir ve hastalık şiddeti ile korelasyon içerisindedir. Kanda eozinofil sayısındaki artış da AD'li hastaların çoğunda mevcuttur ve hastalığın şiddeti ile doğru orantı halindedir. Buna rağmen, eozinofil sayısındaki artışın AD tanısındaki önemi belirsizdir. Kanda eozinofillerin artışı başka herhangi bir alerjik sürece de bağlı olabileceğinden ve bazı AD hastaların kanlarında eozinofil artışı gözükmediğinden, kan eozinofil düzeyleri tanı amacıyla yaygın olarak kullanılmamaktadır [29].

2.1.4.2. Th1, Th17 ve Th22-Aracılı İmmün Cevap

Th2-aracılı immün yanıt AD'nin akut fazı ile bağlantılı olsa da AD çift fazlı bir inflamatuvar süreçten meydana gelmektedir ve kronik faz Th1-aracılı immün yanıtın daha baskın olduğu bir evre olarak kabul edilmektedir. Th1 hücreleri interferon (IFN)- γ , IL-12, IL-2, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β gibi sitokinleri üretmektedir. IL-2 ve TGF- β konsantrasyonunun AD'de azaldığı, IFN- γ , IL-12 ve GM-CSF gibi diğer Th1 sitokinlerinin ise kronik AD'de yükseldiği bulunmuştur. Ek olarak, Th1 kemokini olan CCL20'nin de

ifadesinde artış tespit edilmiştir [30]. Th1-aracılı immün yanıtın karakteristik bir sitokini olan IFN- γ , AD'li bireylerin akut fazdan kronik faza geçişinde, doku yenilenmesinde ve keratinositlerin apoptozunun indüklenmesinde görev almaktadır [31].

Bir diğer T hücre alt-grubu olan Th17 hücrelerinin AD hastalarda hem arttığını hem de azaldığını gösteren çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Bu durumun, özellikle Th17 tarafından üretilen IL-17'nin AD'nin kronik evresinde daha etkin rol almasından kaynaklandığı öne sürülmüştür. Th17 hücre sayısının AD'de IgE seviyesi ve eozinofil sayısı ile negatif bir korelasyon içerisinde olduğu da gösterilmiştir [22, 32, 33].

Th22 hücreleri IL-22 üretiminden sorumludur ve Th17 ve doğal öldürücü (NK) hücreleri tarafından da üretilmektedir. Akut AD'de yükselen IL-22 seviyesinin AD'nin şiddeti ile pozitif bir ilişki içerisinde olduğu gösterilmiştir. IL-22, AD'de gözlenen epidermal hiperplaziyi teşvik etmektedir. IL-22, IL-17 ile sinerjik bir etki göstererek epidermiste bulunan insan β -defensin (hBD)-2 ve hBD-3 gibi antimikrobiyal peptitleri (AMP'ler) düzenlediği gösterilmiştir. Ayrıca, IL-22 keratinositlerin farklılaşmasını engellemektedir. Bununla birlikte, IL-22'nin FLG gen ifadesini düşürdüğü, böylece deri bariyer disfonksiyonuna katkı sağladığı gösterilmiştir [22, 31].

2.2. Atopik Dermatiti Etkileyen Faktörler

2.2.1. Genetik Etkenler

Genetik faktörlerin AD gelişme riskinin yaklaşık %50'sini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (Genome Wide Association Studies, GWAS), AD için genetik risk lokuslarının belirlenmesinde etkili olmuştur. AD ile ilgili ilk GWAS çalışması Mayıs 2009'da Esparza-Gordillo ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır [34]. 939 vaka ve 975 kontrolden oluşan bir Alman kohortunun yanı sıra hatalıktan etkilenmiş iki kardeşe sahip 275 aile üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile FLG lokusunu AD'ye yatkınlık yaratan bir faktör olarak belirlemişlerdir.

AD'li hastalar üzerinden gerçekleştirilen farklı GWAS çalışmaları ile 34 risk lokusunu tanımlanmıştır. Tanımlanan bu lokuslar deri bariyeri işlevi, doğuştan gelen ve adaptif

immünite ve inflamatuvar yanıtlarda rol oynayan çeşitli genler ile ilişkilendirilmiştir. FLG'ye ek olarak, FLG-2 ve küçük prolince zengin proteinler (Small Proline-rich Proteins, SPRRs) gibi cilt bariyeriyle ilgili diğer genler de AD ile ilişkilendirilmiştir [35, 36]. FLG null mutasyonları özellikle erken başlangıçlı, şiddetli ve kalıcı bir AD seyrini etkilemektedir. FLG mutasyonları Avrupa, ABD ve Asya'daki AD hastalarında tanımlanmıştır. Bugüne kadar Avrupa ve Asya'da 40'tan fazla FLG fonksiyon kaybı mutasyonu bildirilmişken Kore'de FLG anlamsız mutasyonlarının (p.Y1767X, p.K4022X) AD ile ilişkili olduğu bulunmuştur [37]. Birçok çalışma FLG mutasyonu olan AD'lilerin alerjik duyarlılık, yüksek IgE seviyeleri ve gözlenmesi muhtemel olan astım ve/veya alerjik rinit riskini artırdığını göstermiştir. Bu nedenle, AD'li bireylerde astımın, öncelikle deri bariyer bütünlüğünün bozulmasıyla sonrasında duyarlılaşmaya neden olabileceği öne sürülmüştür. Bu hipotez, AD varlığından bağımsız olarak FLG mutasyonlarının kuru cilt ile ilişkisini gösteren yetişkinlerde yapılan yeni bir popülasyon temelli çalışma ile desteklenmektedir [38, 39].

2.2.2. Çevresel Etkenler

Genetik faktörler AD gelişiminde rol oynasa da düşük ve orta gelirli ülkelerde AD prevalansında son zamanlarda görülen dramatik artışın sadece genetik faktörlerin etkisiyle gerçekleşmediği görülmektedir. AD'nin ortaya çıkmasında iklim, tütün kullanımı, deri tahriş edicileri ve sert su gibi çevresel faktörler de görev almaktadır. Hastalığı önleyebilecek veya hafifletebilecek potansiyel olarak değiştirilebilir faktörleri belirlemek amacıyla, AD için çevresel risk faktörlerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır [40].

2.2.2.1. İklim

Sıcaklık, nem, yağış ve ultraviyole (UV) maruziyeti, belirli bir coğrafi konumdaki iklimi belirleyen temel faktörlerdir. Uzun vadeli iklim değişikliğinin potansiyel epidemiyolojik etkileri göz önüne alındığında, AD ve iklim faktörleri arasındaki ilişkiyi anlamak çok önemlidir. Sıcaklık ve AD prevalansı arasındaki ilişkiye dair çelişkili veriler mevcuttur. Sıcaklığın daha yüksek olduğu ABD eyaletlerinde daha düşük AD prevalansı bildirilmiş ve

artan hava sıcaklığının kaşıntının azalması ile ilişkili olduğu da bulunmuştur [41]. Ancak, yüksek sıcaklıkların AD üzerindeki koruyucu etkisinin altında yatan mekanizmalar bilinmemektedir. Sıcaklıkların bu etkisinin yanında AD'li çocuklarda yaygın olan ve AD üzerinde şiddetlendirici etkiye sahip olan terlemeye neden olan yüksek sıcaklıkların deri pH'ını daha asidik yaparak deri üzerinde tahriş edici bir etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir [40]. Bir diğer iklim etkeni olan nem yüksek olduğu bölgelerde deriden kaybedilen su miktarında her ne kadar düşüş sağlayarak derinin ekstra su kaybını engellese de kaşıntının artmasına neden olmaktadır. Düşük nem ise AD kaynaklı olarak bütünlüğünü kaybetmiş deride mast hücrelerinin degranülasyonunu indükleyerek ve epidermal hiperplaziye sebebiyet vererek hastalığın patogeneze katkı sağlamaktadır [42]. Yağış ile AD arasındaki ilişkiyi inceleyen 2 farklı çalışmada yağışın AD'ye katkı sağladığı belirtilmiştir [43, 44]. Yürütülen başka bir çalışmada yağışın AD üzerindeki etkisinin dolaylı olabileceği belirtilmiş ve bu etkinin düşük UV ve sıcaklık seviyeleri ile bağlantılı olabileceği vurgulanmıştır [40]. UV'nin AD üzerindeki etkisine dair çelişkili sonuçlar mevcuttur. Bazı çalışmalar UV'nin AD karşısında koruyucu etkiye sahip olduğunu belirtirken, bazı çalışmalar UV ışınına uzun süreli maruziyetin hastalığın kontrol edilememesiyle ilişkilendirilmiştir [43, 45]. UV ışını AD'li deriye birden fazla yolla koruma sağlayabilmektedir. UVB ışını aracılığıyla Vitamin D sentezini sağlayabilir, cis-Ürokanik asit sentezini gerçekleştirerek immün sistemin verdiği aşırı tepkiyi baskılayabilir ve UVA ile UVB aracılığıyla *S.aureus*'a karşı savunma sağlayabilmektedir [46, 47].

2.2.2.2. Deri Tahriş Edicileri

Sabun ve deterjan gibi çevresel faktörler epidermal bariyerin daha fazla bozulmasına neden olmaktadır ve AD'de intrinsik bariyer disfonksiyonunu daha da kötüleştirebilmektedir. Tahriş edici maddeler ve alerjenler immün sistemi ile etkileşime girerek ve inflamasyonu indüklemektedir. AD'li hastaların derilerinin sürfaktan kimyasallarından olan sodyum lauril sülfata (SLS) karşı hassas olduğu ve deride tahrişin arttığı gösterilmiştir [44]. Alman vaka kontrol çalışması ile, AD geçmişi veya yaygın FLG null varyantları olan hastaların iritan kontakt dermatit (Irritant Contact Dermatitis, ICD) riskinin önemli ölçüde daha yüksek

olduğu bulunmuştur [48]. Mócsai ve arkadaşları ise, FLG mutasyonları olan ve olmayan şiddetli AD hastalarını karşılaştırdıklarında, hafif AD ve/veya sağlıklı kontrollere kıyasla SLS kullanımının TEWL artışına, FLG ifadesinin düşüşüne ve serumdaki TSLP seviyesinin artışına neden olarak özellikle hastlaığı şiddetli geçiren bireylerin patogeneze katkı sağladığı tespit edilmiştir [49].

2.2.2.3. Tütün Dumanı

Sigara ve puro dahil olmak üzere tütün ürünlerini içmek, vücudun bağışıklığını düşürerek, deri bariyer işlevini bozarak ve oksidatif hasara neden olarak çeşitli hastalıkların patogeneze katkı sağlamaktadır. Tütün maruziyetinin AD ile ilişkili olup olmadığına dair çelişkili kanıtlar bulunmaktadır. AD ile aktif sigara kullanımı, tütün dumanına pasif maruziyet ve hamilelik sırasında annenin sigara içmesi arasındaki ilişkiyi belirlemek için, 39 ülkeden 680.176 hastayı içeren 86 çalışmanın sistematik bir meta-analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda, çocukluk çağı AD'sinin aktif sigara içimi ve pasif olarak sigara dumanına maruz kalma ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda hamilelik sırasında annenin tütün kullanımının da çocukta ortaya çıkabilecek AD ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir [40, 50].

2.2.2.4. Kirleticiler

Hava kirleticileri, insan sağlığı üzerinde zararlı etkileri olabilen partikül veya gaz halindeki zararlı hava kaynaklı maddelerdir. Deri, AD'yi şiddetlendirebilen bu kirleticilere doğrudan maruz kalmaya karşı oldukça hassastır. Azot dioksit (NO₂), azot trioksit (NO₃), sülfür dioksit (SO₂) ve karbon monoksit (CO) gibi birçok hava kirleticisi, iklim faktörleriyle örtüşen mevsimsel eğilimlere sahiptir. Hava kirleticileri iç ve/veya dış ortamlardan kaynaklanabilir ve SC'ye bağlanarak, epidermise nüfuz eder ve dermal kılcal damarlar yoluyla sistemik dolaşıma girerek deriyle etkileşime girebilmektedir [40]. Dış ortam hava kirleticileri orman yangınları, volkanlar ve toz fırtınaları gibi doğal sebeplerin yanı sıra motorlu taşıtlar, enerji santralleri ve biyokütle yakma gibi beşeri kaynaklardan da oluşmaktadır. SO₂, CO ve NO₂ gibi yanma ürünlerinin yanı sıra partikül madde (PM) de içerebilirler. 4.907 Fransız çocuk

üzerinde yapılan bir çalışmada, yaşam boyu ve 1 yıllık AD öyküsü ile NO_x, CO, NO₂, PM₁₀ ve benzen dahil olmak üzere başlıca kentsel kirleticiler arasında, esas olarak araç trafiğinden etkilendiğine dair ilişkiler bulunmuştur [51]. İç ortam hava kirliliği sobalardan, inşaat malzemelerinden, biyolojik kaynaklardan ve dış ortam hava kirliliğinde de bulunan yanma ürünlerinden kaynaklanmaktadır [52]. İsveçli çocuklarda yapılan bir vaka kontrol çalışmasında, AD'nin evdeki, özellikle de çocuğun yatak odasındaki daha düşük havalandırma ile ilişkili olduğu ve doza bağlı bir ilişki gözlemlendiği bulunmuştur [53]. Bariyer disfonksiyonuna neden olan FLG mutasyonlarına sahip çocukların kirlilik ve iklim gibi çevresel faktörlerden kaynaklanan harabiyete daha yatkın oldukları da tespit edilmiştir [52, 54].

2.2.2.5. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücrelerin akut veya kronik olarak antioksidan savunma kapasitesini aşan oksidanların oluşması olarak tanımlanmaktadır. Oksidanlar, normal metabolik faaliyetler sırasında üretilen serbest radikallerden, reaktif oksijen türlerinden (ROS) nitrojen oksijen türlerinden (NOS) ve reaktif metabolitlerden oluşmaktadır [55]. Biyolojik antioksidan savunma sistemleri, hücrelerde enzim-bağımlı (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler) ve enzim-bağımsız (vitamin A, C ve E, glutatyon, polifenoller ve ko-enzim Q10) sistemler dahil olmak üzere iki farklı sisteme ayrılmakta ve hücre içerisinde artan oksidan seviyesini bu sistemler aracılığıyla regüle etmektedirler. Ancak, hücrelerde artan ROS seviyesi zincirleme reaksiyonları başlatmakta ve dokuda hücre hasarı ile hücre ölümüne neden olmaktadır [55-57].

Vücudu dış etkenlerden koruyan deri, çevresel ve endojen pro-oksidan ajanlara yanıt olarak keratinositlerde sürekli olarak üretilen reaktif türler nedeniyle oksidatif stresin ana kaynağıdır. Fiziksel aktivite ve psikolojik stres de deri üzerinde oksidatif stres yaratabilmektedir. Metabolizma sırasında oluşan serbest radikaller normal deri fonksiyonunun ayrılmaz bir parçasıdır ve hücre içi mekanizmalar aracılığıyla etkilerinin azaltılabilmesiyle vücuda çok az zararda bulunurlar. Bununla birlikte, artan veya uzun süreli serbest radikallere maruz kalmak cildin antioksidan savunma mekanizmalarını alt edebilir

ve cilt kanseri, cilt yaşlanması ve AD dahil olmak üzere cilt bozukluklarının gelişimine katkıda bulunabilmektedir [56, 58].

AD'nin ortaya çıkmasında etkili olan çevresel faktörler içerisinde son yıllarda yapılan çalışmalar ile oksidatif stres de dahil edilmiştir. ROS hem immün yanıtının başlatılmasında önemli bir rol oynayan dendritik hücreleri aktive edebilir hem de pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α) üretimini indükleyebilmektedir. Sitokinlerin artışı deride NF- κ B yolağı üzerinden gerçekleşmektedir ve bunu sonucunda hem oksidan-antioksidan molekül dengesizliği ile hem de indüklenen ve apoptotik moleküllerden biri olan kaspaz-3 ile deri harabiyeti gözlenmiştir. Deri proteazlarından olan MMP'lerin üretiminin artması sonucunda ise ECM bileşenleri parçalanarak deri bariyer hasarı gözlenmektedir. Doku inflamasyonunda görev alan oksidatif stresin bu özellikleri nedeniyle AD patogenezinde rol oynamaktadır [55, 57].

ROS ile AD arasındaki ilişkiyi göstermek için yapılan çalışmalarda KLK-5'in PAR-2 reseptörün yolağı üzerinden keratinositlerden ROS üretimini arttırarak TSLP ifadesini arttırdığı ve böylece derinin daha da kaşınmasına yol açtığı tespit edilmiştir [59]. LL-37'nin daha önceki çalışmalarda inflamatuvar hücrelerde (nötrofil) ROS üretimini arttırdığı gösterilmiş ve bunun üzerine AD ile ilişkisini araştıran bir *in vitro* çalışmasında da LL-37'nin KLK-5 ile beraber keratinositlerde ROS üretimini arttırdığı bulunmuştur [60]. LL-37'nin bir diğer inflamatuvar hücre tipi olan eozinofiller için kemoatraktan olduğu da tespit edilmiştir [61]. LL-37'nin eozinofiller üzerindeki diğer önemli etkileri ise eozinofillerden sistein lökotrienlerin ve ECP'nin salınımı indükleyebilmesidir [62].

2.2.2.6. Sert Su

Sert su kullanımı, dünyanın birçok bölgesinde milyonlarca insanı etkileyen ve son yıllarda artan sabun, deterjan kullanımı ile başta deri kaynaklı olmak üzere birçok hastalığın ortaya çıkmasında etken olan çevresel bir sorundur [63]. Sert su, yüksek konsantrasyonlarda çözünmüş mineraller, özellikle de kalsiyum ve magnezyum iyonları içeren su olarak tanımlanmaktadır. Kalsiyum ve magnezyumun yanı sıra alüminyum, baryum, stronsiyum, demir, çinko ve manganez gibi diğer çözünmüş metaller de su sertliğine katkı vermektedir.

Bu iki veya çok değerlikli katyonlar sudaki anyonlarla bir araya gelerek kararlı tuzlar oluşturma eğilimindedir ve bu da su kullanıcıları için bir dizi soruna yol açmaktadır.

Sert su içerisindeki metalik iyonların kaynağı tortul kayalardır ve bu kayalar arasında kireçtaşı ve dolomit bulunmaktadır. Su, bu kayaların içerisinde süzülürken çözünmüş mineralleri alır ve sertleşir. Özellikle yeraltı suyu, mineral taşıyan kayalarla temas olasılığının daha yüksek olması nedeniyle yüzey suyundan daha fazla sertliğe sahip olma eğilimindedir. Su sertliği, sudaki kalsiyum ve magnezyum iyonlarının toplam konsantrasyonu olarak ifade edilmektedir ve eşdeğer CaCO_3 olarak mg/L birimlerinde ölçülür. Toplam sertlik ise kalsiyum ve magnezyumun neden olduğu hem geçici hem de kalıcı sertliği içerir ve buna göre su yumuşak, sert veya çok sert olarak sınıflandırılmaktadır. 180 mg/L'den daha yüksek CaCO_3 oranına sahip sular çok sert olarak tanımlanırken, yumuşak su 60 mg/L ve daha düşük CaCO_3 oranları ile tanımlanmaktadır. Kireçtaşı veya jips kayalarıyla temas halindeki yeraltı suları genellikle 200-300 mg/L seviyelerine ulaşabilir. Suyun sertlik derecesi ülkelere göre değişkenlik göstermektedir. İngiltere'de yapılan bir çalışma sırasında sert su derecesi 231-314 mg/L aralığı olarak belirlenmişken, Japonya'da , 76 mg/L ve üstü değerler sert su olarak kabul edilmiştir [64, 65].

Sudaki kalsiyum ve magnezyum oranı çeşitli sert su bağlantılı sağlık sorunlarına neden olan önemli bir faktördür. Sert su, başta AD, kalp rahatsızlıkları, kanser, diyabet ve Alzheimer gibi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır [63, 66]. Yüksek sert su konsantrasyonuna sahip bölgelerde AD prevalansının arttığı gösterilmiştir [64, 67, 68]. Sık deterjan kullanımı ve beraberinde sert suya maruz kalma sonucunda, deri yüzey pH'ında artış, doğal nemlendirici faktörlerinde (NMF) azalma, deri proteazların aktivitesinde artış ve epitel bariyerde zayıflama gözlenmiştir. Bu zayıflamış bariyer hem çevresel hem de gıda alerjenlerine karşı hassaslaşmayı kolaylaştırabilir. Son araştırmalar, sert suya maruz kalmanın SLS'nin deride daha fazla birikmesine neden olduğunu da göstermiştir. Biriken SLS, özellikle FLG mutasyonu taşıyıcılarında tahrişe ve TEWL artışına neden olabilir [50]. Özellikle COVID-19 sonrası sert su değerlerine sahip olan şebeke suyunun yanı sıra deri tahriş ediciler arasında olan sabun ve deterjan kullanımındaki artış, AD hastalarında deri harabiyetinin daha fazla görülmesine yol açmıştır. Sağlık çalışanları ile yapılan çalışmada hem dezenfektan hem de sabun kullanımının, el kuruluğu başta olmak üzere kızarıklık ve deri sertleşmesi gibi

semptomlarının arttığı gözlenmiştir. Hastalık geçmişi olmayan çalışanlarda da dezenfektan kullanımına bağlı olarak AD semptomları gözlenmiştir [69]. Danimarka’da 0-7 yaş aralığındaki çocuklar ile yürütülen bir çalışmada ise hastalık geçmişi olmayan çocuklarda el yıkama sıklığının artışına bağlı olarak egzama görülmüş olup, AD’li çocukların ise hastalığı daha ağır geçirdiği tespit edilmiştir [70]. Sert su kullanımının AD’ye sebebiyet verdiği net bir şekilde belgelenmiş olsa da yapılan çalışmalar sadece hasta verileri üzerinden gerçekleştirilmiş ve sert suyun AD patogenezinin moleküler düzeyde nasıl etkilendiğine dair bilgi eksikliği de bulunmaktadır. Derinin fizyolojik pH’sının artması sonucu aktivitelerinin arttığı bilinen KLC ailesinin sert su kullanımına bağlı olarak derideki aktivitelerine ait bir literatür eksikliği bulunmaktadır.

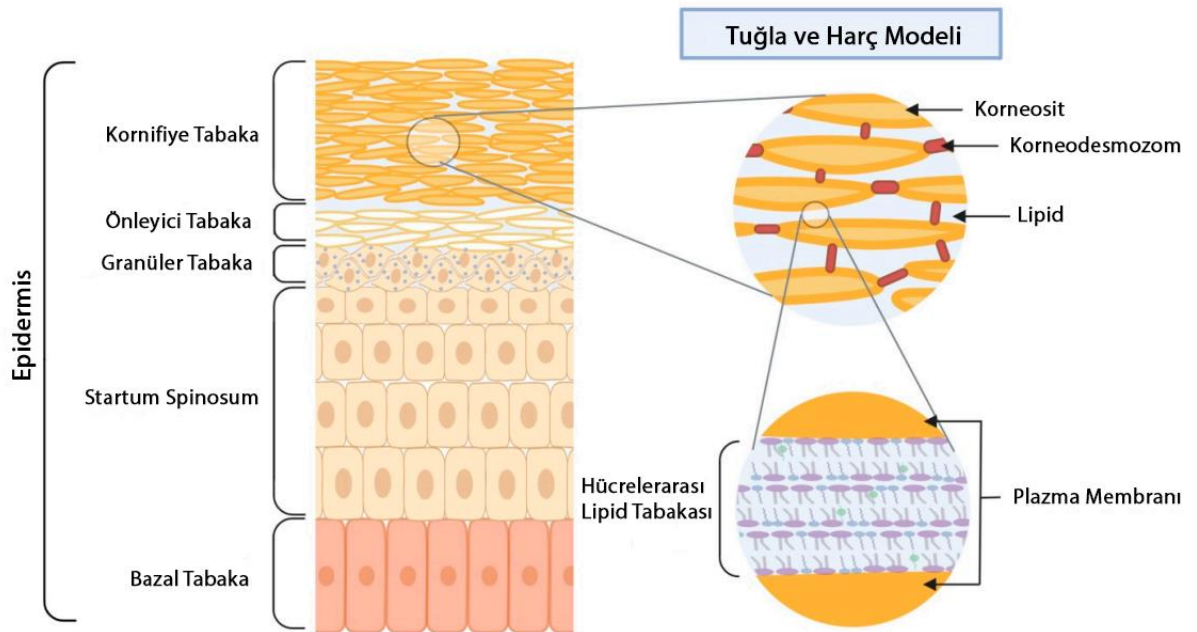
2.3. Atopik Dermatit ve Deri Epitelinin İlişkisi

2.3.1. Deri Bariyeri ve Fonksiyonu

Deri, vücudun homeostazının korunmasında ve çevresel faktörlerden korunmasında çok önemli bir rol oynayan karmaşık bir organdır. Birçok temel fizyolojik işlevi yerine getirme kabiliyetine sahip olan deri, insan vücudundaki en büyük ve en kritik organlardan biridir ve vücut ağırlığının yaklaşık %16’sını oluşturmaktadır [71].

Derinin başlıca işlevleri arasında fiziksel, kimyasal ve mikrobik saldırılardan korunma, termoregülasyon, duyu, su depolama ve D vitamini sentezi yer almaktadır [71]. Deri üç ana katmandan oluşur ve bunlar sırasıyla, epidermis, dermis ve deri altı yağ dokudur. Bu katmanların kalınlığı, vücuttaki konumuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Cildin en dış tabakası olan epidermis, koruyucu bir protein olan keratin üreten keratinositlerden oluşmaktadır [72]. Epidermisin altında bulunan dermis tabakası, esas olarak cilde güç ve esneklik sağlayan fibrillerin yapısal bir proteini olan kollajenden meydana gelmektedir. Derinin en alt tabakası olan deri altı yağ dokusu ise lipositler veya adipositleri içermektedir [73]. Keratinositlerin farklılaşması cildin bakımı ve yenilenmesi için gereklidir. Bazal tabakadaki keratinositler, epidermisin farklı katmanlarında yukarı doğru ilerledikçe bölünür ve farklılaşır. Derinin en üst tabakası olan SC’de tamamen farklılaşmışlar ve cildi çevresel faktörlerden ve su kaybından koruyan bir bariyer oluştururlar [72, 73].

SC, tahriş edici maddelerin ve alerjenlerin nüfuz etmesine karşı bir bariyer sağlayan cilt tabakasıdır. SC'nin birincil işlevi epidermal geçirgenlik bariyerini kontrol etmesidir ve cildin işlevselliğinin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır [74]. SC yapısı, hücreler arası lipidlere gömülü korneositlerden oluşur ve her bir korneositi çevreleyen korneosit zarfı adı verilen bir protein kabuğu ile bir "tuğla ve harç" yapısı oluşturmaktadır (Şekil 2.4). Seramidler, serbest yağ asitleri ve kolesterol içeren hücreler arası lipidler, fonksiyonel deri bariyer bütünlüğünün korunması açısından çok önemlidir [75]. Deride bulunan yağ grupları arasında en sık bulunan seramid miktarında azalma ve zincir uzunluğundaki kısalma AD'li bireylerin hem lezyonlu hem de lezyonsuz bölgelerinde gözlenmiştir [76].



Şekil 2.4 Derinin yapısı ile “tuğla ve harç” yapısı [74].

Filaggrin, cildin en dış tabakası olan SC'nin sağlığını korumak için gerekli olan temel bir proteindir. Bu protein, SC'ye güç sağlamaktan ve uygun hidrasyonu teşvik etmekten sorumludur. Bunu yapmak için, profilaggrin polimerleri önce daha küçük filaggrin monomerlerine ayrılmaktadır. Bu monomerler daha sonra SC'ye ek güç sağlamak için keratin ara filamentleri ile birleşir. Yapısal amacına hizmet ettikten sonra, filaggrin daha sonra SC'de uygun hidrasyon seviyelerini korumak için gerekli olan çeşitli NMF'ler üretmek için kullanılan amino asitlere ayrılır. Filaggrinin deri sağlığı üzerindeki koruma görevi

üzerine çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, FLG geninde mutasyonu olan bireylerin AD geliştirmeye daha yatkın olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında FLG'nin derinin hidrasyon seviyesinin korunmasında da önemli role sahip olduğu gösterilmiştir [77-79].

Sıkı bağlantılar (TJ), su ve solütlerin paraselüler taşınmasını düzenleyen ve deri bariyerinin ayrılmaz bir parçası olan hücreler arası yapışma yapılarıdır. TJ şeritleri, deri bariyeri işlevinin sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynayan klaudinler ve okludinler gibi transmembran proteinlerinden oluşur [75].

Deri mikrobiyomu, derinin yüzeyinde kolonize olan, vücudun immün sistemine katkıda bulunan ve diğer patojenik mikroorganizmalara karşı koruma sağlayan ve bakteriler, mantarlar, virüsler ve arkelerden oluşan karmaşık bir sistemdir. Derideki mikrobiyal toplulukların esas bileşimi cildin farklı bölgelerinin fizyolojisine bağlıdır. Bununla beraber nemli, kuru ve yağlı mikro ortamlarla ilişkili olan bakteri taksonlarının bolluğundaki değişiklikler de deri mikrobiyotası üzerinde etkilidir. Bu mikroorganizmalar deri sağlığının korunmasında rol oynarlar ve deride bulunabilmek için çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Örneğin, *Staphylococcus* spp. deride hayatta kalabilmek için terde yer alan üreyi, bir nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini geliştirmiştir. Kolonizasyonlarını daha da teşvik etmek amacıyla çeşitli *Staphylococcus* türleri deriye tutunmayı teşvik eden yapışma (adherens) moleküllerinin sentezini arttırabilmekte ve bunun yanında SC'den besinleri serbest bırakan proteazları da üretebilmektedirler [80]. Mikrobiyom dengesinin bozulması çeşitli patofizyolojik durumlara ve hastalıklara yol açabilen iltihaplanma veya enfeksiyonla sonuçlanmaktadır. Mikrobiyal dengesizlik genellikle insan vücudu için faydalı olan türleri azaltır ve disbiyozu neden olur. Deri mikrobiyotasının spesifik bileşimi büyük ölçüde deri bölgesinin karakteristik fizyolojisine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [81].

AMP'ler, insan derisindeki invaziv mikrobiyal enfeksiyonlara karşı savunmada önemli bir rol oynayan moleküllerdir. AMP'ler bakteriler, mayalar ve mantarlar dahil olmak üzere çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal ve anti-fungal aktiviteler sergilerler. İnsan derisinde, insan β -defensinleri (hBD) 1-3, katelisin (LL-37), ribonükleaz Rnaz-7 ve psoriasin (S100A7) dahil olmak üzere çeşitli AMP türleri tanımlanmıştır. Bu peptitler keratinositler,

ter bezleri ve kanallarında bulunan epitel hücreleri, nötrofiller ve mast hücreleri gibi farklı hücre tipleri tarafından üretilir. hBD-1 gibi bazı AMP'ler deride her daim üretilirken, LL-37 de dahil olmak üzere diğer AMP'lerin ifadeleri ise düşük seyir etmektedir. Ancak deri mikroorganizmalar, pro-inflamatuvar sitokinler, D vitamini ve UV ışını gibi uyaranlara maruz kaldığı zaman bu AMP'lerin ifadeleri yükseliş gösterir. Ayrıca epidermal farklılaşma, yara iyileşmesi ve doku hasarı durumlarında da derideki AMP'lerin ifadesi artmaktadır. AMP'lerin antimikrobiyal etki mekanizmaları çift yönlü olarak çalışmaktadır. Birinci mekanizma, AMP'ler ve negatif yüklü fosfolipid gruplar ile mikrobiyal membranların FFA'ları arasındaki etkileşime dayanmaktadır. İkinci mekanizma ise, deride bulunan patojenik mikroorganizmaları tespit edebilen ve keratinositlerden LL-37, hBD-2 ve hBD-3 gibi AMP'lerin salınımını tetikleyen toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) veya nod-benzeri reseptörler (NLR'ler) gibi özelleşmiş örüntü tanıma reseptörlerine dayanmaktadır. [82-84].

2.3.2. Deri Bariyeri ve Reseptörleri

Örüntü tanıma reseptörleri (PRR), başta keratinositler olmak üzere derideki farklı hücrelerin yüzeylerinde bulunmakta ve derinin patojen mikroorganizmalara karşı savunulmasında görev almaktadır. PRR'ler hem patojen ilişkili (PAMP'lar) hem de hücre hasarıyla ilişkili moleküler kalıpları (DAMP'ler) tanıyabilmektedirler. Doğuştan gelen immün sistem, AMP'lerin ve pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini sağlayan ve immün yanıtın başlatılması için gerekli olan PRR'lerin aktivasyonuna dayanmaktadır. Bu aktivite ile inflamasyonun gerçekleştiği bölgeye nötrofillerin, monositlerin, 21entritik hücrelerin, makrofajların ve T hücrelerinin göçü de başlatılmış olur. Memeliler birbirinden farklı ve oldukça iyi korunmuş PRR'lere sahiptirler. Bu PRR'ler içerisinde Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), RIG-I-benzeri reseptörler (RLR'ler), Nod-benzeri reseptörler (NLR'ler), Melanoma-eksik (AIM)2-benzeri reseptörler ve C-tip lektin reseptörleri bulunmaktadır.

2.3.2.1. Toll-Benzeri Reseptörler (TLR)

TLR'ler hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda en kapsamlı şekilde çalışılan doğal immün sistemin reseptörleridir. Bugüne kadar, insanlarda TLR1'den TLR13'e kadar 13 memeli TLR'si tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. TLR1, TLR2 ve TLR6 lipopeptitler, TLR4 lipopolisakkarit (LPS), TLR5 bakteriyel flagellin, TLR3 çift zincirli RNA (dsRNA), TLR7 ve TLR8 tek zincirli RNA (ssRNA) ve TLR9 patojen-DNA'sında yer alan metillenmemiş CpG motiflerini tanıma yeteneğine sahiptir.

TLR'ler üç birimden oluşan tip I transmembran proteinlerdir ve bu birimler sırasıyla bir hücre dışı alan (ektodomain), bir transmembran alan ve bir hücre içi kuyruk kısımlarından oluşur. Ektodomainler, bir ko-reseptör molekülü ile homo- veya heterodimer olarak spesifik PAMP'leri veya DAMP'leri tanıyan lösin bakımından zengin tekrarların (LRR) tandem kopyalarını içermektedirler. Hücre içi kuyruk biriminde yer alan Toll/IL1R alanı (TIR) TLR aktivasyonu sonrası sinyal iletimi için gerekli olan birimdir. PAMP veya DAMP TLR tarafından tanındıktan sonra, TIR alanı miyeloid farklılaşma birincil yanıt geni 88 (MyD88) veya IFN β 'yı indükleyen TIR alanı içeren adaptör (TRIF) gibi adaptör proteinlerinin toplanmasını sağlar. Bu proteinler sitokinlerin, kemokinlerin ve AMP'lerin ifadesini düzenlemek için NF κ B, Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz (MAPK)'lar veya TANK-bağlayıcı kinaz 1 (TBK1) sinyal kaskadlarını aktive eden sinyal yollarını başlatırlar. Bu da sonuç olarak tehlike sinyallerine karşı konak savunmasını sağlar.

TLR'ler keratinositler, Langerhans hücreleri, melanositler, Merkel hücreleri ve dermal fibroblastlar dahil olmak üzere çeşitli deri hücre tipleri tarafından hücreye özgü bir şekilde ifade edilmektedirler. Epidermiste keratinositler arasında bulunan DC'lerin bir alt kümesi olan Langerhans hücreleri (LC'ler), PAMP'leri, DAMP'leri veya antijenleri hızla algılayarak konak savunması için gerekli immün yanıtın oluşturulması amacıyla T hücrelerini aktive etmek üzere lenf düğümlerine göç ederek adaptif immün cevabın oluşturulmasını sağlarlar. Bununla birlikte, PRR'lerin aşırı aktivasyonu kontrolsüz bir inflamasyonun gerçekleşmesine yol açar. Bu kontrolsüz inflamasyon da ardından otoimmünite ve/veya AD, sedef hastalığı ve sistemik lupus eritematozus gibi inflamatuvar deri hastalıklarının gelişmesine yol açmaktadır.

TLR'ler, başta AD olmak üzere çeşitli deri hastalıklarının patogeneğinde rol oynamaktadırlar. TLR2'nin genetik polimorfizmlerinin AD ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir ve bunun yanında AD hastalarının kanlarındaki makrofajlarda TLR2 ifadesinin düştüğü de bulunmuştur. Sağlıklı keratinositlerde TLR2'nin aktivasyonu sonucunda, klaudin1 ve insan β -defensinler ve katelisin gibi AMP'lerin ifadelerini hız bir şekilde artış gösterirken, AD'li bireylerin lezyonlu derisinde hem klaudin-1 hem de AMP'lerin seviyeleri düşüş göstermektedir. TLR2 sinyalinin AD'nin akut fazı sırasında bozulmasının yanı sıra, TLR2'nin anormal aktivasyonu AD'nin kronik fazı sırasında inflamasyonun alevlenmesine ve devam etmesine yol açan Th1 immün yanıtının gelişimini de teşvik etmede rol oynamaktadır. Alerjenler ve mikroorganizmalar gibi çevresel faktörlere maruz kalma hem insanlarda hem de farelerde klinik AD fenotipinin ayırıcı özelliği olan TSLP ifadesinin artışı tetikleyebilmektedir [85]. AD'li hastaların derisinde artan *S. aureus* kolonizasyonunun TLR2 yanlış anlamalı (missense) mutasyon (R753Q) ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında, TLR2 transkripsiyonunu inhibe eden TLR2 promotör bölgesindeki tek nükleotid polimorfizminin (A-16934T), atopi öyküsü ile de ilişkilendirilmiştir [86].

Her ne kadar TLR'ler patojen ve hücre içi hasar durumunda esas olarak aktifleşerek etkinliklerini gösterebilirler de, bir başka inflamatuvar deri hastalığı olan gül (Rosacea) hastalığında dış ortamdan kaynaklı artan kalsiyum konsantrasyonunun özellikle TLR2'yi aktive ederek KLK-5 üretimini indüklediği ve deride gerçekleşen inflamasyona bu yolla da katkı sağladığı gösterilmiştir [87].

2.3.2.2. Proteazla Aktive Reseptörler (PAR)

Deri inflamasyonunun tetiklenmesinde etkili olan bir diğer reseptör grubu PAR grubudur. PAR'lar çevreden gelen proteaz özellikteki molekülleri tanıyarak proteazların etkilerine aracılık eder. PAR'ın proteaz aracılı aktivasyonu, epitel hücreleri, endotel hücreleri, inflamatuvar hücreler, keratinositler ve fibroblastlar tarafından IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salınması, IgE üretiminin artması, anjiyogenez, hücre göçünün artması, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve degranülasyonu, hava yolu düz kas

hücrelerinin proliferasyonu ve kasılması, goblet hücrelerinin aktivasyonu, proliferasyonu ve mukus üretiminin artması gibi çeşitli etkilere neden olur. Proteazların aktivitesi, epitelyal sıkı bağlantılar ve adezyon molekülleri üzerindeki etkileri nedeniyle özellikle alerjik hastalıklarla ilişkilidir. Proteazlar, okludin ve klaudin moleküllerini bozarak hücreler arasındaki sıkı bağlantı noktalarının zayıflamasına neden olmaktadır. Bu durum, aynı zamanda hücre içerisinde bulunan diğer proteaz grupları üzerinde uyarıcı etkisi olan matriks metalloproteaz (MMP)-9'u aktive ederek mukozal epitel bariyerinde hasara yol açabilmektedir. Bu aktivite, alerjenik moleküllerin proteaz ve bağışıklık uyarıcı etkilerini gösterebilecekleri dokulara nüfuz etmesini sağlar [88].

PAR'lar G-protein bağlı reseptör grubu ailesidir ve şu ana kadar PAR-1, -2, -3 ve -4 olmak üzere 4 üyesi tanımlanmıştır. Bu reseptörler arasında en çok çalışılan üye PAR-2 reseptörüdür. PAR-2'nin son zamanla yapılan çalışmalarda derideki serin proteazlardan gelen sinyaller aracılığıyla deri bariyer homeostazında rol oynadığı kanıtlanmıştır. PAR-2 serin proteazlar tarafından başlatılan sinyal yolağının birincil sensörü olarak görev almaktadır. Bariyer yapısının bozulması, SC'de pH'ının bazal seviyelerinden (5,0-5,5) daha nötr bir pH'a doğru artışına neden olarak, nötr pH'da optimal aktiviteye sahip olan serin proteaz aktivitesini artışına neden olur. Serin proteaz aktivitesindeki bu artış, SG'de keratinositlerin üzerinde yer alan PAR-2'yi aktive ederek lipid biyogenez (LB) sentezinin azalmasına ve lipid lamelinin yapısının bozulmasına yol açmaktadır. Bu sonuç, PAR-2 aktivitesinin bariyer bozulmasının ardından onarım sırasında LB sentezini düzenlemek için önemli bir sinyal olduğunu göstermektedir. Serin proteaz/PAR-2 sinyali lipid bariyerinin restorasyonunu inhibe ederek bariyer geçirgenliğini olumsuz yönde etkilemesine rağmen, bu sinyal yolağı korneositlerin sentezini indükleyerek kornifikasyon işlemini hızlandırmakta ve bariyer geçirgenliğini iyileştirmede pozitif bir düzenleyici olarak da hareket edebilmektedir. Proteolitik olarak aktif alerjenler olan ev tozu akarları ve hamamböcekleri de PAR-2'yi aktive etmektedir ve PAR-2 sinyali aracılı LB salgılanmasının inhibisyonunun bariyer iyileşmesini geciktirdiği gösterilmiştir. Alerjenler tarafından deri bariyerinin bozulmasından sonra kalsiyum iyonlarının anormal bir şekilde dağıldığını göstererek, derideki kalsiyum iyonlarının PAR-2 sinyal aracılı modülasyonunun, PAR-2 tarafından LB salgısının düzenlenmesinde rol oynayan mekanizmalardan biri olabileceğini öne sürülmüştür [89].

PAR-2, inflamasyondaki rolü nedeniyle AD patogenezinde rol oynamaktadır. AD'li hastaların lezyonlu bölgelerde artmış PAR-2 ifadesinin gözlemlenmesi, PAR-2'nin inflamatuvar dermatozda rol oynadığını göstermektedir. PAR-2'nin AD inflamasyonuna aracılık ettiği ve inflamatuvar mediatörlerin ifadesini arttırmada rol oynadığı gösterilmiştir. PAR-2'nin ayrıca Th2 aracılı alerjik enflamasyonda da rol oynadığı gösterilmiştir. Th2 ile ilişkili bir sitokin olan TSLP, alerjenlere, mikrobiyal enfeksiyonlara ve inflamasyona yanıt olarak Th2 hücre aktivasyonunu ve inflamasyonu indüklemektedir. PAR-2 deride bulunan serin-proteazlar tarafından aktive edilmesinin ardından nükleer faktör-κB (NF-κB) üretimi üzerinden TSLP ifadesini arttırmaktadır ve böylece AD patogenezinde katkı sağlamaktadır [89]. Ayrıca, gerçekleştirilen bir çalışmada alerjen ile karşılaşmasıyla deri bariyer bütünlüğünü bozarak deride kalsiyum iyon dengesinin de bozulmasına neden olmaktadır. Gerçekleşen bu kalsiyum iyon düzensizliğinin PAR-2 yolağı üzerinden LB salgısının azalması sonucu meydana geldiği yapılan bu çalışmayla tespit edilmiştir [90].

2.3.3. Deri Bariyer Disfonksiyonu

AD'nin temelinde, deri iltihabını doğrudan tetikleyebilen epidermal bariyer fonksiyonunun bozulması yatmaktadır. AD hastalarının hepsinde iç ve/veya dış etkenlerin neden olduğu epitel harabiyeti nedeniyle TEWL artışı gözlenmiş ve bu durum, deri bariyer işlevinde bozukluklara neden olmaktadır. AD'de deri bariyeri işlevinin tehlikeye girmesi deri enfeksiyonlarına, alerjen duyarlılığına ve sistemik alerjik yanıtlara karşı duyarlılığın artması ile sonuçlanmaktadır [91].

Deri bariyer işlevindeki bozukluk birden fazla faktör tarafından etkilenebilmektedir. AD hastalarının derisi kusurlu bir lipid matriksine sahiptir. AD cildinde SC'da yer alan hücreler arası lipid bileşimi, serbest yağ asitleri ve seramidlerin biyosentezinde rol oynayan enzimlerin değişen ifadeleri ile karakterize edilir. Araştırmacılar, SC hücreler arası lipidlerin değişen bileşiminin AD'de *S. aureus* kolonizasyon durumu ile ilişkili olduğunu göstermiştir [92]. Ayrıca, sentetik bir omega-hidroksiseraamid SC bütünlüğünü arttırdığı ve farklılaşma süreçlerini uyararak hasarlı deri bariyer fonksiyonunun iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir. AD hastalarında, özellikle filaggrin anormallikleri olanlarda, SC'de toplam

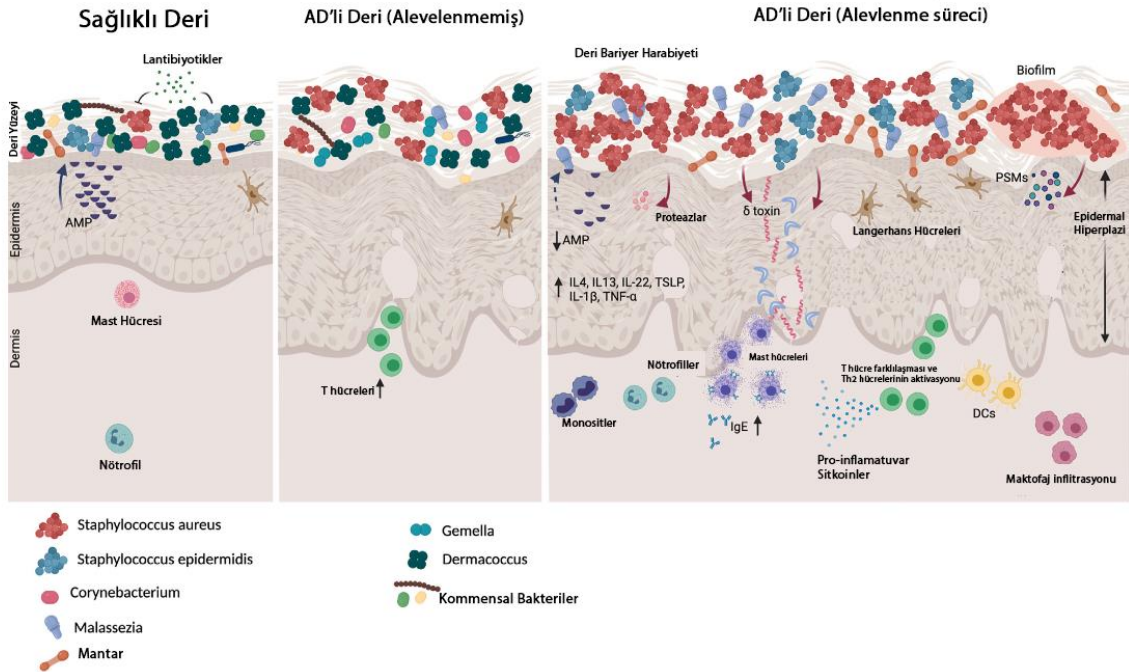
seramid ve bağılı seramid seviyelerinin azaldığı bulunmuştur. AD hastalarında seramid ve kolesterol oranının azalması bozulmuş SC bariyer fonksiyonuna neden olmaktadır. Ek olarak, AD hastalarının SC'sinde artmış pH ve yüksek serin proteinaz aktivitesi sonucunda, seramid sentezi için gerekli enzimler olan asit sfingomiyelinaz ve glukoserebrosidazın inaktivasyonu ve yapılarında bozulma gözlenmiştir [91].

Cildin keratinizasyon, nemlendirme ve AMP fonksiyonlarından sorumlu olan filaggrin eksiklikleri, özellikle erken başlangıçlı AD ve kalıcı AD hastalarında AD gelişimi ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. FLG eksikliği derideki korneositlerin şeklini değiştirerek, deri iltihabını artırır ve deri bariyer anormallğine neden olur. Ek olarak, filaggrin anormallikleri AD'li hastalarda TEWL ve kuru deri ile yakından ilişkilidir. AD cildinde FLG eksikliği ve aşırı eksprese edilen Th2 sitokinleri, AD'nin alevlenmesinde kritik rol oynadığı bilinen *S. aureus* enfeksiyonuna daha yüksek bir eğilimle ilişkilidir filaggrin eksikliği, perkütan mikrobiyal ve alerjen penetrasyonunun artması ve iritan ve haptenlere karşı inflamatuvar eşiklerin azalması ile ilişkilidir [6].

Bozulmuş sıkı bağlantılar da AD'deki anormal deri bariyeri işlevine bağlanmıştır. AD'li hastaların lezyonsuz bölgelerinde kladin-1 (CLDN1) ifadelerinde azalma ve bunun sonucunda sıkı bağlantı anormallikleri bildirilmiştir [93]. Sıkı bağlantıların bozulması AD'de anormal deri bariyeri işlevine katkıda bulunur ve bu da kritik ölümcül epidermal bariyer kusurlarına neden olmaktadır [94].

AD hastaları, mikrobiyal çeşitliliğin azalması ve fırsatçı patojen *S. aureus* prevalansının artması ile sağlıklı bireylere kıyasla farklı bir deri mikrobiyotasına sahiptir (Şekil 2.5). *S. aureus*'un varlığı epitelyal bariyerin bozulması, konakçı immün sisteminin tetiklenmesi ve deri iltihabının indüklenmesi ile ilişkilidir. AD hastalarında *S. aureus* prevalansı daha yüksektir ve Staphylococcus türleri genellikle tek bir *S. aureus* suşuna indirgenmiştir. Mikrobiyal çeşitliliğin azalması özellikle hastalığın şiddetli alevlenmeleri sırasında belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır [95]. *S. aureus*'a ek olarak, diğer bakteri türlerinin de AD ile ilişkili olduğu bulunmuştur. AD hastalarının deri mikrobiyomu Cutibacterium, Streptococcus, Acinetobacter, Corynebacterium ve Prevotella cinslerinde azalma ile de karakterizedir. Bir diğer Staphylococcus türü olan *S. epidermidis*'in aşırı çoğalması, AD'deki

inflamatuvar yanıtta katkıda bulunduğu ve böylece AD patogeneziyle de bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, şiddetli AD alevlenmeleriyle bağlantılı olarak tek suşlu *S. aureus* topluluğuyla ilişkili olduğu, daha az şiddetli semptom belirtileri olan hastalarda ise *S. epidermidis* suşlarının daha baskın olduğunu bulunmuştur. AD alevlenmeleriyle bağlantılı olarak Staphylococcus suşları dışında *S. aureus*'un sitolitik aktivitesini artırarak deride hasara neden olabilen ve böylece pro-inflamatuvar sitokinlerinin üretimini indükleyen *Cutibacterium acnes*'in de AD gelişimini teşvik ettiğini bildirmiştir. AD hastalarının deri mikrobiyomu bakterilerin yanı sıra daha düşük mantar toplulukları çeşitliliği ile de karakterize edilmektedir. Malassezia türlerinin, özellikle *M. globosa* ve *M. restricta*'nın, AD hastalarında baskın olduğu bulunmuştur. Bunlara ek olarak, *Candida albicans*, *Cryptococcus diffluens* ve *Cryptococcus liquefaciens* gibi mantarların da, AD'li hastalarda sağlıklı bireylere göre daha sık tespit edilmiştir [96].



Şekil 2.5 Deri mikrobiyotası [96].

AD durumunda AMP'lerin ifadeleri ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar birbiriyle çelişki göstermektedir. Bir çalışma AD durumunda LL-37 seviyesinde azalma

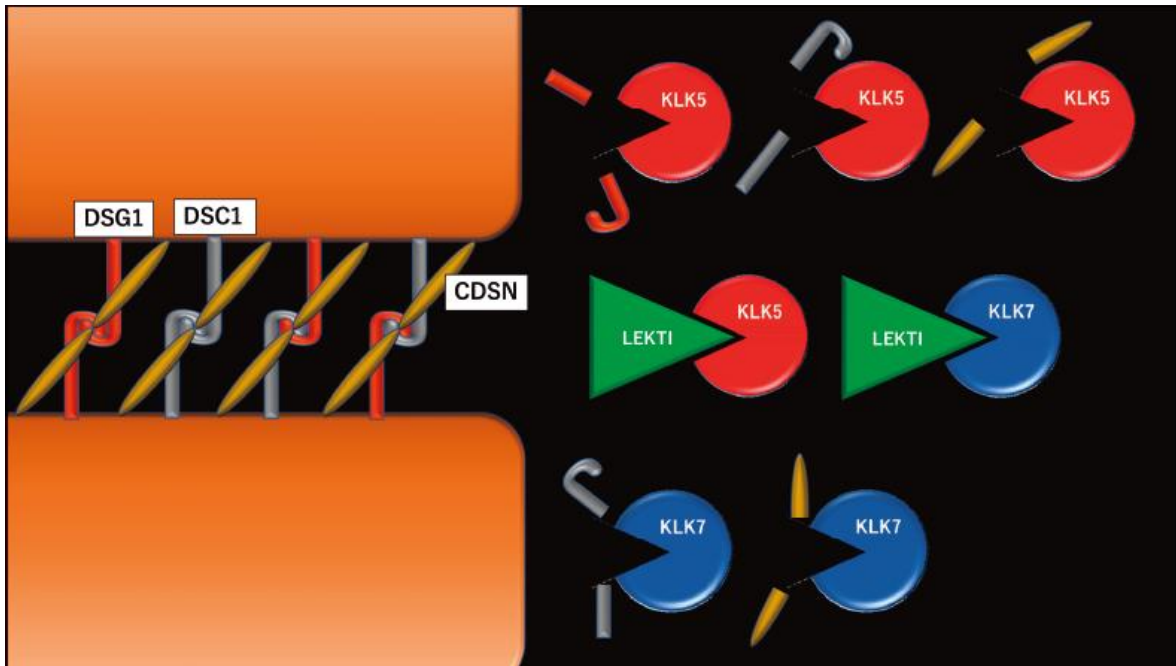
gerçekleştiğini gösterirken başka bir çalışmada bu sonucun tam tersi olarak LL-37 ifadesinin arttığını tespit etmiştir [83]. Kabul gören mevcut görüş, LL-37 seviyesinin arttığını varsaymaktadır, ancak bu seviye sedef hastalığına kıyasla daha düşük seviyededir. Mallbris ve arkadaşları tarafından elde edilen verilere göre AD lezyonlarında hCAP18 geninin ifadesinin akut yaralanma sonucunda bozulduğu ancak herhangi bir akut hasarın olmadığı koşulda ifadesinin değişmeden kaldığını da göstermişlerdir [97]. LL-37'nin hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda kurulan modeller üzerinde yapılan çalışmalarda yara iyileşmesini arttırdığı bulunmuştur [83]. Ek olarak, Akiyama ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, LL-37'nin, kladin 1, 3, 4, 7 ve okludin gibi çeşitli TJ proteinlerinin ifadelerini başarılı bir şekilde arttırdığı ve bu sayede deri bariyer bütünlüğünün korunmasında görev alabildiği gösterilmiştir [98].

2.4. Kallikrein-İlişkili Peptidazlar (KLK'lar)

KLK'lar, deri deskuamasyonu, doğuştan gelen bağışıklık, nörodejenerasyon, degradasyon ve hücre dışı matrisin (ESM) yeniden şekillenmesi dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli roller oynayan, yüksek oranda korunmuş 15 tripsin veya kimotripsin benzeri serin proteazdan oluşan tek bir aileyi oluşturur. KLK'lar 19q13.4 kromozomu üzerindeki bir gen kümesi tarafından kodlanmaktadır ve diğer proteazlar, endojen inhibitörler ve fizyolojik ortam dahil olmak üzere etkenler tarafından düzenlenmektedirler [99]. Bugüne kadar, yedi tripsin benzeri KLK (KLK-5, KLK-6, KLK-8, KLK-10, KLK-11, KLK-13 ve KLK-14) ve bir kimotripsin benzeri KLK (KLK-7) SC'de tanımlanmıştır. KLK'ların tümü inaktif olarak sentezlenir ve hücre dışına salınırlar. KLK'ların proteolitik olarak aktifleşebilmeleri için tripsin enzimi yardımıyla pro-peptitlerinden uzaklaştırılmasını gerekmektedir. Tripsin benzeri aktiviteye sahip olan KLK'lar diğer aile üyelerini aktive etme yeteneğine sahiptirler ve böylece karmaşık bir aktivasyon hiyerarşisine sahiptir [100].

Deskuamasyon proteaz inhibitörleri tarafından sıkı bir şekilde denetlenen, hücre dışı korneodesmozomların proteazlar tarafından yıkılıp korneositleri birbirlerine sabitleme işlemidir ve deri bariyer bütünlüğünün korunmasında önemli bir işlemdir. KLK ailesi derinin

deskuamasyon işleminden sorumlu ailedir ve farklı KLK üyelerinin deri deskuamasyonuna katkı sağlamaktadır. KLK-5 korneodesmozomun yapısal proteinlerinden olan desmogellin-1 (DSG), desmokolin-1 (DSC) ve korneodesmozini (CDSN) hidrolize ederken, KLK-7 sadece DSC ve CDSN'yi parçalayabilmektedir. KLK-6 ve KLK-14 de DSG'yi parçalayabilmektedirler. KLK-5 kendi kendini aktive edebilmektedir ve bu sayede proteolitik yolağı tetikleyerek korneodesmozomların parçalanmasına yol açmaktadır (Şekil 2.6) [101].



Şekil 2.6 KLK’ların normal derideki işlevi. KLK-5 ve KLK-7 korneodesmozomun yapısal proteinlerini parçalamaktadır. Bu iki proteazın aktivitesi LEKTI tarafından düzenlenmektedir [101]. DSG1: Desmogellin-1, DSC1: Desmokolin-1, CDSN: korneodesmozin, Korneositleri (turuncu kısım) birbirlerine bağlayan yapısal proteinler.

2.4.1. KLK İnhibitörleri

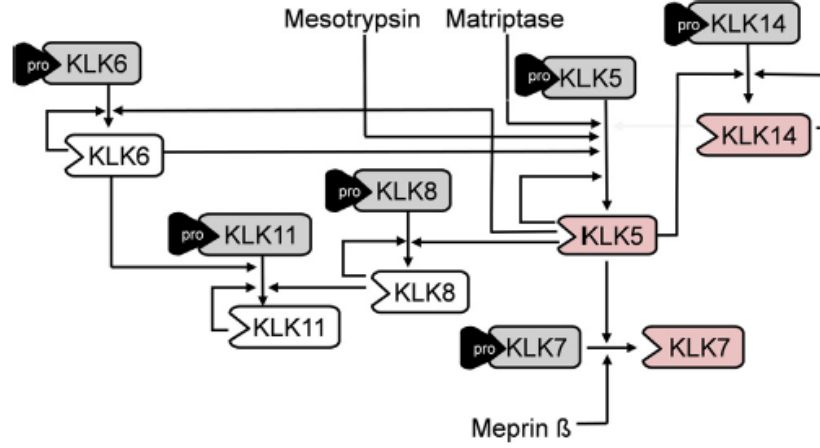
pH bağımlı lenfoepitelyal kazal-tip 5 serin proteaz inhibitörü (LEKTI) de dahil olmak üzere bir dizi proteaz inhibitörü, KLK'lar ile kompleks oluşturarak aktivitelerini sıkı bir şekilde düzenler. LEKTI, en az dördü KLK-5, KLK6, KLK-7 ve KLK14 dahil olmak üzere KLK ailesine karşı sahip olduğu bilinen 15 potansiyel serin proteinaz inhibitör parçalarından oluşur. LEKTI ailesi, SC'nin bir alt katmanı olan Stratum Granulosum (SG)'da bulunan granüler hücreler tarafından ifade edilir ve LB vezikülleri tarafından SC'nin alt katmanlarına iletilerek istenmeyen proteolitik aktiviteyi engeller. SG-SC arayüzünde LEKTI, pH'ın nötre yakın olduğu hücre dışı alanda KLK'lar ile lokalize olarak aktivitelerini regüle eder. Bu koşullar altında, LEKTI'nin hem KLK-5 hem de KLK-7'nin güçlü bir inhibitörü olduğu bulunmuştur.

Zn^{+2} ve Cu^{+2} gibi metal iyonlarının da KLK'ların aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir. Bu kasyonlar, aktivitelerini KLK'lara bağlanarak gösterirler ve KLK aktivitesini zayıflatırlar. İnhibisyon çalışmaları KLK 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12 ve 14'ün düşük konsantrasyonlarda Zn^{+2} tarafından inhibe edilebildiğini göstermiştir. Ayrıca, deri tedavileri için yaygın olarak kullanılan çinko merhemlerinde bulunan topikal ZnO da KLK aktivitesini düşürerek yara iyileşmesini ve bozulan deri bariyer bütünlüğünü iyileştirdiği gösterilmiştir [102].

2.4.2. KLK'ların Çalışma Prensibi

KLK'lar tipik olarak kendi aktivitelerini veya proteolitik aktivasyon kaskadındaki diğer KLK'ların aktivitelerini düzenler. KLK-5 hem kendisi aracılığıyla (oto-aktivasyon) hem de matriptaz ve matriks metalloproteazlar gibi diğer proteazlar tarafından aktive edilerek inflamatuvar kaskadın başlamasını sağlamaktadır. KLK-5, KLK-7 ve KLK14 gibi diğer KLK'ları da aktive ederken, aktive olan KLK14 pozitif geri bildirim yoluyla tekrar pro-KLK-5'i aktive edebilir. Ayrıca KLK-5, pro-KLK1 ve pro-KLK11'i aktive etme yeteneğine sahip KLK8'i de aktive edebilir. KLK6, KLK-5 ve KLK11'i aktive edebilmesine rağmen, KLK11 ve KLK13 gibi bazı KLK'ların aktivasyon kaskadındaki rolü henüz net değildir. Bir metalloproteaz olan meprin β , pro-KLK-7'yi aktive ederek deskuamasyonu

indükleyebilmektedir. KLK-5 ve KLK8'in de meprin β 'yı aktive edebildiği gösterilmiştir (Şekil 2.7) [99].



Şekil 2.7 KLK'ların aktivasyon kaskadı [99].

Proteazların aktivitesi pH, nem ve iyon konsantrasyonu gibi fizyolojik koşullardan da etkilenmektedir. SC'nin yüzeyi asidik bir pH değerine (4.5-5.3) sahiptir ve bu değer iç katmanlara doğru giderek daha nötr (6.8-7.5) hale gelir. Sedef hastalığı ve AD gibi inflamatuvar deri hastalıklarında, cildin yüzeyi pH'ı nötr bir seviyeye yükselir. KLK'ların optimum pH değeri nötr olduğundan, aktiviteleri pH 5 değerinde önemli ölçüde azalır. LEKTI nötr pH'da KLK'lar ile oluşturduğu kompleks sayesinde erken deskuamasyonu önlemeye yardımcı olmasına rağmen, derinin daha alkali olması KLK-5'in öncülük ettiği deri bariyer yapısını bozmak ve AD benzeri dermatite yol açabilen Th2 inflamasyonunu tetiklemektedir [99].

2.4.3. KLK ve AD İlişkisi

KLK'ların, AD ile ilişkisini gösteren çalışmalarda KLK-5, KLK-7 ve KLK-14 ifadelerinin , AD hastalarının lezyonlu bölgelerinde artış gösterdiği gösterilmiştir [101]. Aynı zamanda serum KLK-7 seviyeleri de artış göstermektedir ve bu artış periferik kan eozinofil sayısı ile

doğru orantılıdır. Deride gerçekleşen inflamasyonda KLK-7 başta olmak üzere diğer KLK'ların da patogenezinde yer aldığı deri bariyer harabiyeti gerçekleşir. Özellikle KLK-5, KLK-7 ve KLK14 proteaz aktivitelerini PAR-2 reseptörünü aktive ederek göstermektedir ve inflamatuvar yanıt bu reseptör üzerinden başlatılır [99]. Deri sağlığının korunmasında hidrasyon önemli bir görev üstlenir. FLG'nin yıkımı sonucu oluşan NMF SC'nin hidrasyonundan sorumludur. Ancak FLG'de gerçekleşen mutasyonlar deri bariyer bütünlüğünü bozarak derinin içerisine alerjenlerin girişini kolaylaştırır ve KLK'lar aracılığıyla deride inflamasyona sebebiyet verir. KLK'lar aracılığıyla deride meydana gelen inflamatuvar yanıt sadece FLG'deki işlev bozukluğundan kaynaklı değil, deri pH'nın artışı, LEKTI ifadesinden sorumlu olan SPINK5 genindeki mutasyon aracılı da gerçekleşmektedir. Deride gerçekleşen inflamatuvar yanıt sürecinde ifadesinin arttığı bilinen KLK-7'nin inflamatuvar süreç olmadan bile AD'nin kronik kaşıntısına katkıda bulunduğu da tespit edilmiştir [103].

2.4.3.1. KLK-5, KLK-7 ve AD

AD durumunda deride meydana gelen harabiyet nedeniyle aktivitelerinde artış gösteren başlıca KLK üyeleri KLK-5 ve KLK-7'dir. Bu iki enzim deri deskuamasyonundan sorumlu başlıca enzimlerdir ve AD durumunda aktivitelerindeki artış sonucu deri bariyer geçirgenliğinin daha da artmasına neden olmaktadır [104]. Özellikle KLK-5'in sahip olduğu kendi kendini aktive etme yeteneği ve ardından diğer KLK'ları aktive edebilmesiyle AD patogenezinde katkı sağlamaktadır. KLK-5'in deride TSLP ifadesini PAR-2 yolağı aracılığıyla arttırdığı ve böylece deride Th2 dominant bir mikro-çevrenin oluşmasına neden olduğu da tespit edilmiştir [101]. Bunların yanında KLK-5 ve KLK-7'nin LL-37'yi aktive edebildikleri de gösterilmiştir. KLK-7 ifadesinin IL-4 ve IL-13 ile birlikte artış gösterdiği özellikle AD'li bireylerin lezyonlu bölgelerinde bu durumun gözlemlendiği de bildirilmiştir [100].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan insan epidermal keratinosit hücre hattı HaCaT (HEKa) (Katalog no. C0055C), ThermoFischer Scientific firmasından ticari olarak satın alınmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında sert suyun etkisinin incelenebilmesi için CaCO_3 (Katalog no. TK.200200.01002) Tekkim firmasından satın alınmıştır.

Hücre canlılığının tespiti için kullanılan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (Katalog no. M2128) Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır.

Reseptör bloklama deneyleri için kullanılan C29 (Katalog no. 27029) Cayman firmasından, Sparstolonin B (Katalog no. SML1767) Sigma-Aldrich firmasından, MyD88 inhibitör peptit (Katalog no. NBP2-29328) Novus Biologicals firmasından, SAM11 (katalog no. 14-9699-82) ThermoFischer Scientific firmasından satın alınmıştır. Reseptör bloklanlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla etidyum bromür/kalsein (EtBr/Kalsein AM) boyaması yapılmıştır ve EtBr/Kalsein AM boyası (Katalog no. 30002) Biotium (ABD) firmasından satın alınmıştır.

HaCaT hücre hattının farklılaştırılmasının kontrolü için kullanılan anti-sitokeratin-1 (K1) antikoru (Katalog no. sc-376224) Santa Cruz Biotechnology firmasından temin edilmiştir.

Hücre uyarımlarının ardından gerçekleştirilen RNA izolasyonu ThermoFischer Scientific firmasından temin edilen RNA izolasyon kiti (Katalog no. 12183018A) ile, cDNA çevrimi ise ThermoFischer Scientific firmasından satın alınan cDNA sentez kiti (Katalog no. K1622) ile gerçekleştirilmiştir.

Gerçek-zamanlı PZR deneyleri için kullanılan SYBR Green boyası (Katalog no. A324402) Ampliqon firmasından satın alınmıştır.

HaCaT hücre hattından salınan KLK-5, KLK-7 ve LL-37 protein miktarları KLK-5 ELISA kiti (Katalog no. DY8459-05) RnD Systems firmasından, KLK-7 ELISA kiti (Katalog no.

ELK1283) ELK Biotechnology firmasından ve LL-37 ELISA kiti (Katalog no. E-EL-H2438) Elabscience firmasından temin edilmiştir.

3.2. Hücre kültürü çalışmaları

3.2.1. HaCaT ve Eol-1 hücre hatlarının kültürlenmesi

İnsan keratinosit hücre hattı olan HaCaT, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin, 0.03 mM CaCl_2 ve 4 mM L-glutamin içeren DMEM besiyerinde T-25 flask içerisinde %5 CO_2 atmosferinde ve 37°C 'de inkübatörde büyütülmüştür [105]. Hücre canlılık deneylerinde kullanılmak üzere %80 kaplama oranına ulaşan HaCaT hücre hattı, tripsin/EDTA karşımı ile kaldırılıp 5 dakika boyunca 1500 rpm'de santrifüje edilmiştir. Hücreler uygun besiyeri hacminde çözölmüş ve tripan mavisi boyama yöntemiyle thoma lamında sayılmıştır.

İnsan eozinofil hücre hattı olan Eol-1, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin içeren RPMI1640 besiyerinde T-25 flask içerisinde %5 CO_2 atmosferinde ve 37°C 'de inkübatörde büyütülmüştür [106]. Canlılık deneylerinde kullanılmak üzere %80 kaplama oranına ulaşan Eol-1 hücreleri, 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek çöktürölmüştür. Üzerindeki besiyeri uzaklaştırılan hücreler uygun besiyeri hacminde çözölmüş ve tripan mavisi boyama yöntemiyle thoma lamında sayılmıştır.

3.2.2. Sert Su Uyarımına Bağlı Sitotoksisite Deneyleri

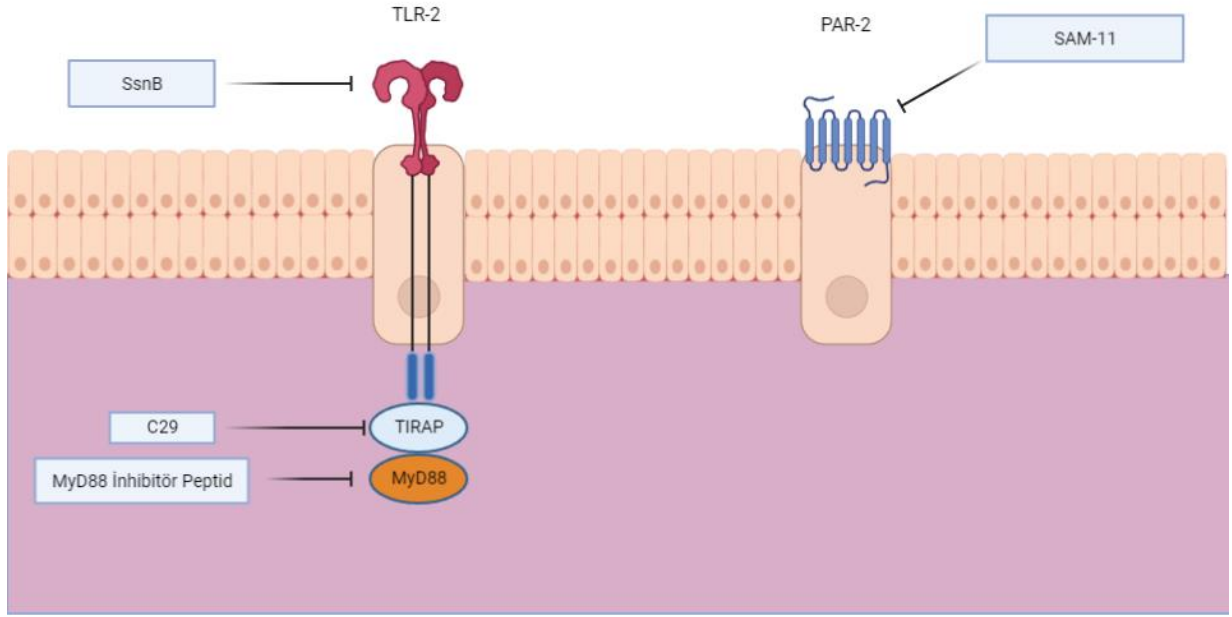
HaCaT hücreleri ile yapılacak sitotoksisite deneyleri için 96-kuyucuklu plakalara $1-2,5 \times 10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Uyarımlar için hücrelerin %90 kaplama oranına ulaşmaları beklenmiştir. Hücreler, %90 kaplama yoğunluğuna ulaştığında uyarıma başlanmıştır.

Eol-1 hücreleri 7×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. Eol-1 hücre hattı süspanse hücre morfolojisi gösterdiği için plakalara ekildikten sonra herhangi bir kaplama zamanına ihtiyaç duymamaktadır. Bu nedenle 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler total hacmin yarısı kadar ekilmiştir (50 μL).

Hücreler, artan konsantrasyonlarda (100 mg/L, 150 mg/L, 180 mg/L, 200 mg/L ve 250 mg/L) CaCO_3 ile 6, 12 ve 24 saat boyunca uyarılmıştır. Uyarım süresi sonunda HaCaT hücrelerinin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak yeni besiyeri eklenmiştir. Eol-1 hücrelerinin bulunduğu 96-kuyucuklu plaka ise 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve bu sayede besiyeri uzaklaştırılarak yeni besiyeri eklenmiştir. Her kuyuya 13 μL MTT solüsyonu eklenmiş ve plakalar etüvde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Eol-1 hücreleri için inkübasyon sonrasında plaka yeniden 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüje edilmiştir. Üzerindeki besiyerleri çekildikten sonra her bir kuyucuğa 150 μL DMSO solüsyonu eklenerek oluşan kristal çökeltisi çözülmüştür. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen plaka 570 nm'de plaka okuyucuda okutulmuştur [107].

3.2.3. Uygun Reseptör Blokanının Seçilmesi

HaCaT hücre hattı, TLR-2 blokanları olan C29, Sparstolonin B (SsnB) ve MyD88 inhibitör peptit ile PAR-2 blokanı olan SAM-11 ile uyarılmak üzere 96-kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 2×10^4 sayıda hücre ekilmiştir. SsnB blokanı TLR-2 reseptörünü ektodomain kısmından, C29 blokanı TIRAP domaininden, MyD88 inhibitör peptit ise MyD88 adaptör protein kısmından bloke ederken, SAM-11 monoklonal antikoru ise PAR-2 reseptörüne bağlanarak aktivasyonunu inhibe etmektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Tez kapsamında kullanılan blokanların TLR-2 ve PAR-2 reseptörleri üzerinden bloklama yaptığı bölgelerin ve moleküllerin gösterimi

Blokanların HaCaT hücreleri üzerindeki etkisini görmek amacıyla canlı/ölü hücre boyaması yapılmıştır. Hücrelerin uyarımını gerçekleştirmek üzere;

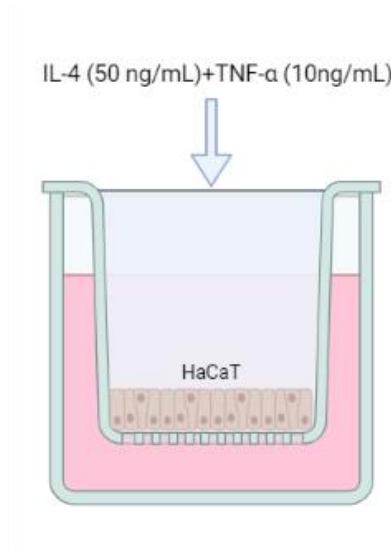
- C29 Blokanı: 50-100-150 μ M konsantrasyonda 1 ve 2 saat [108, 109],
- SAM-11 Antikoru: 20 μ g/mL ve 25 μ g/mL konsantrasyonlarda 2 saat [110],
- Sparstolonin Blokanı (SsnB): 50-100 μ M konsantrasyonda 24 saat [111],
- MyD88 İnhibitör Peptidi: 50-100 μ M konsantrasyonda 24 saat boyunca uyarılmıştır [112].

Uyarım süreleri sonunda canlı hücreler Kalsein AM, ölü hücreler etidyum bromür ile boyanmıştır. Uyarım süresi bitmeden 500 μ l PBS içerisine 1 μ l EtBr ve 0,25 μ l Kalsein AM eklenerek boyalar hazırlanmıştır. Uyarım süresi sonunda kuyucuklardan besiyerleri uzaklaştırılmış ve 50 μ l EtBr/Kalsein boyası kuyucuklara eklenmiştir. Hücreler 15 dakika boyunca boya ile inkübe edilmiştir. Boyamalar, floresan mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir. Görüntüleme sırasında her bir kuyucuktan en az 5 görüntü elde edilmiştir. Floresan görüntülerini elde etmek için Thermo Fisher firmasının EVOS Flouid floresan mikroskobu kullanılmıştır. Gerçekleştirilen blokan sitotoksiste deneylerinin ardından

kullanılan blokanların ilgili reseptörleri blokladığını kontrol etmek amacıyla TLR-2 reseptörünün aktivatörü olduğu bilinen LPS ve PAR-2 reseptörünün aktivatörü olduğu bilinen SLIGLR peptidi ile uyarılmış ve inflamatuvar hasar sonucunda arttığı bilinen pro-inflamatuvar sitokinlerden IL-6 seviyesi incelenmiştir.

3.2.4. HaCaT Hücrelerinin Hava-Sıvı Arayüz (ALI) Yöntemi ile Farklılaştırılması ve AD Modelinin Oluşturulması

Düşük kalsiyumda (0,3 mM CaCl_2) büyütülen HaCaT hücreleri farklılaşmanın gerçekleştirilmesi için $1,2 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 2.8 mM kalsiyum klorür içeren DMEM besi yeri içerisinde 0,4 μm porları olan transwell aparatı üzerine ekilmiştir [105]. Başlangıçta hücreler 2 günde bir besiyeri değiştirilmek üzere 3-4 gün inkübe edilmiştir. HaCaT hücrelerinin doğru bir şekilde farklılaşıp farklılaşmadığını göstermek amacıyla derinin yapısal proteinlerinden olan sitokeratin-1 (K1) protein ifadesine immünofloresan (IF) boyama ile bakılmıştır [113]. HaCaT hücreleri transwell üzerinde %100 yoğunluğa ulaştıktan sonra 7 gün boyunca farklılaştırılmıştır. 37 °C'de %5 CO_2 ortamında alt çemberdeki besiyeri 2 günde bir değiştirilmek üzere hücreler inkübe edilmiştir. Farklılaştırmanın son 24 saatinde AD modelinin oluşturulması için hücreler 10 ng/mL TNF- α ve 50 ng/mL IL-4 ile birlikte uyarılmıştır [114] (Şekil 3.2).

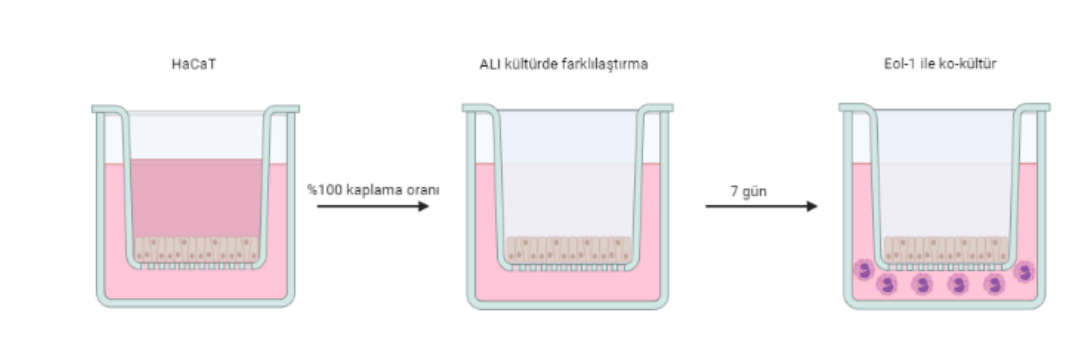


Şekil 3.2 6 gün boyunca farklılaştırılan HaCaT hücreleri, 7.günde 24 saat boyunca AD modelinin oluşturulması için IL-4 ve TNF- α ile uyarılmıştır.

AD modelinin oluşturulup oluşturulmadığını kontrol etmek amacıyla da FLG geninin ifadesine bakılmıştır [114].

3.2.5. HaCaT hücrelerinin Eol-1 hücreleri ile ko-kültür edilmesi, reseptör bloklamasının gerçekleştirilmesi ve sert su ile uyarılması

Ko-kültür için Eol-1 hücreleri, HaCaT hücrelerinin farklılaşmasının tamamlanmasının ardından 8.günde ALI kültürün bazal kısmına $2,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir (Şekil 3.3). Farklılaştırma besi yeri olarak 2 hücre için kullanılan besiyerleri yarı yarıya karıştırılarak kullanılmıştır [115]. Sonrasında hücreler hem sitotoksisite deneyinden elde edilen sonuca bağlı olarak belirlenen konsantrasyonda CaCO_3 ile hem de blokan deneyleri sonrasında seçilen uygun bloklanlar kullanılarak 12 ve 24 boyunca uyarılmıştır.



Şekil 3.3 *In vitro* ortamda oluşturulan olan ko-kültür modeli.

3.3. Hücrelerde Gen İfadesinin İncelenmesi

3.3.1. RNA İzolasyonu

Uyarımları gerçekleşen hücrelerin RNA izolasyonu aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

1. Hücrelere %1 β -Merkaptoetanol içeren 350 μ l RLT tampon ilave edilerek pipetle yapılan çek-bırak işlemiyle parçalanmıştır.

2. Hücrelerin üzerine steril DEPC su ile sulandırılmış %70 etanol eşit olarak dağıtılır. 2 ml'lik toplama tüpü içindeki kolona pipet ile bırakılmıştır.
3. Tüpler, 13000 rpm'de 30s santrifüj edilmiştir.
4. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmış ama kolon atılmamıştır. Kolonun üzerine 700 µl RW1 yıkama tampon ilave edilmiştir.
5. Tüpler 13000 rpm'de 30s santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atılır ve kolon yeni bir toplama tüpü içine yerleştirilir. Kolon üzerine 500 µl RPE solüsyonu ilave edilir. 13000 rpm'de 30s santrifüj edilmiştir.
7. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılır ve üzerine tekrar 500 µl RPE solüsyonu ilave edilir. Tüpler 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
8. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılır ve kolonda kalan RPE solüsyonunu uzaklaştırmak için kolona herhangi bir ekleme yapmadan 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Kolon, steril 1,5 ml ependorf tüp üzerine alınır. Kolonun üzerine 50 µl RNaz içermeyen su ilave edilerek 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen RNA örnekleri -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.2. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

RNA izolasyonunun ardından cDNA sentezi gerçekleştirilerek örnekler gerçek-zamanlı PZR için hazırlanmıştır. cDNA sentezi aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir;

1. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonlarına göre hesaplama yapıp, belirlenen miktar PZR tüplerine konulmuştur.
2. RNA örneklerinin konulduğu PZR tüplerine hesaplanan miktarlarda distile su ve 1 µl OligodT ilave edilmiştir.
3. Thermal cycler cihazı 65°C 5 dakikaya ayarlanmış ve örnekler 5 dakika boyunca cihazda tutulmuştur.

4. 5 dakika inkübasyon sonrasında PZR tüplerine reaksiyon tamponu (4 µL), dNTP (2 µL), reverse transcriptase (1 µL) ve ribolock RI (1 µL) eklenmiştir.
5. Thermal cycler cihazı 42°C 60 dakika, 70°C’de 5 dakikada ve 1 döngü olacak şekilde ayarlanmış ve örneklerin cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.
6. Sentezlenen cDNA örnekleri nanodrop (Quawell Q5000 – UV-Vis) kullanılarak ölçülmüştür.

3.3.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA sentezi gerçekleştirilen örneklerin KLK-5, KLK-7, LL-37, FLG, IL6 ve PPIA genlerinin ifadesi Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ile incelenmiştir. Gerçek zamanlı PZR de kullanılan primerler Çizelge 3.1’de verilmiştir. İnternal kontrol olarak Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) kullanılmıştır. Reaksiyon için kullanılan malzemeler ve polimeraz zincir reaksiyon koşulları çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Tez çalışması kapsamında kullanılan genlerin ileri ve geri primer dizileri.

Genler	İleri Primer	Geri Primer	Ref.
KLK-5	5’-GATGCTTACCCGAGACAGAT-3’	3’-ACCAGACGTTACCGAGGGA-5’	[116]
KLK-7	5’-ATTCCATGCTGTGCGCTGG-3’	3’-AGACCACAGGACCCCTTGA -5’	[117]
LL-37	5’-CGGATGCTAACCTCTACCG-3’	3’-TCTGTGCGGTTTCGGACAC-5’	[118]
FLG	5’-TGAGGGCACTGAAAGGCAAA-3’	3’-CCCAAATCTGTGAGAGTCGT-5’	[119]
IL-6	5’-GCAGATGAGTACAAAAGTCCTGA-3’	3’-TTCTGTGCCTGCAGCTTC-5’	[120]
PPIA	5’-CATCCTAAAGCATACGGGTCC-3’	3’-TCTTTCACCTTGCCAAACACC-5’	[121]

Çizelge 3.2 Gerçek zamanlı PZR reaksiyon ve döngü koşulları; *: Aşama, 35 döngüde tamamlanmıştır.

	Malzeme	Miktarı	
Reaksiyon Koşulları	2X SYBR Green PCR Master Mix	5 µL	
	İleri Primer (10 µM)	0,1 µL	
	Ters Primer (10 µM)	0,1 µL	
	Nükleaz-içermeyen su	1,8 µL	
	Kalıp	3 µL (10 ng)	
	Döngü aşaması	Sıcaklık	Süre
Döngü Koşulları	Isıyla aktivasyon	95 °C	15 dk
	Denaturasyon *	95 °C	10 s
	Primer yapışma/uzama *	60 °C	30 s

3.3.4.ROS Genlerinin İncelenmesi

HaCaT hücreleriyle ko-kültüre edilen Eol-1 hücrelerinden, gerçekleştirilen uyarımlar sonrası RNA izolasyonu yapılarak oksidatif stres genlerine (PZR array) gerçek zamanlı PZR yöntemiyle bakılmıştır. RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve gerçek zamanlı PZR deneyleri yukarıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sert su uyarımına bağlı ROS profillerinin incelenmesi için analiz edilen genler Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Tez Kapsamında İncelenen Genler	Referanslar
GADPH	[122]
SOD1	[123]
CCL5	[124]
APOE	[125]
GPX1	[126]
GTSP1	[127]
MB	[128]
NOX4	[129]
NOS2	[130]

Çizelge 3.3 Tez çalışması kapsamında Eol-1 hücrelerinden salınan ROS'ların tespiti için kullanılan gen profili.

3.4. Hücrelerin Protein Seviyelerinin Ölçülmesi

3.4.1. Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA)

Uyarım süreleri sonunda transwell insertlerinden toplanan süpernatantlarda IL-6, KLK -5, -7 ve LL-37 protein seviyeleri ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. IL-6 ve KLK-5 için aşağıdaki ELISA protokolü izlenmiştir;

1. Bir gece önceden yakalama antikoru 96 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır.
2. Plaka bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
3. Sonrasında yıkama solüsyonu ile plaka üç kere yıkanmış ve kuyucuk başına 300 µl bloklama solüsyonu eklenerek 1,5 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Yıkama solüsyonu ile plaka üç kere yıkanmıştır. Örnekler önerilen oranda kitin içerisinde bulunan sulandırma solüsyonu ile seyreltilerek kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde dağıtılmış ve plaka 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
5. Yıkama solüsyonu ile plaka üç kere yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 µl belirleme solüsyonu eklenecek ve plaka oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir.
6. Yıkama solüsyonu ile plaka üç kere yıkanmıştır. Streptavidin-HRP solüsyonundan her kuyucuğa 100 µl konularak plaka 20 dakika inkübe edilmiştir.
7. Yıkama solüsyonu ile plaka üç kere yıkanacak. Renk reaktifi A ve renk reaktifi B, 1:1 oranında karıştırılarak her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir.
8. Yaklaşık 10-20 dakika arası beklenmiş ve sonrasında 50 µl durdurma solüsyonu kuyucuklara konulmuştur.
9. Plakalar 450 nm ve 540 nm değerlerine ayarlanan mikroparka okuyucu (Perkin Elmer Multimode Plate Reader) kullanılarak ölçülmüştür.

KLK-7 ve LL-37 için aşağıdaki ELISA protokolü izlenmiştir;

1. Her bir kuyucuğa 100 µl protokolde önerilen oranda seyreltilmiş örnekler dağıtılmıştır ve plaka 80 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

2. İnkübasyon sonrasında örnekler uzaklaştırılmış ve plaka 3 defa yıkama solüsyonuyla yıkanmıştır.
3. Kuyucuklardan yıkama solüsyonu uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 100 µl biyotinlenmiş antikor konmuş ve 50 dakika boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon sonrasında plaka 3 defa yıkama solüsyonuyla yıkanmıştır.
5. Kuyucuklardan yıkama solüsyonu uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP solüsyonu konmuş ve 50 dakika boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon sonrasında plaka 5 defa yıkama solüsyonuyla yıkanmıştır.
7. Kuyucuklardan yıkama solüsyonu uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 90 µl TMB Substrat solüsyonu konmuş ve 20 dakika boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu konmuş ve plaka 450 nm ve 540 nm değerlerine ayarlanan mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür.

3.4.2. İmmunofluoresan (IF) boyama

HaCaT hücreleri farklılaşmasının kontrolü için 24 kuyucuklu plakalar içerisine transwell’ler ekilmiş ve %80 kaplama yoğunluğuna ulaştığında K1 protein ifadesi IF boyama ile incelenmiştir. IF boyama için aşağıdaki protokol izlenmiştir;

1. Transwell üzerinden besiyeri uzaklaştırılmış ve 500 µl PBS ile yıkama yapılmıştır.
2. Transwell’in alt kısmı steril bistüri yardımıyla kesilip lamel üzerine yerleştirilmiştir.
3. Lamel üzerine yerleştirilen transwell’in çevresi herhangi bir sıvı kaybı olmaması adına hidrofobik kalem ile çizilmiştir.
4. Lamel 1 kere 150 µl PBS ile yıkanmıştır.
5. Fiksasyon aşaması için lamellerin üzerine 150 µl %10 formaldehit/PBS karışımı eklenmiştir ve +4°C’de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
6. Formaldehit lamellerden uzaklaştırılmış ve 1 kez 250 µl PBS ile yıkanmıştır.
7. Geçirgenleştirme (permeabilization) için 150 µl %0.2 Triton X-100/PBS karışımı lamellerin üzerine eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

8. Triton X-100 lamellerden uzaklaştırılmıştır ve %1 BSA içerisinde seyreltilen Anti-Sitokeratin 1 antikorundan 150 µl lamellere konmuş ve 2 saat oda sıcaklığında ışık görmeyecek şekilde inkübe edilmiştir.
9. İnkübasyon sonrası primer antikor uzaklaştırılmış ve sonrasında lameller 4 kere 150 µl %0.2 Triton X-100/PBS karışımı ile yıkanmıştır.
10. IgG-mouse (fare) sekonder antikor %1 BSA ile seyreltilmiş ve 150 µl lamellere eklenerek 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir.
11. Sekonder antikor uzaklaştırılmış ve lameller 4 kere 150 µl %0.2 Triton X-100/PBS karışımı ile yıkanmıştır.
12. Yıkama sonrasında transwell'in üzerine 2 damla mounting media damlatılmış ve üzeri lam ile kapatılmıştır.
13. Floresan mikroskop kullanılarak görüntüler alınmıştır. Floresan görüntülerini elde etmek için Thermo Fisher firmasının EVOS Flouid floresan mikroskobu kullanılmıştır.

3.5. İstatistiksel Analiz

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen tüm deneylerin istatistiksel analizleri Graph Pad Prism 9.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Veriler, $\pm$ ortalama standart hata ile gösterilmiştir. Genler arasındaki ifade farklılıklarını tespit etmek amacıyla Kruskal Wallis Test uygulanmış devamında post hoc analizleri yapılmıştır. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

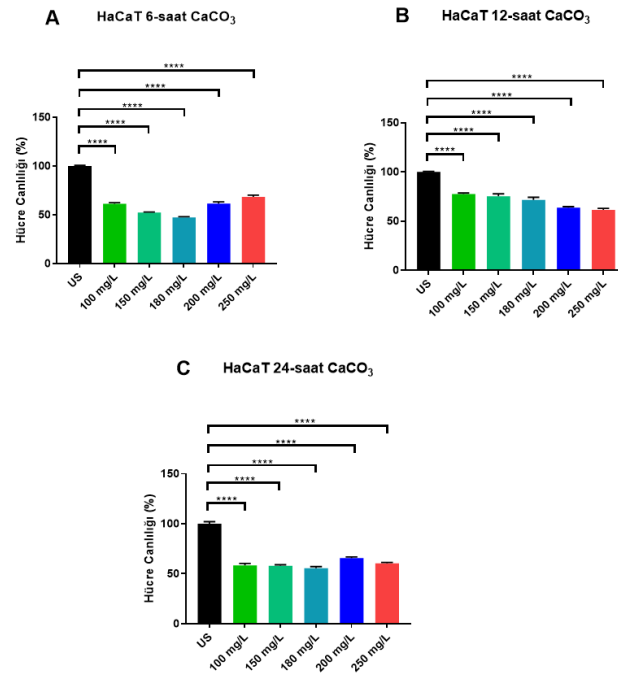
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması kapsamında sert su olarak tanımlanan yüksek konsantrasyonda kalsiyum içeren suyun deri hücre hattı HaCaT'lar üzerindeki etkisinin araştırılması ve inflamatuvar hücre tipi olan eozinofillerin (eol-1) de bu etkideki rolünün incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Bunların yanında literatürde AD ile ilişki olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilen iki hücre yüzey reseptörü olan TLR-2 ve PAR-2 reseptörlerinin sert su ile karşılaşılması sonrasında aktivasyonları da incelenmiştir.

4.1. Sitotoksikite Deneyleri

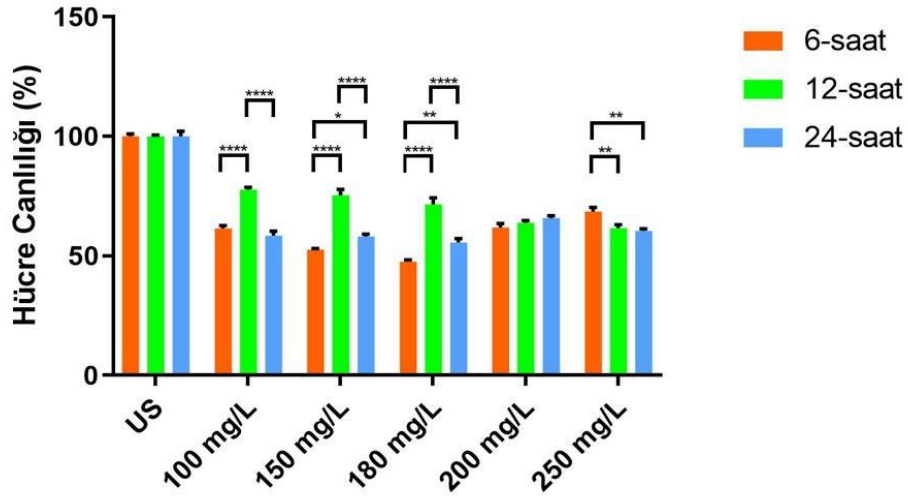
4.1.1. CaCO₃'ün HaCaT Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

CaCO₃'ün HaCaT hücreleri üzerindeki etkisini görmek amacıyla hücreler, 100 mg/L, 150 mg/L, 180 mg/L, 200 mg/L ve 250 mg/L CaCO₃ ile 6, 12 ve 24 saat boyunca uyarılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 HaCaT hücrelerinin artan CaCO₃ konsantrasyonlarında 6 (A), 12 (B) ve 24 (C) saat uyarılmaları sonrasında elde edilen MTT sonucu; n=3, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.

HaCaT hücrelerinin CaCO_3 'ün artan konsantrasyonları ile uyarımı sonrası elde edilen sonuçların kendi arasında istatistiksel karşılaştırması Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 HaCaT hücrelerinin artan CaCO_3 konsantrasyonlarında 6, 12 ve 24 saat uyarımları sonrasında elde edilen MTT sonucu; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001.

Gerçekleştirilen uyarımlar sonucunda hücre canlılığının, sert su olarak tanımlanan 150 ve 180 mg/L CaCO_3 konsantrasyonunda 6 saatte %50'ye düştüğü; yüksek konsantrasyonlarda ise (200-250 mg/L) daha düşük konsantrasyonlara göre hafif ancak istatistiksel olarak anlamsız bir toparlanma görülmüştür. 12. saatte ise CaCO_3 konsantrasyonundaki artışla ölü hücre sayısı da artış göstermiştir. 24 saatlik uyarım sonucunda HaCaT hücre canlılıkları tüm koşullarda %50-60 arasında seyrettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

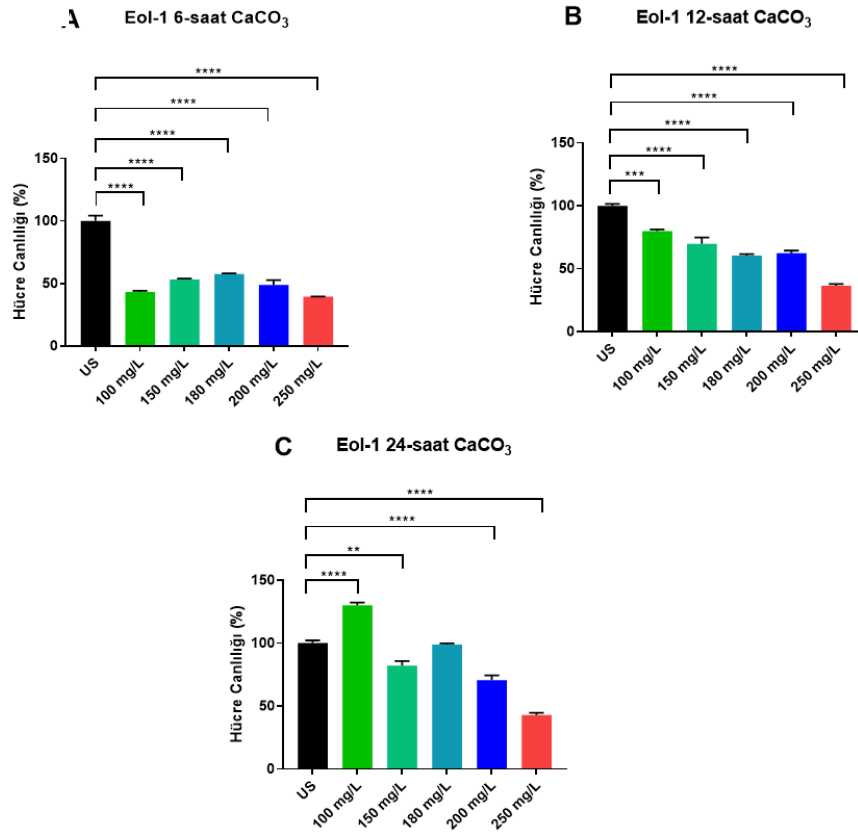
Literatürde kalsiyumun hücre içerisine yüksek konsantrasyonlarda giriş yapmasının ardından hücrelerde nekroz ve apoptoz gibi iki farklı ölüm yolağı ile ilişkilendirilen moleküllerde artış tespit edilmiştir [131]. HaCaT hücrelerinde de artan konsantrasyon ve sürelerde CaCO_3 ile uyarılması sonucunda hücre canlılığının uyarılmamış (US) koşula kıyasla 6, 12 ve 24 saatte 100 mg/mL konsantrasyondan itibaren azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2). 'Sert su' olarak tanımlanan 180 mg/L CaCO_3 konsantrasyonunda 6.saatte en düşük hücre canlılığı gözlenirken, hücre canlılığının diğer koşullara kıyasla daha yüksek olduğu koşullar ise 12 saat boyunca artan konsantrasyonlarda CaCO_3 ile uyarılan HaCaT

hücrelerinde gözlenmiştir. ‘Aşırı sert su’ olarak ifade edilen 250 mg/L CaCO_3 konsantrasyonunda ise saate bağlı olarak hücre ölümü artış göstermiştir.

MTT yöntemi sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda CaCO_3 ’ün 100 ve 150 mg/L konsantrasyonları HaCaT hücrelerinin ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir bu nedenle daha yüksek konsantrasyonlar olan 180 ve 200 mg/L konsantrasyonlarındaki CaCO_3 ileriki deneyler için kullanılmıştır.

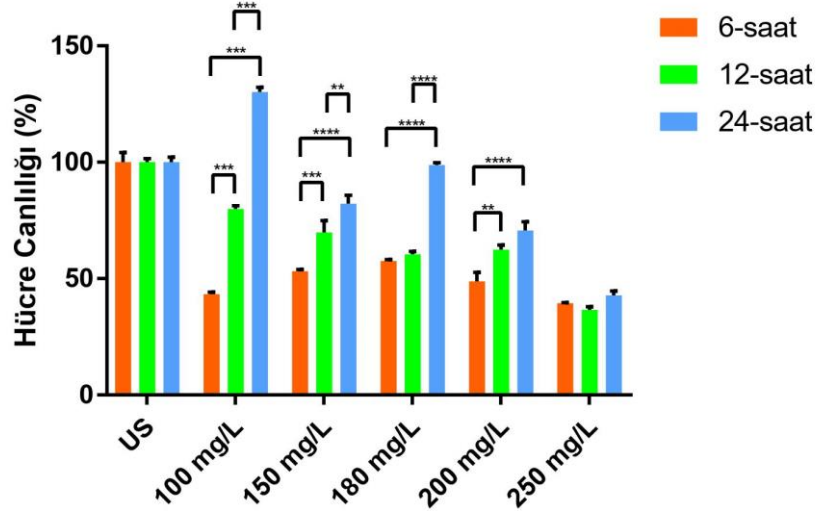
4.1.2. CaCO_3 ’ün Eol-1 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

Eol-1 hücreleri sırasıyla 100, 150, 180, 200 ve 250 mg/L konsantrasyonlarındaki CaCO_3 ile 6, 12 ve 24 saat boyunca uyarılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Eol-1 eozinofil hücrelerinin artan CaCO_3 konsantrasyonlarında 6 (A), 12 (B) ve 24 (C) saat uyarılmaları sonrasında elde edilen MTT sonucu; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Eol-1 hücrelerinin CaCO_3 'ün artan konsantrasyonları ile uyarımı sonrası elde edilen sonuçların kendi arasında istatistiksel karşılaştırması Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Eol-1 hücrelerinin artan CaCO_3 konsantrasyonlarında 6, 12 ve 24 saat uyarılmaları sonrasında elde edilen MTT sonucu; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Uyarım sonucunda hücre canlılığının 6.saatte en düşük seviyede olduğu, 12. ve 24. saatlerde ise canlı hücre sayısında **kademeleri bir artışın** gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.3). En yüksek konsantrasyon olan 250 mg/L CaCO_3 ile uyarılan Eol-1 hücrelerinin canlılığı her 3 saatte de sabit kaldığı görülmüştür. Hücre canlılığının her 3 saatte de %50 altında kalması, “çok yüksek” su kireçliliği düzeyi olan 250 mg/mL CaCO_3 konsantrasyonunun eozinofil hücreleri için de letal doz olduğunu göstermektedir. Hücre canlılığının ortalama (moderate) su sertliği seviyesi olan 100 mg/L CaCO_3 konsantrasyonunda 6 saatte %50 altına düştüğü ancak 12. Saatte %80’e, 24. Saat sonunda ise %110’a çıktığı gözlenmiştir (Şekil 4.4).

Literatürde “sert su” olarak tanımlanan CaCO_3 konsantrasyonlar 150 mg/L ve üstündeki değerlerdir. Çalışmamızda 150 ve 180 mg/L CaCO_3 konsantrasyonlarında 6 saat sonunda

hücre canlılığının %60 civarında olduğu 24 saat sonunda ise sırasıyla %80 ve %100' çıktığı gözlenmiştir. 200 mg/L'de ise hücre canlılığı 24 saat sonunda %70 olarak tespit edilmiştir.

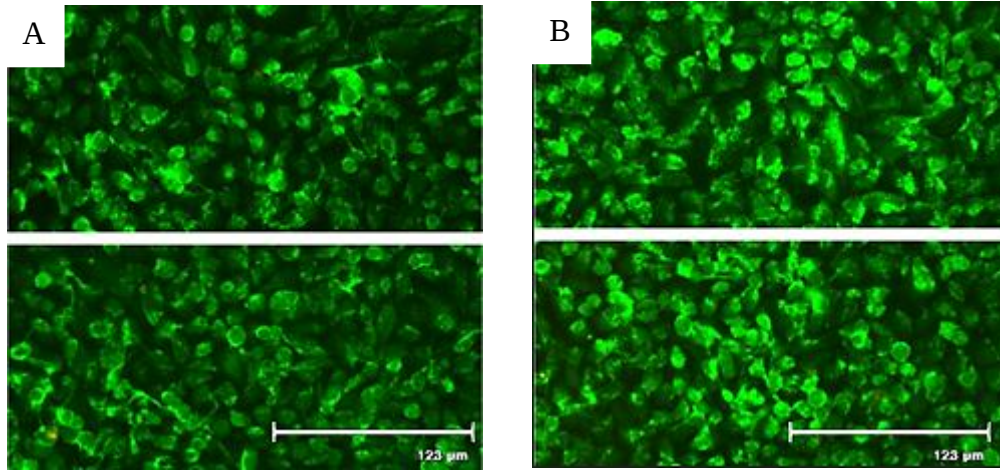
HaCaT ve eol-1 hücreleri ile yapılan MTT sonuçları doğrultusunda 180 ve 200 mg/L CaCO_3 konsantrasyonlarının 12 ve 24 saatlik uyarımların kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.3. Reseptör Blokanlarının Sitotoksik Etkisi

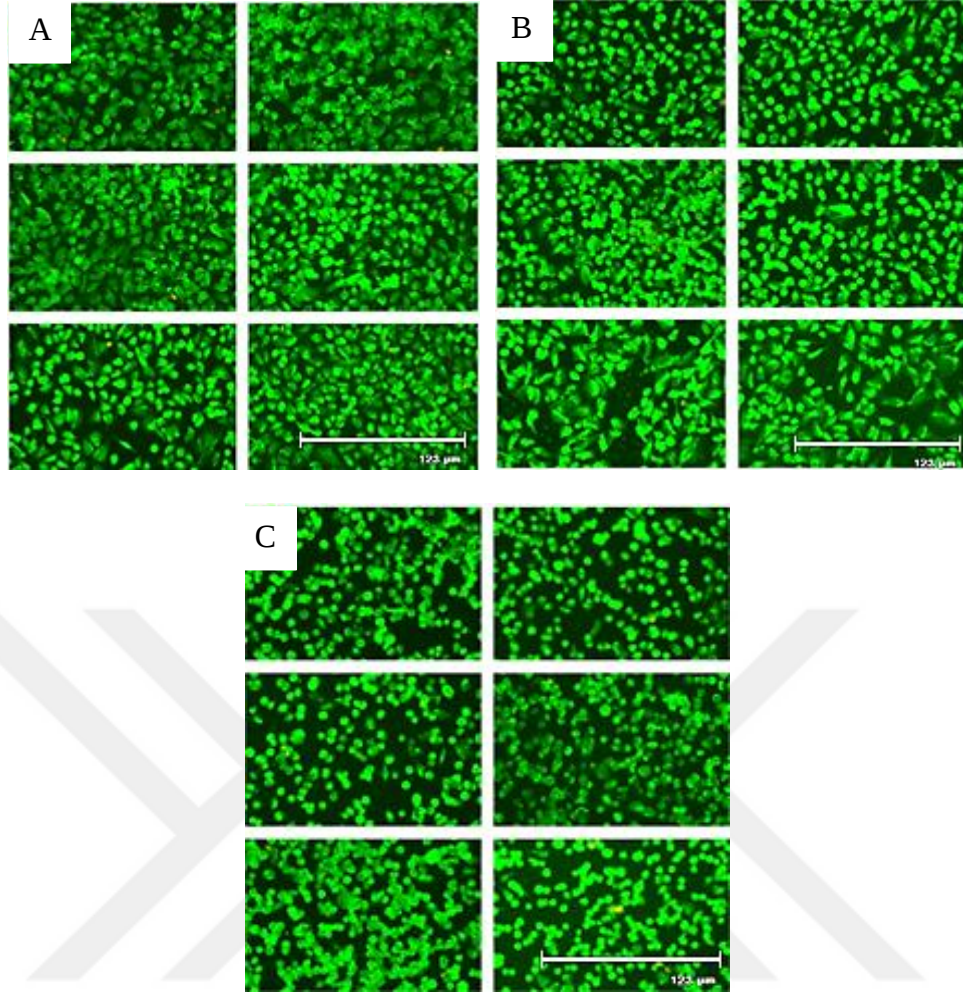
HaCaT hücreleri TLR-2 ve PAR-2 reseptörlerinin bloklanması amacıyla ilk aşamada Et/Br Kalsein AM boyaması yapılarak uygun blokan konsantrasyonu seçilmiş ve sonraki aşamada seçilen blokan konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki sitotoksik etkinin gösterilmesi amacıyla da MTT deneyleri gerçekleştirilmiştir.

4.1.3.1. C29 Blokanı

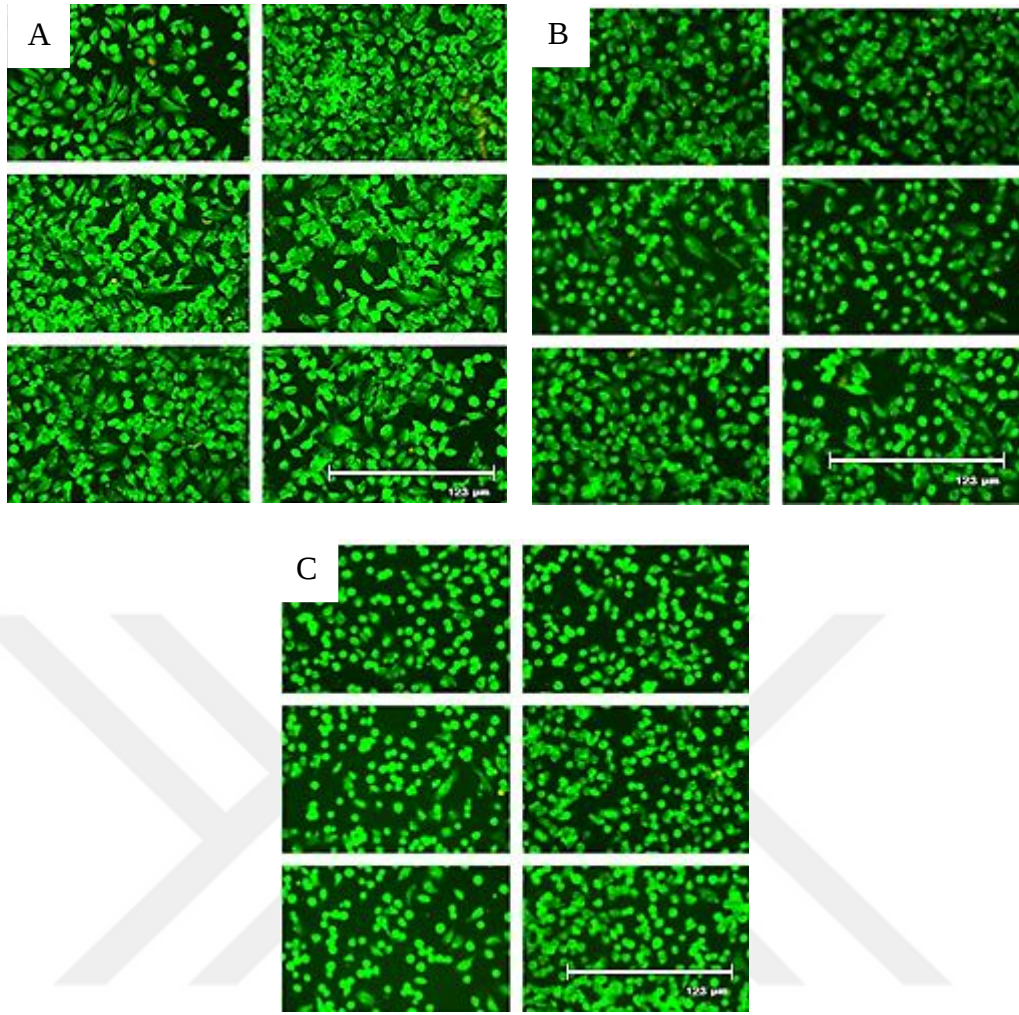
1 ve 2 saat boyunca blokanların kullanılmadığı (Şekil 4.5), 1 saat boyunca (Şekil 4.6) ve 2 saat boyunca (Şekil 4.7) C29 blokanı ile 3 farklı konsantrasyonda bloklamanın gerçekleştirildiği HaCaT hücrelerinin canlı/ölü hücre boyama sonuçları elde edilmiştir.



Şekil 4.5 Blokanın kullanılmadığı HaCaT hücrelerinin (A) 1 ve (B) 2 saatlik canlı (yeşil) / ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 μm.



Şekil 4.6 C29 blokanı ile (A) 50, (B) 100 ve (C) 150 μM konsantrasyonda 1 saat boyunca bloke edilen HaCaT hücrelerinin canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 μm .

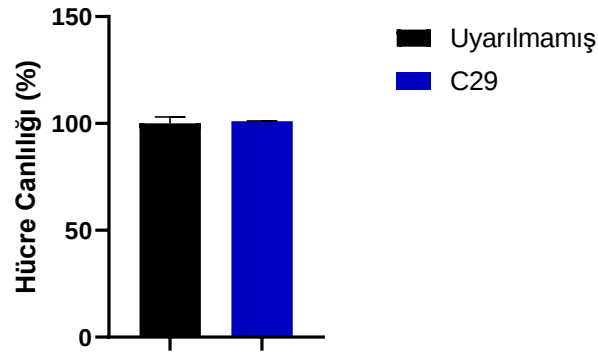


Şekil 4.7 C29 blokanı ile (A) 50, (B) 100 ve (C) 150 μM konsantrasyonda 2 saat boyunca bloke edilen HaCaT hücrelerinin canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 μm .

1 ve 2 saat boyunca 50, 100 ve 150 μM C29 blokanı ile gerçekleştirilen bloklama sonrasında süre ve konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre morfolojisinin değişime uğradığı ve hücre yoğunluğunda azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda **C29 için 1 saat ve 100 μM konsantrasyonunun kullanılması**na karar verilmiştir.

Seçilen konsantrasyondaki C29 blokanının hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi MTT deneyi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8).

HaCaT - C29

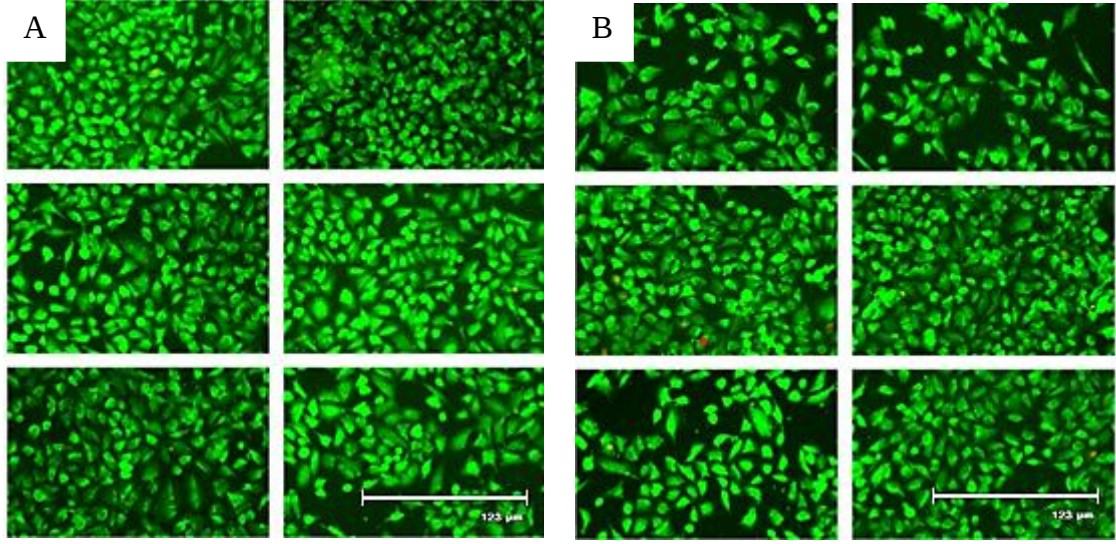


Şekil 4.8 1 saat boyunca 100 μ M konsantrasyonda C29 ile bloklanan HaCaT hücrelerinin canlılık sonucu, n=3.

Gerçekleştirilen MTT deneyi sonucunda seçilen konsantrasyondaki C29 blokanının HaCaT hücreleri üzerinde letal bir etkiye neden olmadığı tespit edilmiştir.

4.1.3.2. SAM11 Antikoru

2 saat boyunca SAM11 monoklonal antikoru ile PAR-2 reseptörünün bloklandığı (Şekil 4.9) HaCaT hücrelerinin canlı/ölü hücre boyama sonuçları elde edilmiştir.

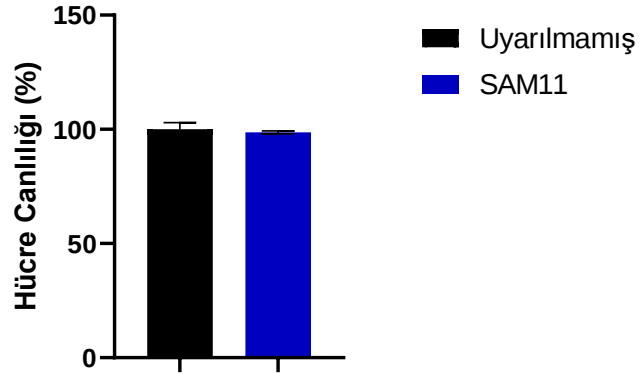


Şekil 4.9 SAM-11 ile (A) 20 ve (B) 25 µg/mL konsantrasyonda 2 saat bloke edilen HaCaT hücrelerinin canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 µm.

Literatürde epitel hücreler için ve laboratuvarında daha önceden gerçekleştirilen deneylerde kullanılan bloklama süresi olan 2 saat boyunca 20 ve 25 µg/mL SAM11 monoklonal antikoru ile gerçekleştirilen bloklama sonrasında C29 blokanına benzer bir şekilde artan konsantrasyona bağlı olarak hücre yoğunluğunda azalma meydana geldiği tespit edilmiştir [132, 133]. SAM11 için 2 saat ve 20 µg/mL konsantrasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Seçilen konsantrasyondaki SAM11 antikorunun hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi MTT deneyi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10).

HaCaT - SAM11

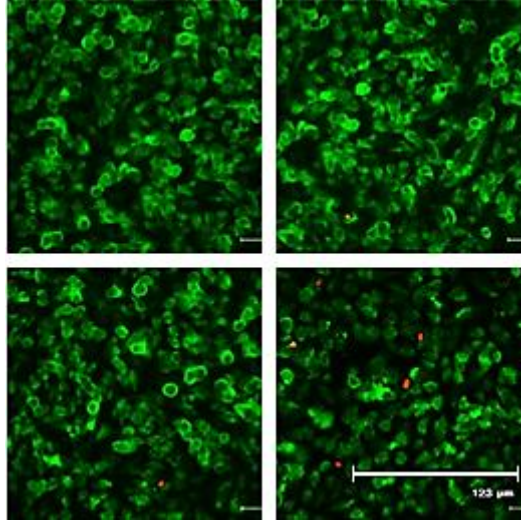


Şekil 4.10 2 saat boyunca 20 µg/mL konsantrasyonda SAM11 ile bloklanan HaCaT hücrelerinin canlılık sonucu, n=3.

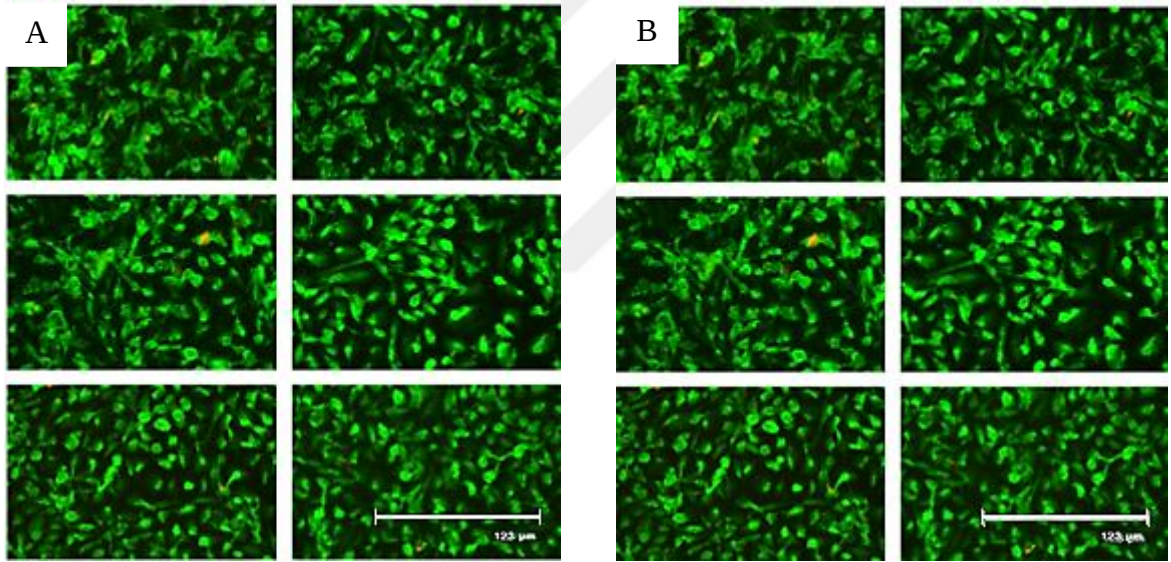
Gerçekleştirilen MTT deneyi sonucunda seçilen konsantrasyondaki SAM11 antikorunun HaCaT hücre canlılığını etkilemediği tespit edilmiştir.

4.1.3.3. SsnB Blokanı

24 saat boyunca hiçbir blokanın kullanılmadığı (Şekil 4.11) ve SsnB blokanı ile 2 farklı konsantrasyonda bloklamanın gerçekleştirildiği (Şekil 4.12) HaCaT hücrelerinin canlı/ölü hücre boyama sonuçları elde edilmiştir.



Şekil 4.11 Herhangi bir blokanın kullanılmadığı HaCaT hücrelerinin 24 saatlik canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 μm .

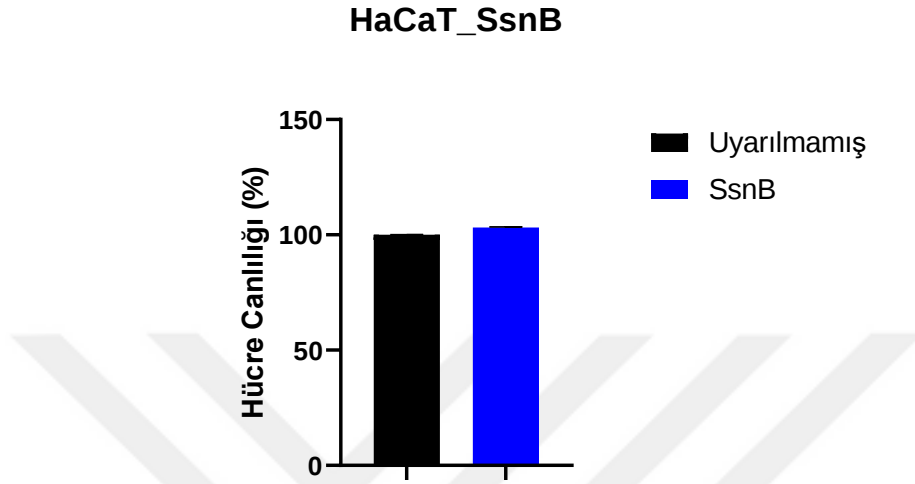


Şekil 4.12 SsnB ile (A) 50 ve (B) 100 μM konsantrasyonda 24 saat bloke edilen HaCaT hücrelerinin canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 μm .

SsnB blokanı ile 24 saat boyunca 50 ve 100 μM konsantrasyonda HaCaT hücrelerinin TLR-2 reseptörünün bloke edilmesi sonucunda konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre morfolojilerinin bozulduğu ve hücre yoğunluk oranında azalma meydana geldiğini

gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda SsnB için 24 saat ve 50 μ M konsantrasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Seçilen konsantrasyondaki SsnB blokanının HaCaT hücre canlılığına etkisi MTT deneyi gerçekleştirilerek gösterilmiştir (Şekil 4.13).

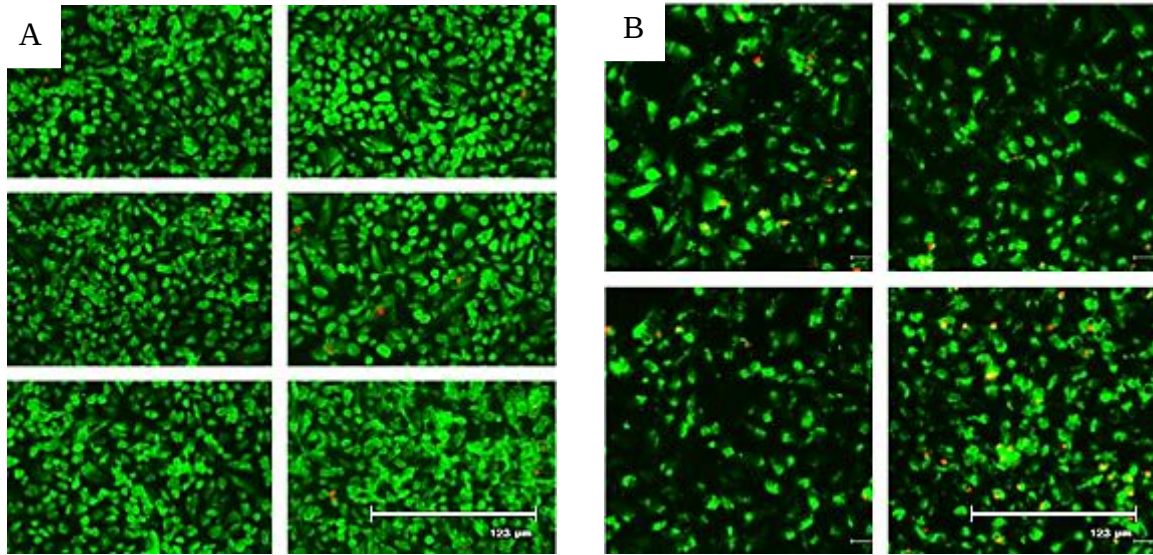


Şekil 4.13 24 saat boyunca 50 μ M konsantrasyonda SsnB ile bloklanan HaCaT hücrelerinin canlılık sonucu, n=3.

Gerçekleştirilen MTT deneyi sonucunda seçilen konsantrasyondaki SsnB blokanının HaCaT hücre canlılığını azaltmadığı gibi hücre canlılığını az da arttırdığı tespit edilmiştir.

4.1.3.4. MyD88 İnhibitör Peptit

24 saat boyunca MyD88 inhibitör peptit ile 2 farklı konsantrasyonda bloklamanın gerçekleştirildiği (Şekil 4.14) HaCaT hücrelerinin canlı/ölü hücre boyama sonuçları elde edilmiştir.

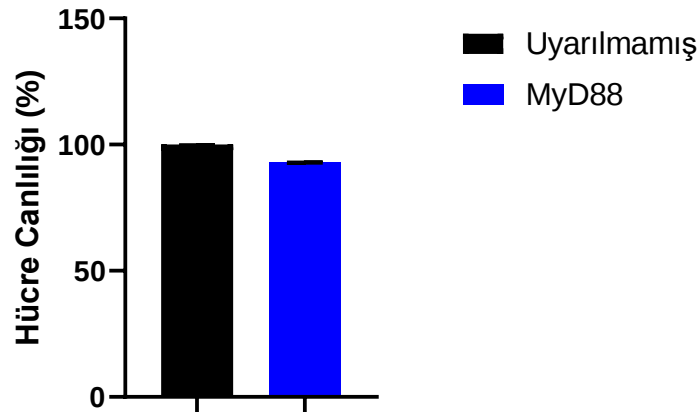


Şekil 4.14 MyD88 ile (A) 50 ve (B) 100 μ M konsantrasyonda 24 saat bloke edilen HaCaT hücrelerinin canlı(yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 123 μ m.

HaCaT hücrelerinin MyD88 inhibitör peptit ile yapılan 24 saatlik 50 ve 100 μ M konsantrasyonlardaki bloklama sonucunda konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre yoğunluk oranında azalma meydana geldiğini gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda MyD88 inhibitör peptit için 24 saat ve 50 μ M konsantrasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Seçilen MyD88 inhibitör peptitinin HaCaT hücre canlılığına etkisi MTT deneyi gerçekleştirilerek gösterilmiştir (Şekil 4.15).

HaCaT_MyD88



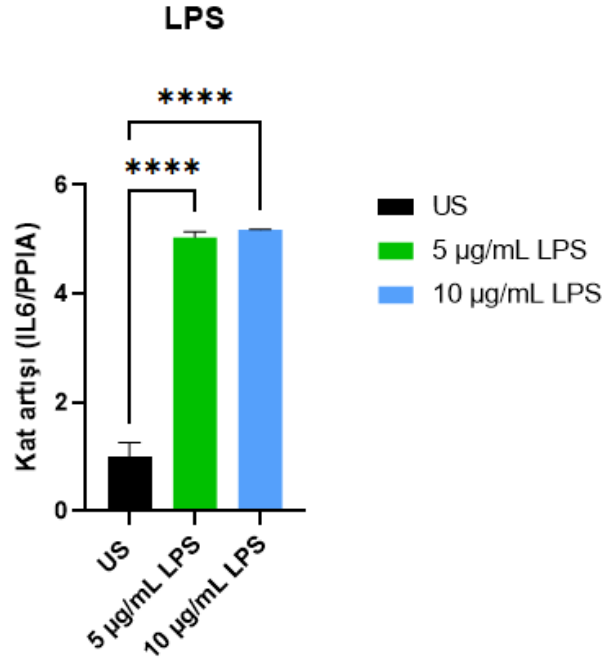
Şekil 4.15 24 saat boyunca 50 μ M konsantrasyonda MyD88 inhibitör peptit ile bloklanan HaCaT hücrelerinin canlılık sonucu, n=3.

Yapılan MTT deneyi sonucunda seçilen konsantrasyondaki MyD88 inhibitör peptitinin HaCaT hücre canlılığında %10 kadar bir azaltmaya neden olduğu ancak letal bir tepkiye yol açmadığı tespit edilmiştir.

4.2. Deney Koşullarının Belirlenmesi

4.2.1. Uygun Reseptör Blokanının Seçilmesi

Yapılan seçimler sonrasında TLR-2 reseptör blokan etkinliğini kontrol etmek amacıyla hücrelerdeki IL-6 gen seviyesinin gerçek zamanlı PZR yöntemi ile tespit edilmesine karar verilmiştir. TLR-2 reseptör aktivatörü olarak LPS kullanılmıştır. HaCaT hücreleri için uygun LPS konsantrasyonunu belirlemek amacıyla literatür araştırması yapılmış ve HaCaT hücrelerinin 5 μ g/mL ve 10 μ g/mL LPS konsantrasyonları ile uyarılmasına karar verilmiştir [91]. LPS ile yapılan 24 saatlik uyarım sonrasında IL-6 gen ifadesine bakılmıştır (Şekil 4.16).

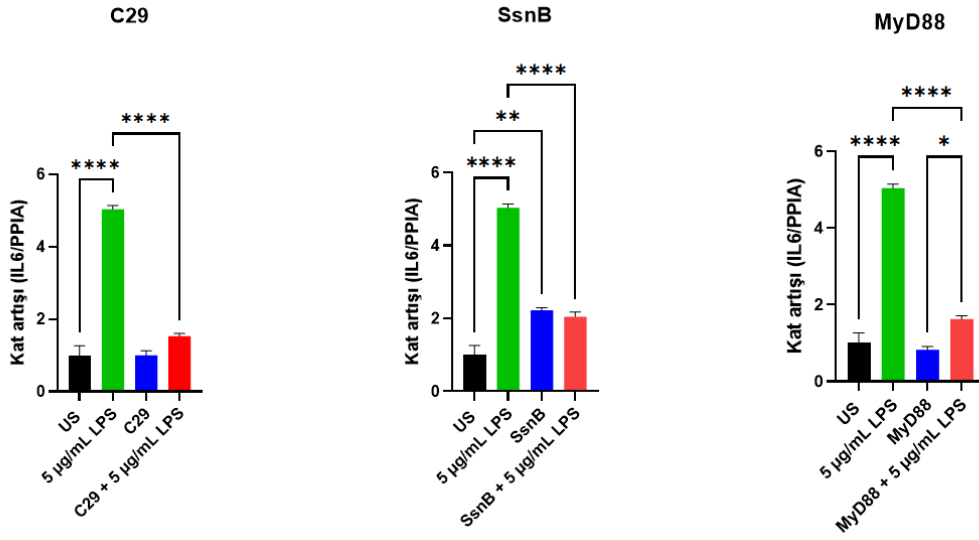


Şekil 4.16 5 ve 10 µg/mL LPS ile 24 saat boyunca uyarılan HaCaT hücrelerinin IL-6 seviyesi; n=3; LPS: Lipopolisakkarit, US: Uyarılmamış; ****p<0,0001.

2 farklı konsantrasyondaki (5 ve 10 µg/mL) LPS ile 24 saat uyarılan HaCaT hücrelerinde IL-6 seviyesi her 2 koşulda da 5 kata yakın artış göstermiştir (p<0,0001). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda blokan deneyleri sırasında TLR-2 aktivatörü olarak kullanılacak olan LPS konsantrasyonunun 5 µg/mL olmasına karar verilmiştir.

TLR-2 reseptör blokanları deneyleri için HaCaT hücre hattı 24-kuyucuklu plakaya 2,5x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler %80 kaplama oranına ulaştıklarında belirlenen blokan konsantrasyonları ile TLR-2 reseptör bloklaması gerçekleştirilmiştir. Reseptör aktivasyonu için 5 µg/mL LPS kullanılmıştır.

Blokanlar ile bloke edilen reseptörlerin kontrolü IL-6 seviyesinin hem gerçek-zamanlı PZR hem de ELISA deneyleri yapılarak incelenmiştir.

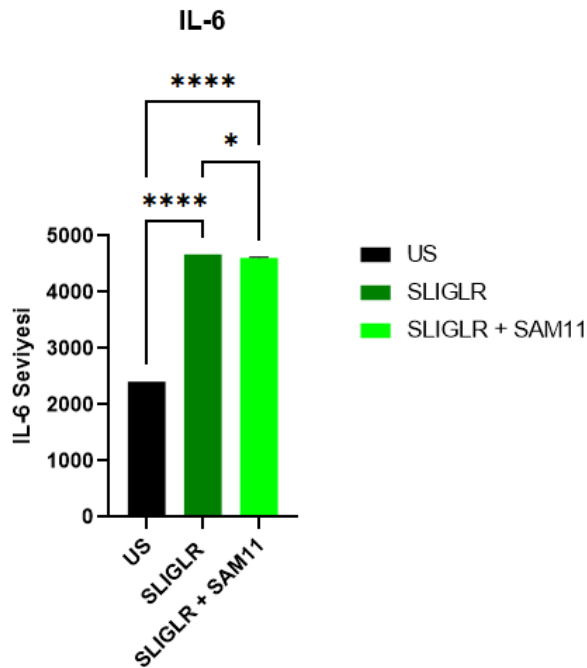


Şekil 4.17 Belirlenen konsantrasyonlarda HaCaT hücrelerinin hem blokan hem de LPS ile uyarımı sonucunda elde edilen IL-6 profilleri; n=3; LPS: Lipopolisakkarit, US: Uyarılmamış; *p>0,5, **p<0,01, ****p<0,0001.

Yapılan gerçek-zamanlı PZR deneyleri sonucunda, LPS ile uyarım yapılan hücrelerde IL-6 seviyesinin 5 katlık bir artış gösterdiği gözlenmiştir ($p<0,0001$). SsnB blokanının kullanıldığı koşulda uyarılmamış koşula göre artış gözlenmesine rağmen LPS uyarımı ile artan IL-6 seviyesine 2 kata indirdiği gözlenmiştir (sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,0001$). C29 blokanının kendi başına IL-6 gen ifadesine bir etkisi olmadığı görülmüştür. C29 ile bloklama sonrasında 5 µg/mL LPS ile yapılan uyarımın IL-6 seviyesini azaltmadığı ve sadece LPS uyarımı yapılan koşulla kıyaslandığında neredeyse bazal seviyeye geri çektiği görülmüştür ($p<0,0001$). MyD88 blokanı, kendi başına kullanıldığında IL-6 seviyesini değiştirmemiştir. LPS ile beraber kullanıldığı koşulda ise 2 kata yakın IL-6 gen ifadesi artışı gözlenmesine rağmen sadece LPS ile uyarım yapılan koşulla kıyaslandığında blokanın IL-6 gen ifadesini baskıladığı görülmektedir (sırasıyla $p<0,5$ ve $p<0,0001$).

Gerçekleştirilen deneyler sonucunda HaCaT hücrelerinin TLR-2 reseptörünü bloklamak amacıyla C29 blokanın 150 μ M konsantrasyonda 2 saat, SsnB blokanının ise 100 μ M konsantrasyonda 24 saat boyunca kullanılmasına karar verilmiştir.

PAR-2 reseptör blokanı olan SAM11 için ise IL-6 seviyesi ELISA yapılarak incelenmiştir. PAR-2 reseptörünün aktivatörü olan SLIGLR peptidi, laboratuvarımızda daha önceden yapılan deneylerde kullanılan 100 μ M konsantrasyonda 24 saat boyunca uyarılmıştır. Ardından bloklamanın kontrolü için ELISA yöntemi kullanılarak IL-6 seviyesi incelenmiştir (Şekil 4.18).

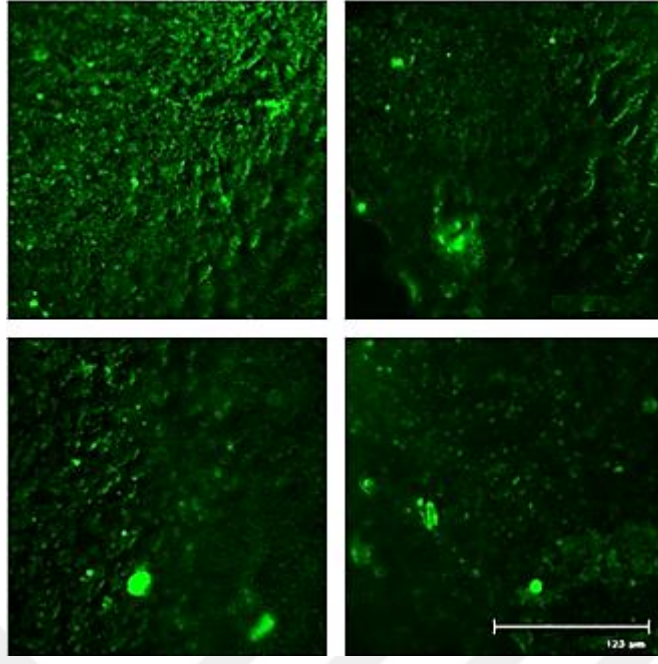


Şekil 4.18: HaCaT hücre hattının SLIGLR PAR-2 aktivatör peptit ve SAM11 blokanı ile PAR-2 reseptörünün bloklanması sonucunda elde edilen IL-6 seviyeleri; n=2, US: Uyarılmamış, *p<0,05,****p<0,0001.

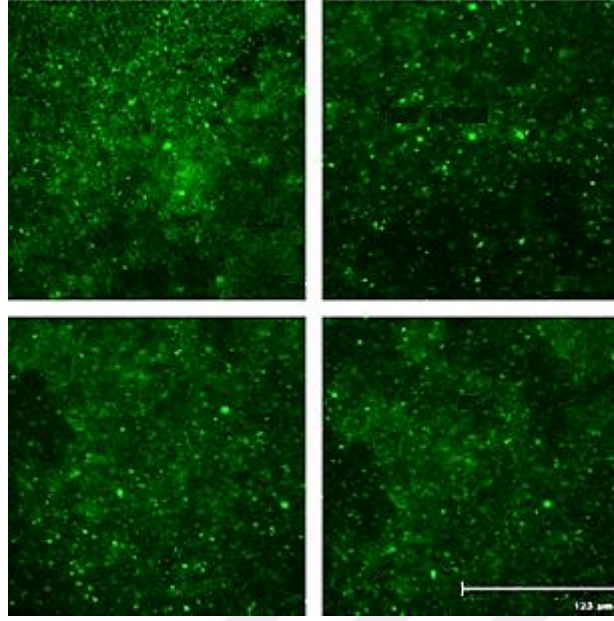
Hücre dışına salınan IL-6 seviyesinin PAR-2 aktivatör peptidi olan SLIGRL peptidinin kullanıldığı koşulda arttığı gözlenmiştir ($p<0,0001$). Ancak SLIGLR ile 20 µg/mL konsantrasyondaki PAR-2 inhibitörü olan SAM11 antikorunun beraber bulunduğu koşulda da IL-6 seviyesinin sadece aktivatör peptidin kullanıldığı koşulla kıyaslandığında çok düşük bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Proje kapsamında yaptığımız canlı/ölü hücre boyama deneylerinde 25 µg/mL SAM11 konsantrasyonunun hücreleri öldürdüğü görülmüştür. Kullanılacak SAM11 konsantrasyonunun arttırılması sonucunda gerçekleşecek hücre ölümüne bağlı olarak deney sonuçlarının etkilenebileceği göz önünde bulundurulmuştur. Bu nedenle yapılacak deneylerde sadece TLR-2 reseptör blokanlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2.2. HaCaT hücrelerinin farklılaştırılması

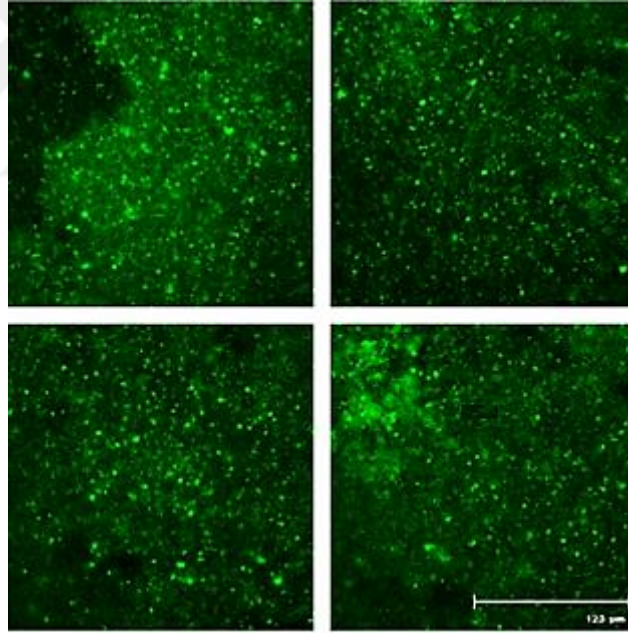
7 gün boyunca farklılaştırılan HaCaT hücrelerinin farklılaşma kontrolü K1 protein ifadesinin IF boyama yoluyla incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Hücreler arasındaki K1 protein ifadesinin değişimini belirlemek amacıyla HaCaT'lar, 1- Düşük kalsiyum içeren DMEM ile hem apikal hem de bazal kısımdan beslenen HaCaT'lar (Şekil 4.19), 2- Düşük kalsiyum içeren DMEM ile apikal kısımdan beslenen HaCaT'lar (Şekil 4.20) ve 3- Yüksek kalsiyum içeren DMEM ile apikal kısımdan beslenen HaCaT'lar (Şekil 4.21) olacak şekilde 3 farklı koşulda ekilmiştir. HaCaT hücrelerinin K1 protein ifadesi sonuçları IF boyama ile elde edilmiştir. Boyama sonucunda elde edilen görüntülerin istatistiksel analizi ImageJ programı ile yapılmıştır (Şekil 4.22).



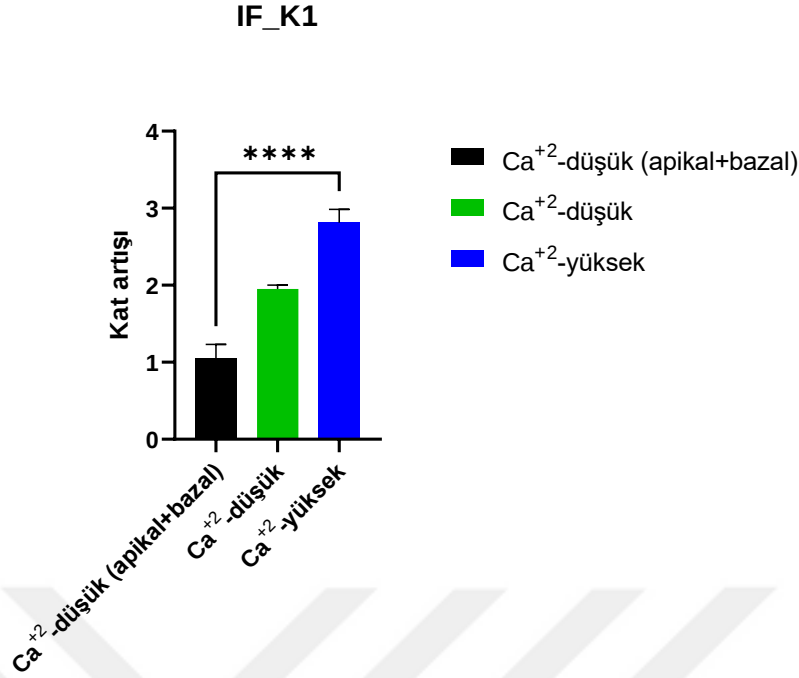
Şekil 4.19 Düşük kalsiyum içeren DMEM ile hem apikal hem de bazal kısımdan beslenen HaCaT'ların K1 protein ifadesinin hücre boyama fotoğrafları, 20 X, bar 123 μm .



Şekil 4.20 Düşük kalsiyum içeren DMEM ile apikal kısımdan beslenen HaCaT'ların K1 protein ifadesinin hücre boyama fotoğrafları, 20 X, bar 123 μm .



Şekil 4.21 Yüksek kalsiyum içeren DMEM ile apikal kısımdan beslenen HaCaT'ların K1 protein ifadesinin hücre boyama fotoğrafları, 20 X, bar 123 μm .

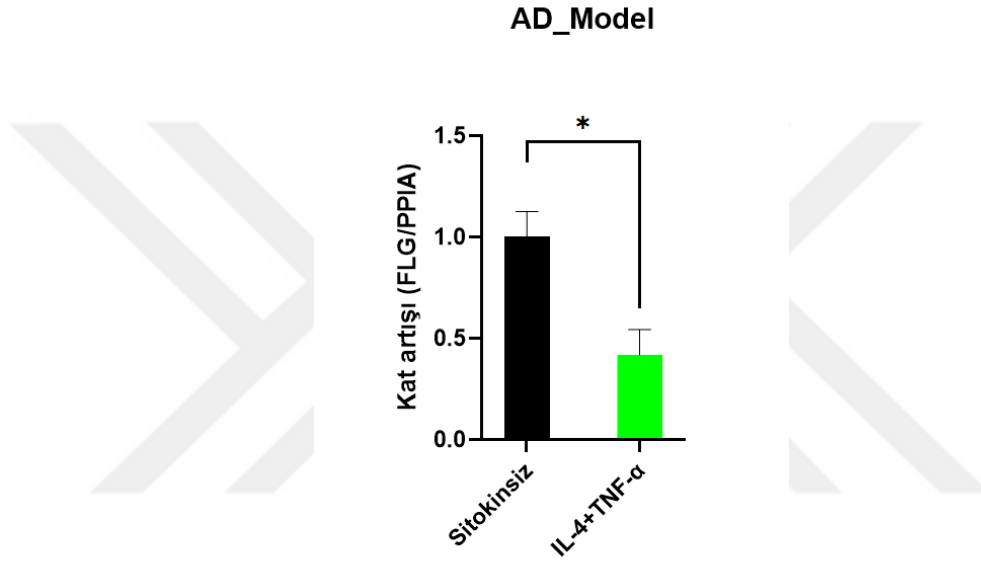


Şekil 4.22 Farklı koşullarda ekilen HaCaT hücrelerinin IF boyama sonucunda elde edilen K1 protein ifadeleri, n=4, ****p<0,0001.

HaCaT hücrelerinin IF boyama görüntülerinden elde edilen K1 protein ifadesi ImageJ programı aracılığıyla şu şekilde belirlenmiştir; her koşul için çekilen tüm görüntülerde K1 protein ifadesi (ışık yapan yeşil bölgeler) bütün görüntülerin alındığı bölgelerdeki hücre popülasyonundaki ortalama K1 protein ifadesinin oranına göre yapılmıştır ve çekilen görüntülerdeki hücre yoğunluğu içerisinde ifade olan protein seviyesine göre ImageJ programıyla matematiksel olarak uyarlanmıştır. Kurulan deney düzeneğinde hem apikal hem de bazal kısımdan düşük kalsiyum içeren besiyerinde büyütülen hücrelere göre kıyaslama yapılmıştır. Hem görüntülerde hem de istatistiksel olarak görüldüğü gibi K1 protein ifadesi diğer koşullarda artış göstermektedir (Şekil 4.22). Bu sonuçlar doğrultusunda artan K1 protein ifadesi, literatürde HaCaT hücrelerinin düşük kalsiyum içeren besiyerinden yüksek kalsiyum içeren besiyerine geçişi (farklılaşması) sonucu elde edilen K1 protein ifadesiyle uyusmaktadır [105]. Bunun yanı sıra düşük kalsiyum içeren besiyerinde büyütülen hücrelerdeki K1 protein ifadesindeki artış da literatürde belirtildiği üzere hücre yoğunluğunun çok fazla olmasından kaynaklanmaktadır [134].

4.2.3.AD Modeli

Başarılı bir şekilde farklılaştırılan HaCaT hücre hattı AD modelinin oluşturulması için farklılaştırmanın son günü (7.gün) IL-4 ve TNF- α ile literatürde belirtildiği şekilde 24 saat boyunca uyarılmıştır [114]. HaCaT hücrelerinin AD-modelinin kontrolü FLG gen ifadesi incelenerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 AD-benzeri model oluşturulan HaCaT hücrelerinin gerçek zamanlı PZR deneyi sonucunda elde edilen FLG gen ifadesi, n=3, *p<0,05.

FLG gen ifadesinin karşılaştırmasının yapılması amacıyla HaCaT hücreleri transwell'lere herhangi bir sitokinle uyarılmamış HaCaT'lar ve IL-4 ile TNF- α uyarılan HaCaT'lar (AD-benzeri model) olmak üzere 2 farklı koşullarda ekilmiştir. Gerçek zamanlı PZR deneyi sonucunda elde edilen sonuçlar literatürde AD-benzeri model oluşturulan HaCaT'lar için belirtilen FLG gen ifadesindeki düşüş ile uyushmaktadır [114].

4.2.4. Uyarım Sisteminin Oluşturulması

24-kuyucuklu plakalara ekilen HaCaT hücreleri %100 kaplama yoğunluğuna ulaştığında 1 hafta boyunca farklılaştırmaya alınmıştır. Yapılan deneylerde karşılaştırma ve verimli sonuç almak adına;

1. “AD Model Grubu” ve “AD Olmayan Model Grubu” olacak şekilde 2 temel grup oluşturulmasına,
2. HaCaT’ların hem mono-kültür olarak hem de Eol-1 hücre hattı ile ko-kültür durumundaki cevaplarının incelenmesine,
3. MTT deney sonuçlarına göre 12 ve 24 saatlik uyarımların gerçekleştirilmesine ve süreye bağlı olarak gen ifadelerindeki değişikliklerin tespitine,
4. CaCO₃ konsantrasyonlarının ‘sert su’ seviyesindeki 2 farklı doz olan 180 ve 200 mg/L konsantrasyonlarda uyarım yapılmasına ve
5. Gerçekleştirilen deneyler ile tespit edilen uygun doz ve sürelerde C29 ve SsnB blokanlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

Deneylerde oluşturulan deney düzeneği çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen doz süre belirleme deneyleri sonucunda kararlaştırılan deney düzeneği.

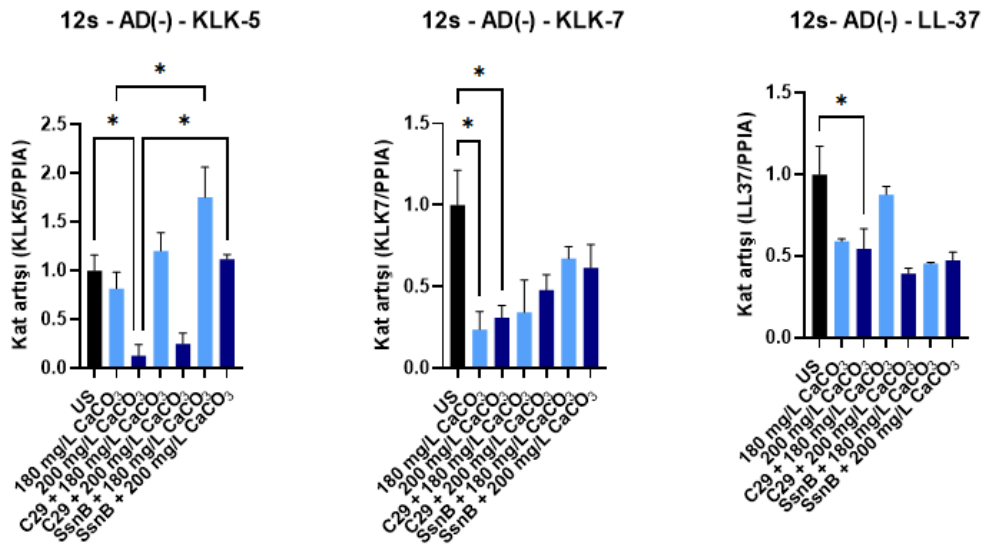
	AD Model Grubu	AD Olmayan Model Grubu
Mono-kültür	Uyarılmamış (US)	Uyarılmamış (US)
	180 mg/L CaCO ₃	180 mg/L CaCO ₃
	200 mg/L CaCO ₃	200 mg/L CaCO ₃
	C29 + 180 mg/L CaCO ₃	C29 + 180 mg/L CaCO ₃
	C29 + 200 mg/L CaCO ₃	C29 + 200 mg/L CaCO ₃
	SsnB + 180 mg/L CaCO ₃	SsnB + 180 mg/L CaCO ₃
	SsnB + 200 mg/L CaCO ₃	SsnB + 200 mg/L CaCO ₃
Ko-kültür	Uyarılmamış (US)	Uyarılmamış (US)
	180 mg/L CaCO ₃	180 mg/L CaCO ₃
	200 mg/L CaCO ₃	200 mg/L CaCO ₃
	C29 + 180 mg/L CaCO ₃	C29 + 180 mg/L CaCO ₃
	C29 + 200 mg/L CaCO ₃	C29 + 200 mg/L CaCO ₃
	SsnB + 180 mg/L CaCO ₃	SsnB + 180 mg/L CaCO ₃
	SsnB + 200 mg/L CaCO ₃	SsnB + 200 mg/L CaCO ₃

4.3. Sert Suyun KLK-5, KLK-7 ve LL-37 genleri/proteinleri üzerindeki etkilerinin gerçek-zamanlı PZR ve ELISA deneyleri ile incelenmesi

4.3.1. Gerçek-zamanlı PZR Sonuçları

4.3.1.1. HaCaT ALI Kültür Sonuçları

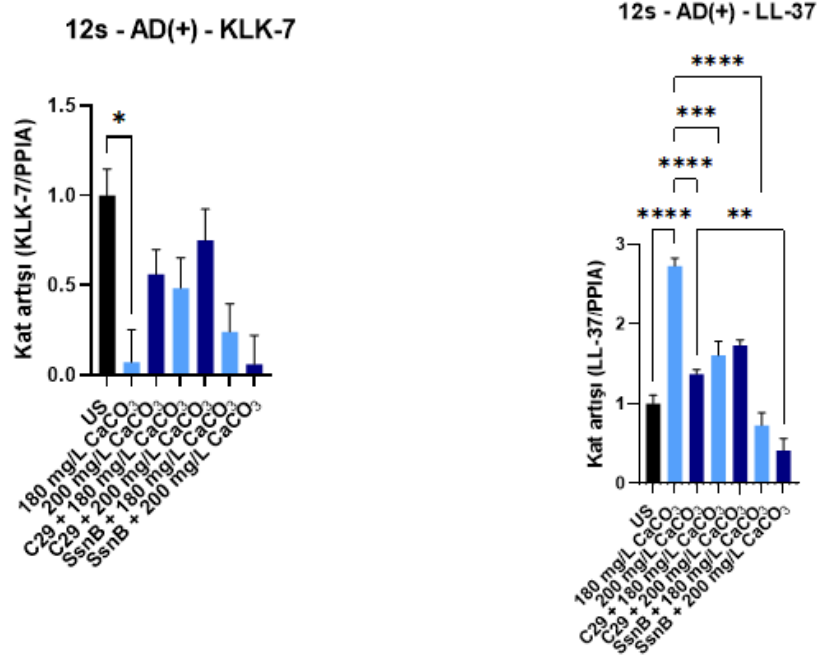
HaCaT hücre hattı üzerinde CaCO_3 'ün KLK-5 ve KLK-7 ile LL-37 üzerindeki etkisinin incelenmesi ve farklı TLR-2 reseptör blokanları kullanılarak CaCO_3 'ün potansiyel etkisinin araştırılması amacıyla 12 ve 24 saatlik uyarımlar gerçekleştirilmiştir. AD-benzeri model ile kıyaslama yapmak amacıyla AD-model kurulmadan da uyarımlar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.24 12 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5, KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

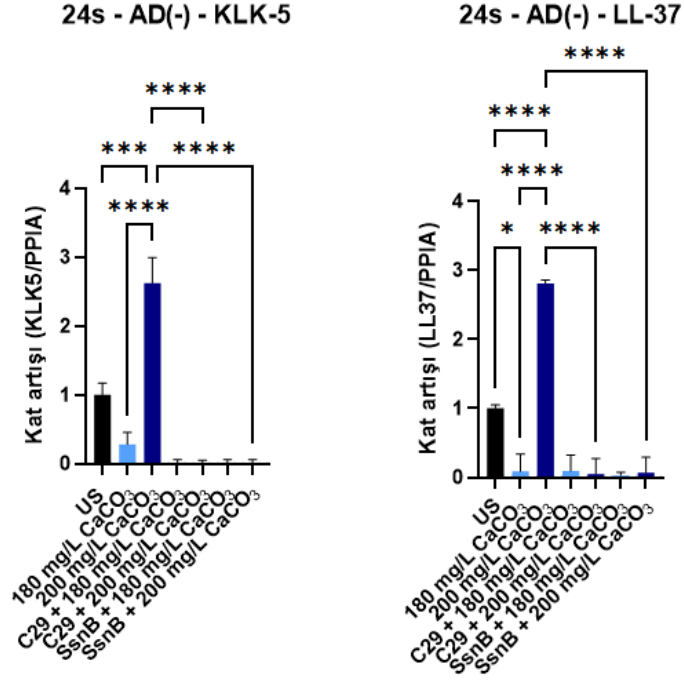
12 saat sonunda 180 mg/L CaCO_3 uyarımı KLK-5 gen ifade seviyesini değiştirmezken 200 mg/L konsantrasyonunda CaCO_3 ile uyarım KLK-5 gen ifadesinde azalmaya neden olmuştur (p<0,05). TRAP inhibitörü olan C29, CaCO_3 -aracılı değişimlerde önemli bir değişikliğe neden olmasa da C29 ile bloklama 200 mg/L CaCO_3 uyarımında KLK-5 seviyesindeki düşüşü bazal seviyeye yaklaştırmıştır. TLR-2 reseptör blokani SsnB ise, 180 mg/L ve 200

mg/L olmak üzere her iki konsantrasyonda da KLK-5 seviyesinde tek başına CaCO_3 uyarımlarına kıyasla artışa yol açmıştır ($p<0,05$). Diğer yandan, her iki CaCO_3 konsantrasyonu da uyarılmamış koşula kıyasla KLK-7 gen ifadesinde düşüşe yol açmıştır ($p<0,05$). Ancak, bu düşüş C29 ve SsnB blokanları ile bazal seviyeye çekilmiştir. LL-37 gen ifadesinde ise uyarana bağlı anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 4.24).



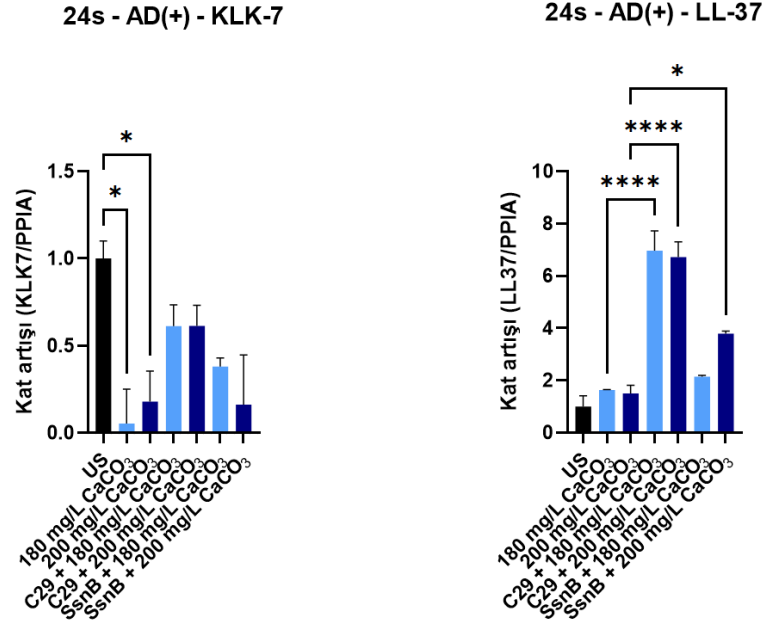
Şekil 4.25 12 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-7 ve LL-37 gen profilleri; n=3, US: Uyarılmamış, * $p<0,05$.

AD modeli oluşturulan keratinosit hücrelerinde KLK-5 ifadesine bakılmış ancak gerçek zamanlı PZR deneyleri ile elde edilen sonuçlarda C_T (Eşik değeri, Cycle of Threshold) değerinin 34'ün üstünde olduğu görülmüştür. Bu nedenle KLK-5 gen ifadesi analizlere dahil edilmemiştir [135]. 180 mg/L CaCO_3 ile uyarımın, KLK-7 gen ifadesini azalttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). C29 ve SsnB blokanları kullanımı sonrasında KLK-7 gen ifadesi bazal değere yaklaşmıştır. 200 mg/L CaCO_3 ile uyarım sonrasında ise gen ifadesinin istatistiksel olarak değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.26 24 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO₃ ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5, ve LL-37 gen profilleri; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

HaCaT hücrelerinin AD-model kurulmadan 24 saat boyunca 200 mg/L CaCO₃ ile uyarılması sonucunda hem KLK-7 hem de LL-37 gen düzeylerinde yaklaşık 2,5 kat artış meydana gelmiştir. 200 mg/L konsantrasyon ile artan bu gen ifadeleri ortama eklenen TLR-2 reseptör blokanları ile bazal seviyenin de altına gerilemiştir. Bir diğer ‘sert su’ konsantrasyonu olan 180 mg/L CaCO₃ ise HaCaT hücrelerinden sentezlenen KLK-5 ve LL-37 gen düzeylerinde düşüşe yol açtığı tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR deneyleri ile elde edilen sonuçlarda KLK-7 gen ifadesi kabul edilen C_T değerinin üzerinde çıktığı için analizlere dahil edilmemiştir [135].



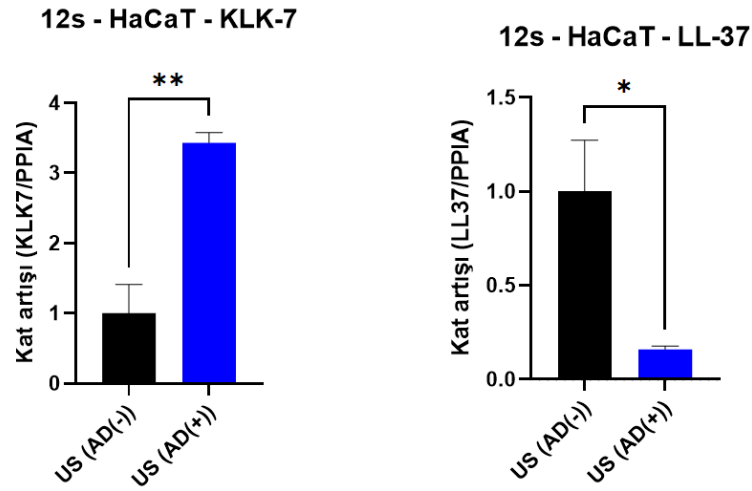
Şekil 4.27: 24 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO₃ ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-7 ve LL-37 gen profilleri; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001.

AD modeli oluşturulan keratinosit hücrelerinde KLK-5 ifadesine bakılmış ancak gerçek zamanlı PZR deneyleri ile elde edilen sonuçlarda CT (Eşik değeri, Cycle of Threshold) değerinin 34'ün üstünde olduğu görülmüştür. Bu nedenle KLK-5 gen ifadesi analizlere dahil edilmemiştir [135]. 24 saat sonunda AD modelinde her iki CaCO₃ konsantrasyonu ile uyarım sonucunda KLK-7 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (p<0,05). C29 blokanının kullanıldığı koşullarda KLK-7 gen ifadesinin bazal seviyeye yaklaştığı görülmüştür. SsnB blokanı kullanımı sonrasında görülen KLK-7 gen ifadesi, kireçli su konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir (Şekil 4.27).

Çizelge 4.2 Gerçek-zamanlı PZR deneyleri sonucunda HaCaT hücrelerinde değişen gen profilleri.

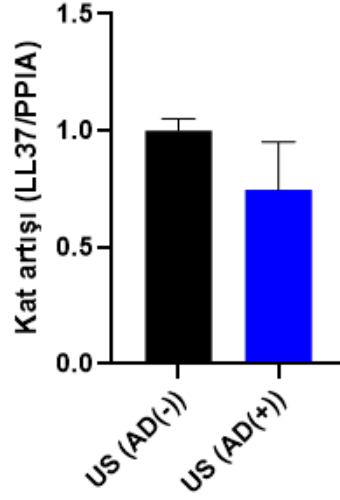
	12-Saat					24-Saat			
	AD (-)			AD(+)		AD (-)		AD(+)	
	KLK-5	KLK-7	LL-37	KLK-7	LL-37	KLK-5	LL-37	KLK-7	LL-37
180 mg/L CaCO ₃	↔	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↑
200 mg/L CaCO ₃	↓	↓	↓	↓	↔	↑	↑	↓	↑
C29+180 mg/L CaCO ₃	↔	↓	↔	↓	↑	↓	↓	↓	↑
C29+200 mg/L CaCO ₃	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↑
SsnB+180 mg/L CaCO ₃	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑
SsnB+200 mg/L CaCO ₃	↔	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑

Mono kültüre edilen HaCaT hücrelerinden CaCO₃ uyarımı sonrası değişen gen profillerine ek olarak AD modelinin kurulması sonrası ilgili genlerin profilleri herhangi bir CaCO₃ uyarımı gerçekleştirilmeden incelenmiştir. Gerçek-zamanlı PZR ile yapılan deneylerde C_T değeri kabul edilebilir aralıkta olan genlerin profilleri incelenmiştir (Şekil 4.27 ve Şekil 4.28).



Şekil 4.27 Mono-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde 12 saatlik IL-4 ve TNF- α ile uyarımı sonucunda değişen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01.

24s - HaCaT - LL-37

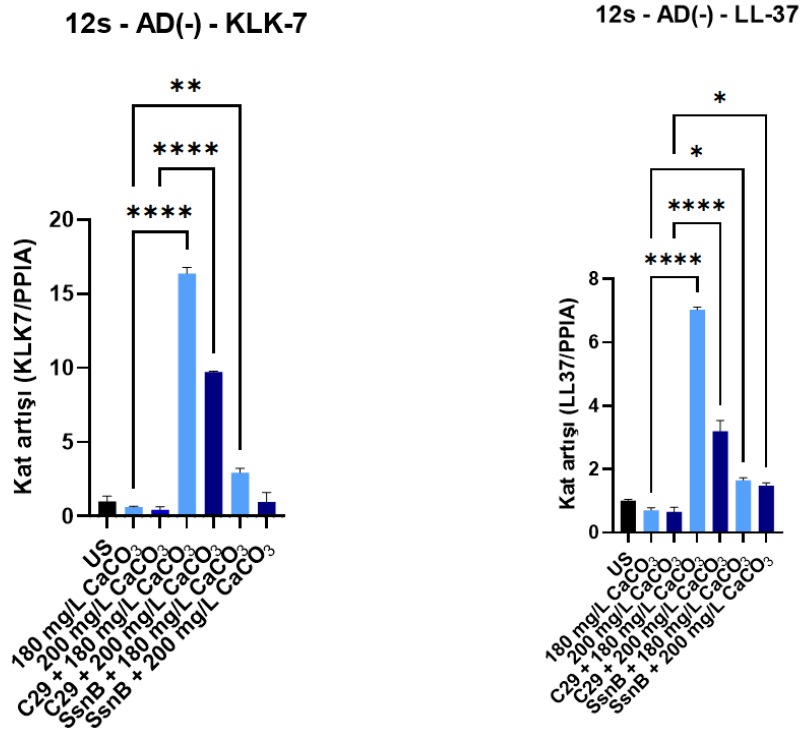


Şekil 4.28 Mono-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde 24 saatlik IL-4 ve TNF- α ile uyarımı sonucunda değişen LL-37 gen ifadesi; n=3, US: Uyarılmamış.

12 saatlik IL-4 ve TNF- α ile HaCaT hücrelerinin uyarılması sonucunda KLK-7 seviyesinde 3 kattan fazla bir artış meydana gelmiştir. 12 saatlik uyarım sonucu artan KLK-7 ifadesi literatürde hem AD durumunda hem de *in vivo* ortamda yapılan ve dışarıdan IL-4 ilave edilmesi sonucu artış gösteren KLK-7 sonuçlarıyla örtüşmektedir [136, 137]. LL-37 seviyesi 12 saatlik uyarımda düşüş gösterirken 24 saatlik uyarım sonucunda LL-37 seviyesi bazal seviyeye kadar yükselmiştir. Her ne kadar LL-37 AD durumunda artış gösteriyor olsa da IL-4'ün ortama verilmesi sonucu LL-37 ifadesini azalttığına dair bilgiler literatürde mevcuttur ve tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir [137]. 24.saatte LL-37 seviyesindeki bazal seviyeye yükseliş ise muhtemelen ortamda artan KLK-7 seviyesinden kaynaklanmaktadır [138].

4.3.1.2. HaCaT ve Eol-1 Ko-kültür Sonuçları

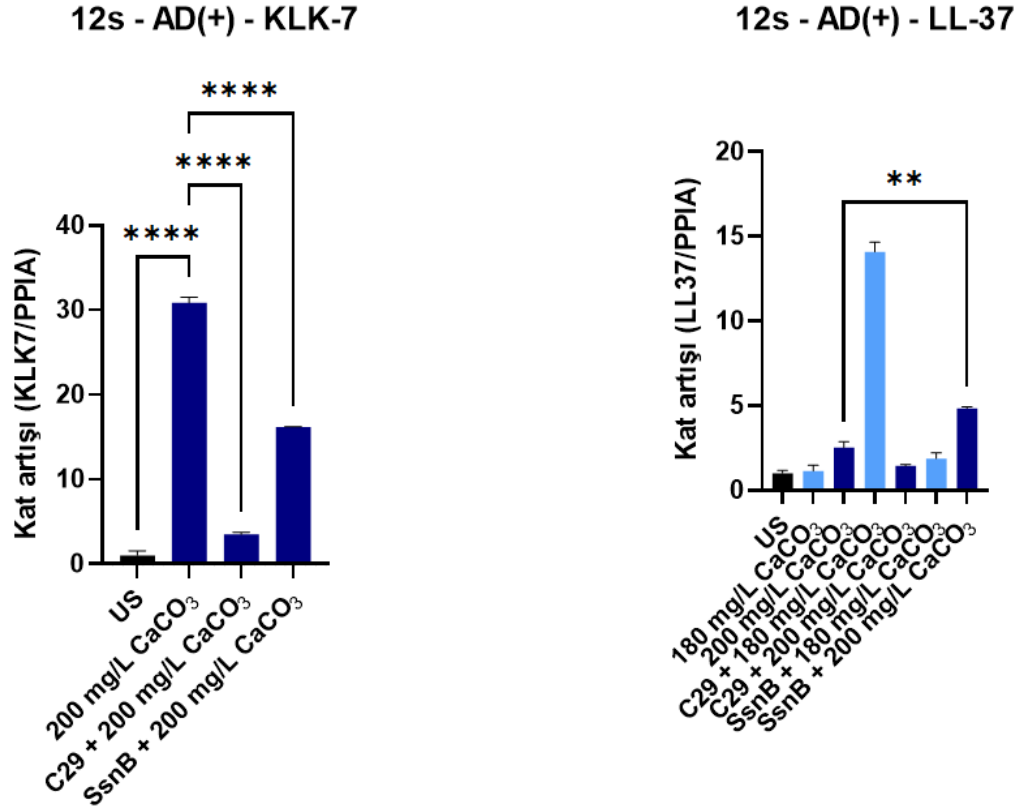
Tez çalışması kapsamında HaCaT hücre hattıyla beraber kültürlenен eol-1 hücre hattının hem CaCO_3 ile karşılaşmasıyla HaCaT hücreleri üzerindeki etkisinin araştırılması hem de tez çalışması kapsamında kullanılan TLR-2 reseptör blokanlarının bu etki üzerindeki rolü incelenmiştir. HaCaT hücre hattı ile yapılan deneylerde yapıldığı gibi bu deney düzeneğinde de AD-benzeri model ile kıyaslama yapmak amacıyla AD-model kurulmadan da uyarımlar yapılmıştır.



Şekil 4.29 12 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri n=3, US: Uyarılmamış, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Eol-1 hücre hattı ile ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinin 12 saat süreyle 180 ve 200 mg/L CaCO_3 ile karşılaşması sonucu KLK-7 ifadesinde düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.29). Öte yandan, KLK-7 ifadesi ortamda bulunan TLR-2 reseptör blokanların varlığına bağlı olarak artış göstermiştir. LL-37 ifadesi de KLK-7 gen ifadesine benzer şekilde HaCaT hücrelerinin CaCO_3 ile maruziyeti sonucunda düşüş gösterirken; blokanların

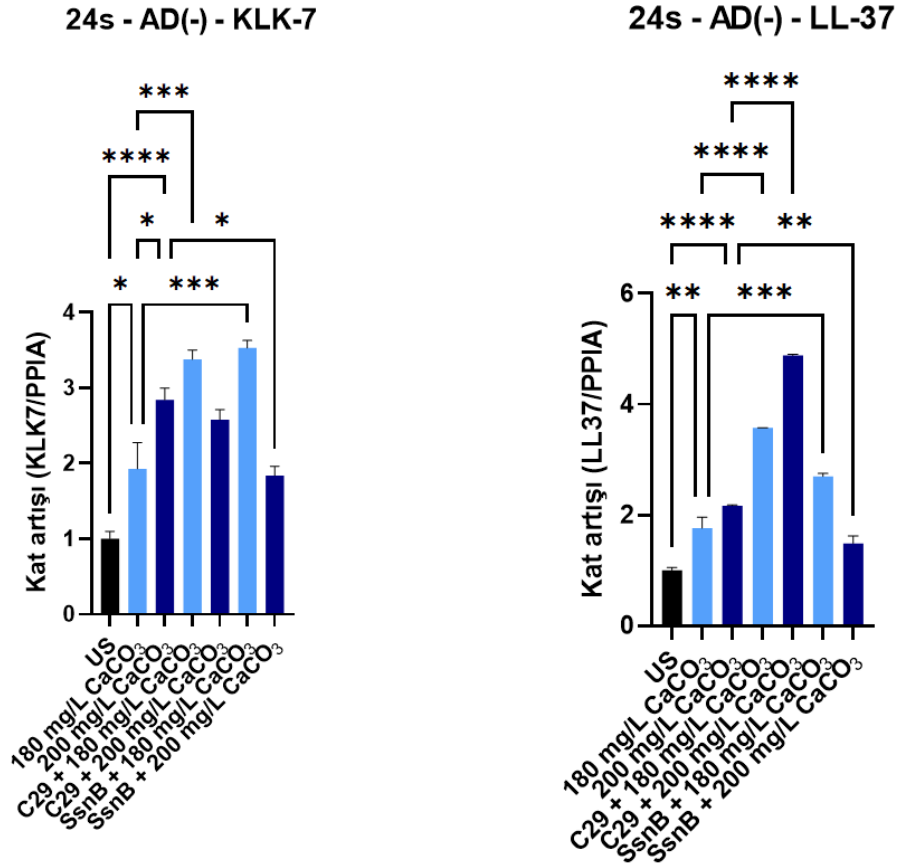
ortamda bulunmasıyla LL-37 ifadesi artış göstermiştir. Gerçekleştirilen gerçek-zamanlı PZR deneylerinde KLK-5 geni için elde edilen C_T değerleri kabul edilen değer aralığında bulunmadığı için sonuçlar eklenmemiştir ($C_T > 35$) [135].



Şekil 4.30 12 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO₃ ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

AD modelinin kurulduğu ko-kültür sisteminde 12 saatlik 200 mg/L CaCO₃ uyarımı KLK-7 ifadesini yaklaşık 30 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Bunun yanında KLK-7 ifadesi uyarılmamış (US) koşullara kıyasla artış göstermiştir. 180 mg/L konsantrasyondaki CaCO₃ ile tek başına ve C29 ile SsnB blokanları ile uyarılan HaCaT hücrelerinde gerçekleştirilen gerçek-zamanlı PZR sonucunda elde edilen C_T değeri ($C_T > 35$) kabul edilen değerler arasında yer almadığı için bu sonuçlar eklenmemiştir [135]. LL-37 ifadesi de yine KLK-7 ifadesine benzer olarak 200 mg/L'de yaklaşık 2,5 kat artış gösterirken; buna karşın LL-37

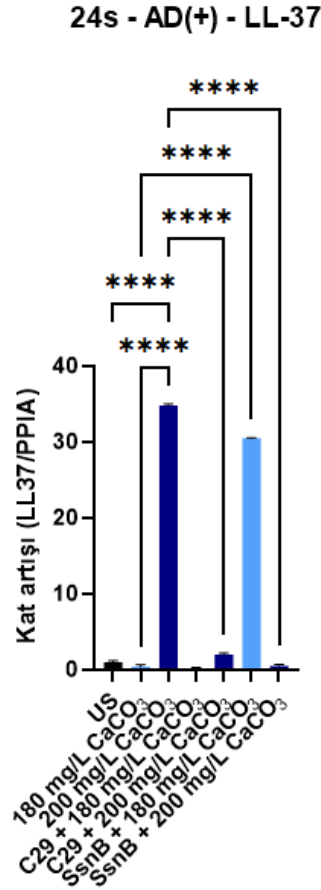
ifadesi 180 mg/L CaCO_3 ile C29 blokanın birlikte bulunduğu koşulda en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Bir diğer TLR-2 reseptör blokanı olan SsnB'nin 200 mg/L CaCO_3 ile beraber bulunduğu koşulda da LL-37 ifadesi yaklaşık 4 kat artmıştır (Şekil 4.30).



Şekil 4.31 24 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

AD-model kurulmadan 24 saat boyunca 180 ve 200 mg/L CaCO_3 ile karşılaşan HaCaT hücreleri tarafından sentezlenen KLK-7 seviyesinde artış tespit edilmiştir. Bunun yanında ortamda TLR-2 blokanlarının da bulunması durumunda da KLK-7 gen ifadesi artış göstermiştir. KLK-7 gen ifadesine benzer şekilde LL-37 gen ifadesi de hem 180 hem de 200 mg/L CaCO_3 ile artmıştır. Ortamda C29'un varlığıyla LL-37 gen ifadesi artan CaCO_3 konsantrasyonlarına doğru orantılı olarak artarken, SsnB Blokanının varlığında LL-37 gen

ifadesi artan CaCO_3 konsantrasyonunda düşüş gösterse de US'ye göre yaklaşık 1,5 kat artış göstermiştir (Şekil 4.31). Gerçek-zamanlı PZR deneyi sonucu elde edilen sonuçlarda KLK-5 gen ifadesi çok yüksek C_T değerine sahip olduğu için sonuçlar grafiğe eklenmemiştir [135].



Şekil 4.32 24 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen LL-37 gen ifadeleri $n=3$, US: Uyarılmamış, * $p<0,05$, **** $p<0,0001$.

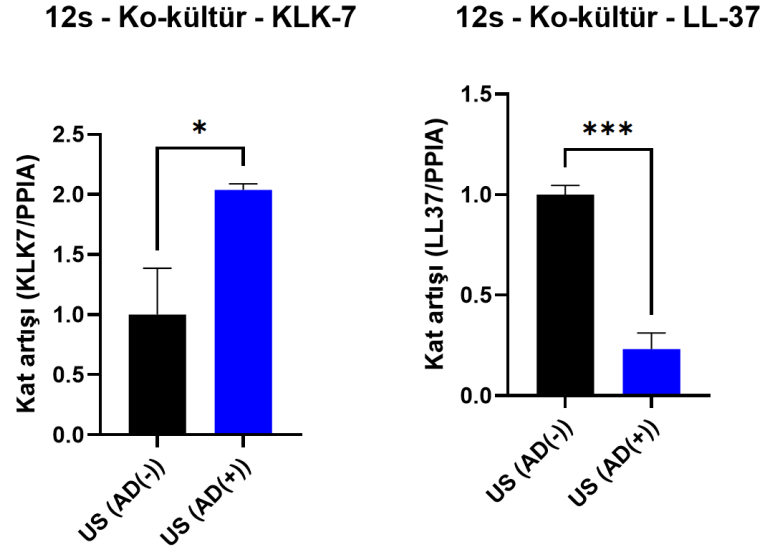
AD modelinin kurulduğu HaCaT hücrelerinde 24 saat boyunca 200 mg/L CaCO_3 ile uyarılması sonucu LL-37 gen ifadesi 30 kattan fazla artış göstermiştir. Ancak bu artış ortama C29 eklendiği zaman tersine dönmüş ve LL-37 gen ifadesi bazal seviyeye gerilemiştir. Buna rağmen diğer TLR-2 blokanı olan SsnB'nin 180 mg/L CaCO_3 ile uyarılması sonucu 30 kat artış tespit edilmiştir. Ancak CaCO_3 konsantrasyonun artmasıyla LL-37 gen ifadesi düşmüştür (Şekil 4.32).

Gerçekleştirilen gerçek-zamanlı PZR deneylerinde KLK-5 ve KLK-7 genleri için elde edilen C_T değerleri kabul edilen değer aralığında bulunmadığı için sonuçlar eklenmemiştir [135].

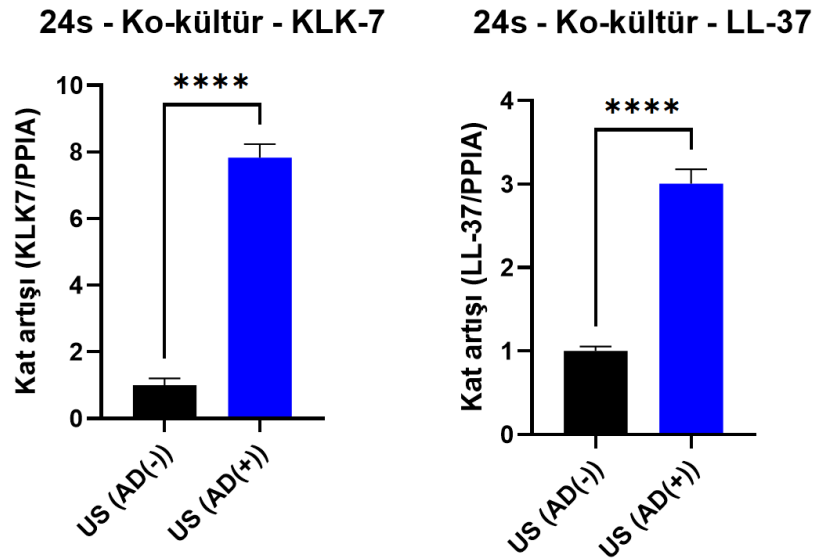
Çizelge 4.3 Gerçek-zamanlı PZR deneyleri sonucunda ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde değişen gen profilleri.

	12-Saat				24-Saat		
	AD(-)		AD(+)		AD(-)		AD(+)
	KLK-7	LL-37	KLK-7	LL-37	KLK-7	LL-37	LL-37
180 mg/L CaCO ₃	↓	↓		↔	↑	↑	↓
200 mg/L CaCO ₃	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑
C29+180 mg/L CaCO ₃	↑	↑		↑	↑	↑	↓
C29+200 mg/L CaCO ₃	↑	↑	↑	↔	↑	↑	↔
SsnB+180 mg/L CaCO ₃	↑	↑		↔	↑	↑	↑
SsnB+200 mg/L CaCO ₃	↔	↑	↑	↑	↑	↑	↓

Eol-1 hücre hattıyla beraber ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinden CaCO₃ uyarımı sonrası değişen gen profillerine ek olarak AD modelinin kurulması sonrası ilgili genlerin profilleri herhangi bir CaCO₃ uyarımı gerçekleştirilmeden incelenmiştir. Gerçek-zamanlı PZR ile yapılan deneylerde C_T değeri kabul edilebilir aralıkta olan genlerin profilleri incelenmiştir (Şekil 4.33 ve Şekil 4.34).



Şekil 4.33 Eol-1 ile ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde 12 saatlik IL-4 ve TNF- α ile uyarımı sonucunda değişen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, ***p<0,001.



Şekil 4.34 Eol-1 ile ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde 24 saatlik IL-4 ve TNF- α ile uyarımı sonucunda değişen KLK-7 ve LL-37 gen ifadeleri; n=3, US: Uyarılmamış, *p<0,05, ***p<0,001.

Gerçek-zamanlı PZR deneyi sonucunda eol-1 ile ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde AD-modelinin kurulmasına bağlı olarak 12 ve 24 saatte KLK-7 gen ifadesinde kademeli bir artış tespit edilmiştir ve elde edilen sonuçlar mono-kültüre edilen HaCaT'lardan elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir [136, 137]. LL-37 gen ifadesi ise mono-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde gözlemlenen gen profiline benzer bir şekilde 12.saatte düşüş gösterirken, 24.saatte gen ifadesi yaklaşık 3 kat artış göstermiştir. Mono-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde bu artış bazal seviyeye kadar ulaşırken, ko-kültüre edilen HaCaT'larda meydana gelen bu ifade artışı durumu deride gerçekleşen inflamasyonda LL-37'nin eozinofillerin migrasyonunu ve toplanmasını sağlamak amacıyla bir kemoatraktant olarak görev yapmasından kaynakladığını tahmin etmekteyiz [61].

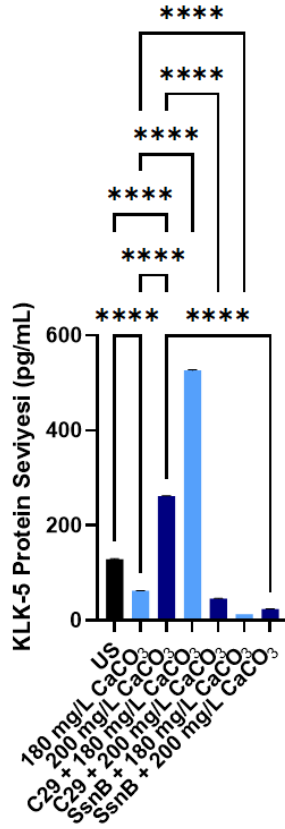
4.3.2. ELISA Sonuçları

HaCaT hücreleri hem tek olarak hem de eol-1 hücre hattıyla ko-kültüre alınarak uyarımlar gerçekleştirilmiş ve hücre süpernatantlarından KLK-5, KLK-7 ve LL-37 ELISA yöntemiyle protein tayini yapılmıştır.

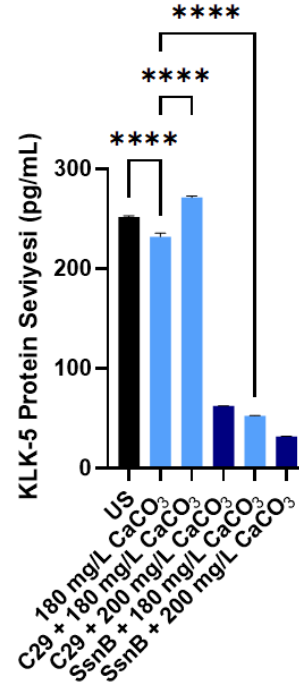
4.3.2.1. HaCaT ALI-Kültür Sonuçları

HaCaT hücre hattının CaCO₃ ile karşılaşması sonucunda dışarıya saldıgı KLK'lar ve LL-37 üzerindeki etkisinin araştırılması ve salınan bu proteinlerin TLR-2 reseptör blokan varlığında değişen protein miktarının tayini gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen ELISA deneyleri sonucunda HaCaT hücreleri tarafından üretilen KLK-7 ve LL-37 protein miktarları, tez çalışması kapsamında kullanılan ELISA kitlerinin tespit aralığında yer almadığı için bu deneylerden sonuç elde edilememiştir. KLK-5 protein tayini ise hem apikal hem de bazal süpernant'lar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

12s - AD(-) - HaCaT (Apikal s.n.)



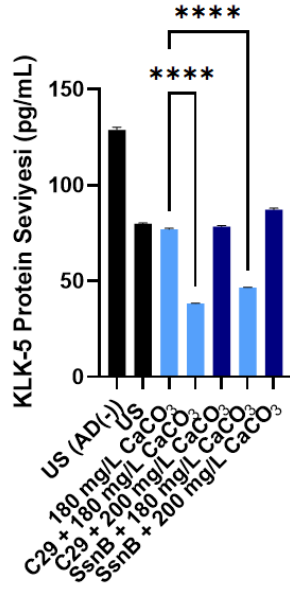
12s - AD(-) - HaCaT (Bazal s.n.)



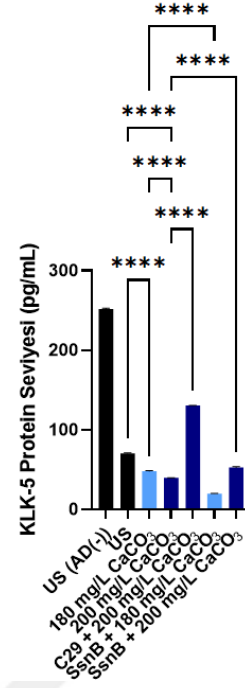
Şekil 4.35 12 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO₃ ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, * ****p<0,0001.

AD-modelin kurumadığı ko-kültür sisteminde KLK-5 protein seviyesi apikal bölgede artış göstermektedir. Ancak bu artış ortamda SsnB'nin varlığıyla inhibe edilmiştir. Buna rağmen bir diğer TLR-2 reseptör blokani olan C29'un ortamda bulunduğu koşullarda ise HaCaT hücreleri tarafından apikal bölgeye salınan KLK-5 proteini diğer koşullara kıyasla en yüksek seviyede ölçülmüştür. HaCaT hücrelerinden bazal kısma doğru salınan KLK-5 seviyesi, 'sert su' olarak tanımlanan 180 ve 200 mg/L CaCO₃ konsantrasyonlarda 12 saat boyunca uyarılması sonucu herhangi bir değişmesine neden olmamıştır. Ortama SsnB Blokanının eklenmesiyle KLK-5 seviyesinde düşüş tespit edilmiştir (Şekil 4.35).

12s - AD(+) - HaCaT (Apikal s.n.)



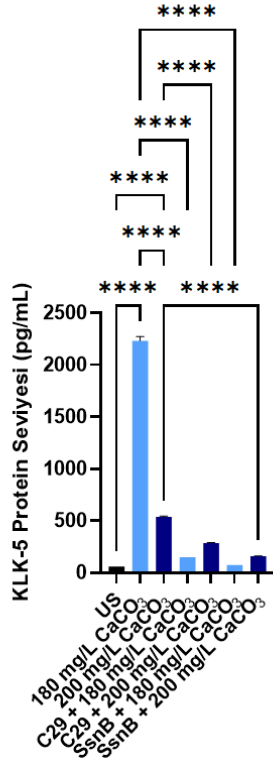
12s - AD(+) - HaCaT (Bazal s.n.)



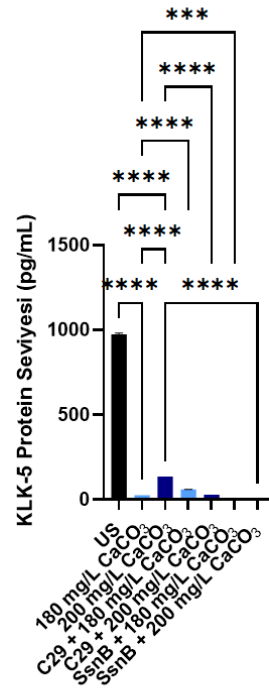
Şekil 4.36 12 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO₃ ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.

AD-modelinin oluşturulduğu ko-kültür düzeneğinde 12 saat boyunca gerçekleştirilen uyarımlarda HaCaT hücrelerin tarafından salınan KLK-5 seviyesinde 180 mg/L CaCO₃ ile karşılaşmasının ardından değişmediği ancak ortama C29 eklendiği zaman KLK-5 seviyesini düşürdüğü apikal tarafta saldıgı proteinler ile tespit edilmiştir. HaCaT hücrelerinden salınan KLK-5 seviyesi artan CaCO₃ konsantrasyonlarıyla doğru orantılı olarak düşüş gösterdiği; ancak ortamda C29'un bulunmasına bağlı olarak KLK-5 seviyesinde artış meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.36).

24s - AD(-) - HaCaT (Apikal s.n.)

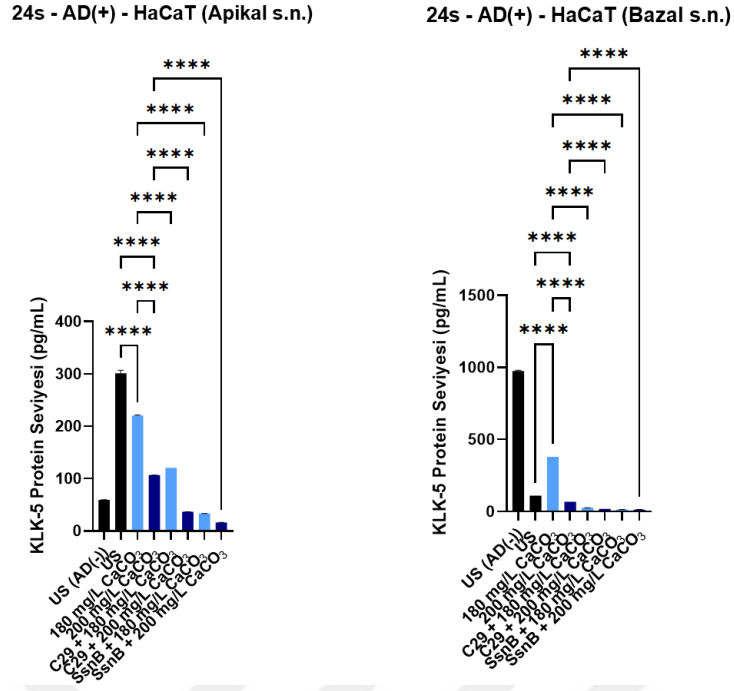


24s - AD(-) - HaCaT (Bazal s.n.)



Şekil 4.37 24 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO₃ ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, *p<0,05, ****p<0,0001.

AD-modelinin kurulmadığı deney sisteminde, 24 saat boyunca 180 mg/L ve 200 mg/L CaCO₃ ile uyarılan HaCaT hücrelerinin apikal kısmına saldıgı KLK-5 seviyesi artış gösterirken ortamda C29 ve SsnB'nin bulunmasıyla salınan KLK-5 bazal seviyeye inmiştir. Besiyerinin bazal kısma doğru saldıgı KLK-5 seviyesi ise her koşulda düşüş göstermiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.38 24 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO₃ ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.

HaCaT hücrelerinin IL-4 ve TNF-alfa ile uyarılmasıyla oluşturulan AD-durumunda apikal kısma salınan KLK-5 seviyesinde artış tespit edilmiştir. Ancak, deney düzeneğinde yer alan tüm uyarım koşullarında tespit edilen KLK-5 protein seviyesi uyarılmamış koşula göre düşüş göstermiştir. 24 saat boyunca 180 mg/L CaCO₃ ile uyarılan HaCaT hücrelerinden bazal kısma doğru salınan KLK-5 seviyesi ise artış gösterirmiştir. Ancak protein seviyesinde gözlemlenen bu artış ortama C29 ve SsnB'nin eklenmesiyle bazal seviyenin de altına inmiştir (Şekil 4.38).

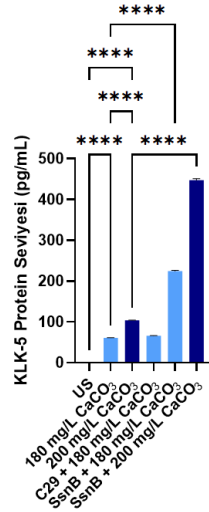
Çizelge 4.4 ELISA deneyleri sonucunda HaCaT hücrelerinde değişen protein seviyeleri.

	12-Saat				24-Saat			
	AD(-)		AD(+)		AD(-)		AD(+)	
	Apikal	Bazal	Apikal	Bazal	Apikal	Bazal	Apikal	Bazal
180 mg/L CaCO ₃	↓	↔	↔	↓	↑	↓	↓	↑
200 mg/L CaCO ₃	↑			↓	↑	↓	↓	↓
C29+180 mg/L CaCO ₃	↑	↔	↓		↔	↓	↓	↓
C29+200 mg/L CaCO ₃	↓	↓	↔	↑	↑	↓	↓	↓
SsnB+180 mg/L CaCO ₃	↓	↓	↓	↓	↔	↓	↓	↓
SsnB+200 mg/L CaCO ₃	↓	↓	↔	↓	↔	↓	↓	↓

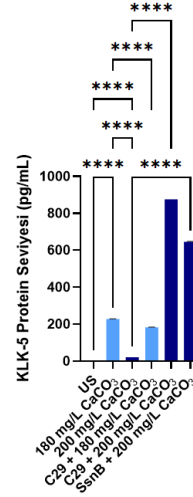
4.3.2.2. HaCaT ve Eol-1 Ko-Kültür Sonuçları

‘Sert su’ olarak tanımlanan 180 ve 200 mg/L CaCO₃’ün HaCaT’lar üzerindeki rolünün anlaşılması ve bu uyarım sonucunda eol-1 hücre hattının HaCaT hücre hattı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

12s - AD(-) - Ko-kültür (Apikal s.n.)

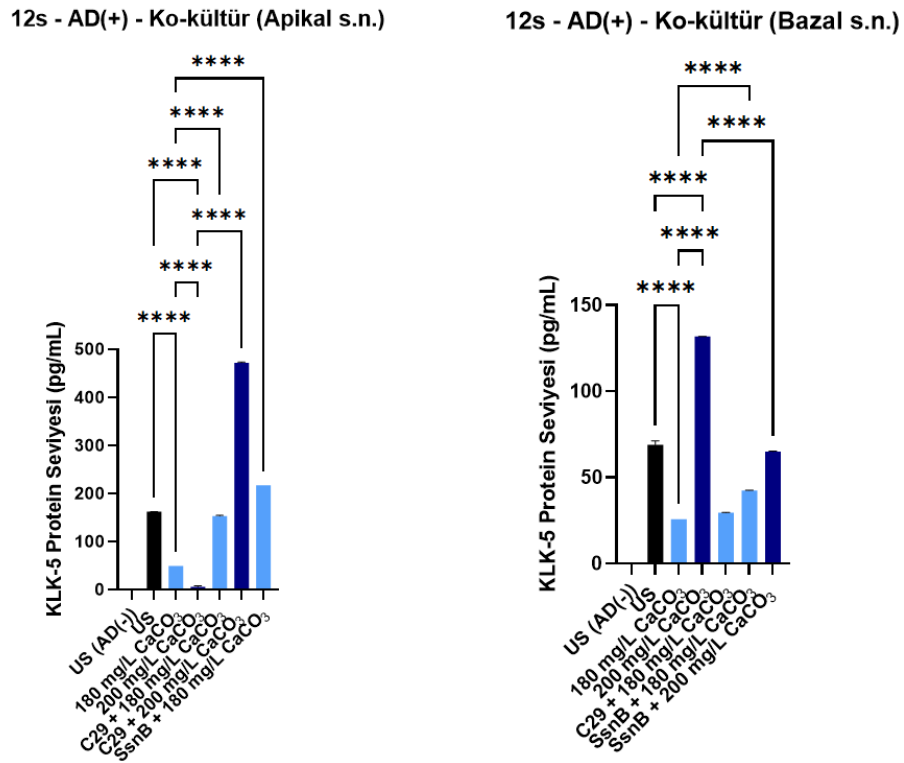


12s - AD(-) - Ko-kültür (Bazal s.n.)



Şekil 4.39 12 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO₃ ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.

AD-model oluşturulmadan 12 saat boyunca CaCO_3 'a maruz kalan HaCaT hücrelerinden elde edilen sonuca göre apikal kısma salınan KLK-5 seviyesinde artış meydana gelmiştir. KLK-5 seviyesi, reseptör blokanlarından olan C29'un varlığına bağlı olarak, 200 mg/L CaCO_3 ile beraber uyarıldığı koşulda artmıştır. Bunun yanı sıra, SsnB'nin ortamda yer alması CaCO_3 etkisinden bağımsız olarak KLK-5 seviyesinin hem apikal hem de bazal kısımda artmasına neden olmuştur (Şekil 4.39).

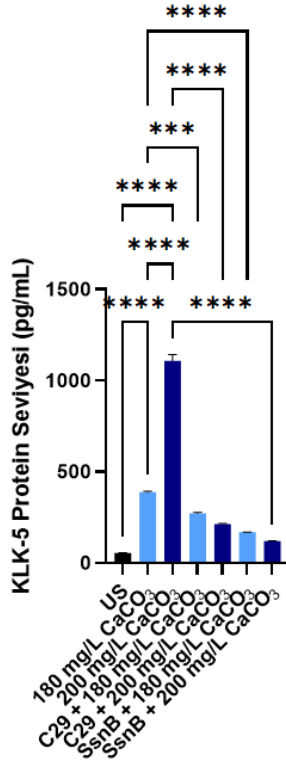


Şekil 4.40 12 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.

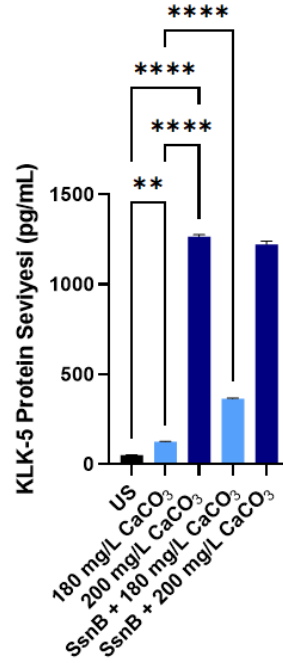
KLK-5 protein seviyesinin AD-modelinin kurulmasıyla artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra KLK-5 seviyesi 180 ve 200 mg/L CaCO_3 ile karşılaştıktan sonra apikal bölgede düşerken, C29'un 200 mg/L CaCO_3 ile birlikte yer aldığı koşulda KLK-5 seviyesinde artış tespit edilmiştir. 180 mg/L CaCO_3 ile uyarılan HaCaT'larda meydana gelen

KLK-5 protein miktarındaki düşüğe karşın 200 mg/L konsantrasyondaki CaCO_3 'ün HaCaT hücrelerinden bazal bölgeye doğru saldığı KLK-5 seviyesini arttırdığı elde edilen sonuçlarla anlaşılmıştır. Artan KLK-5 seviyesi ise ortama SsnB'nin eklenmesiyle uyarılmamış koşulun KLK-5 düzeyine kadar inmiştir (Şekil 4.40).

24s - AD(-) - Ko-kültür (Apikal s.n.)



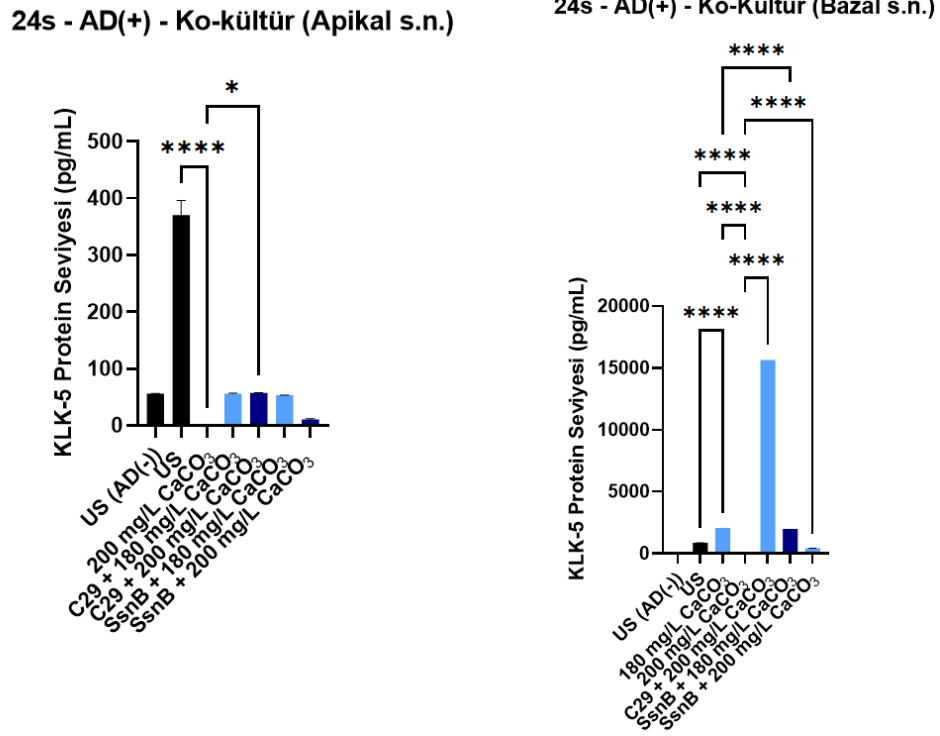
24s - AD(-) - Ko-kültür (Bazal s.n.)



Şekil 4.41 24 saat boyunca AD-model kurulmadan, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO_3 ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, ****p<0,0001.

AD-modelinin kurulmadığı ko-kültür sisteminde KLK-5 protein seviyesi hem 180 hem de 200 mg/L CaCO_3 ile artış göstermektedir. Artış gösteren KLK-5 miktarı, ortama TLR-2 reseptör blokanlarının eklenmesi apikal kısma doğru saldığı protein miktarında düşüş göstermiş olsa da elde edilen protein seviyesi uyarılmamış koşula kıyasla artış göstermektedir. HaCaT hücrelerinden bazal kısma doğru salınan KLK-5 seviyesi 200 mg/L

CaCO₃ ile en yüksek seviyesine ulaşmıştır ve SsnB Blokanının bu artışı durdurmadığı da gözlenmiştir (Şekil 4.41).



Şekil 4.42 12 saat boyunca AD-model kurularak, belirlenen konsantrasyonlarda CaCO₃ ve blokanlar ile uyarılan hücrelerden elde edilen KLK-5 protein seviyesi n=2, US: Uyarılmamış, *p<0,05, ****p<0,0001.

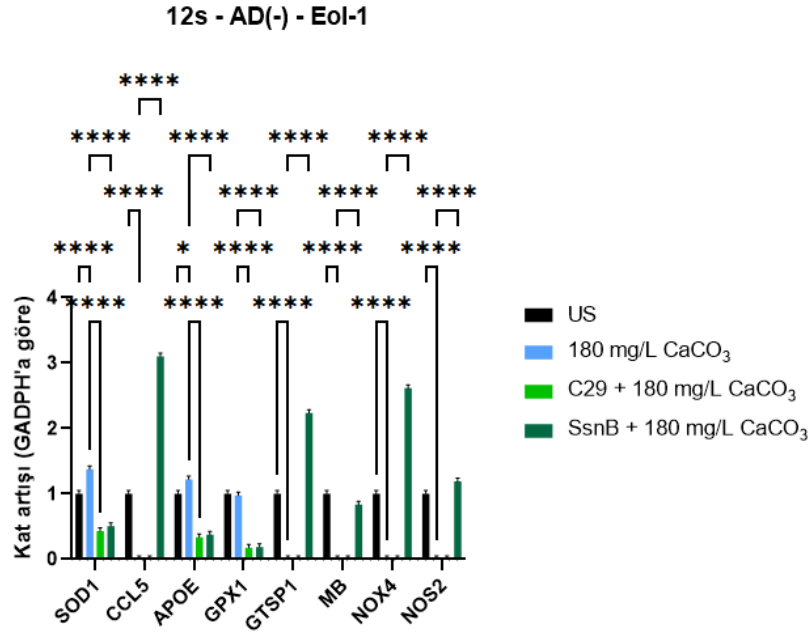
AD modelin kurulduğu ko-kültür sisteminde ise KLK-5 seviyesi AD-Modelinin kurulmasıyla bağlantılı olarak yükselirken ortama konan CaCO₃ ve TLR-2 reseptör blokanları ile beraber düşüş göstermiştir (Şekil 4.42). Bazal bölgeye salınan KLK-5 seviyesi 180 mg/L CaCO₃ ile uyarılması sonucu artarken, 200 mg/L CaCO₃ ile düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Azalan KLK-5 seviyesi ortama C29 blokanının eklenmesiyle artış göstermiştir. SsnB'nin ise 180 mg/L CaCO₃'ün etkisini inhibe edemediği görülmüştür.

Çizelge 4.5 ELISA deneyleri sonucunda ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinde değişen protein seviyeleri.

	12-Saat				24-Saat			
	AD(-)		AD(+)		AD(-)		AD(+)	
	Apikal	Bazal	Apikal	Bazal	Apikal	Bazal	Apikal	Bazal
180 mg/L CaCO ₃	↑	↑	↓	↓	↑	↑		↑
200 mg/L CaCO ₃	↑	↔	↓	↑	↑	↑	↓	↓
C29+180 mg/L CaCO ₃	↑	↑	↔	↓	↑		↓	
C29+200 mg/L CaCO ₃	↑	↑	↑		↑		↓	↑
SsnB+180 mg/L CaCO ₃	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑
SsnB+200 mg/L CaCO ₃	↑	↑		↔	↑	↑	↓	↓

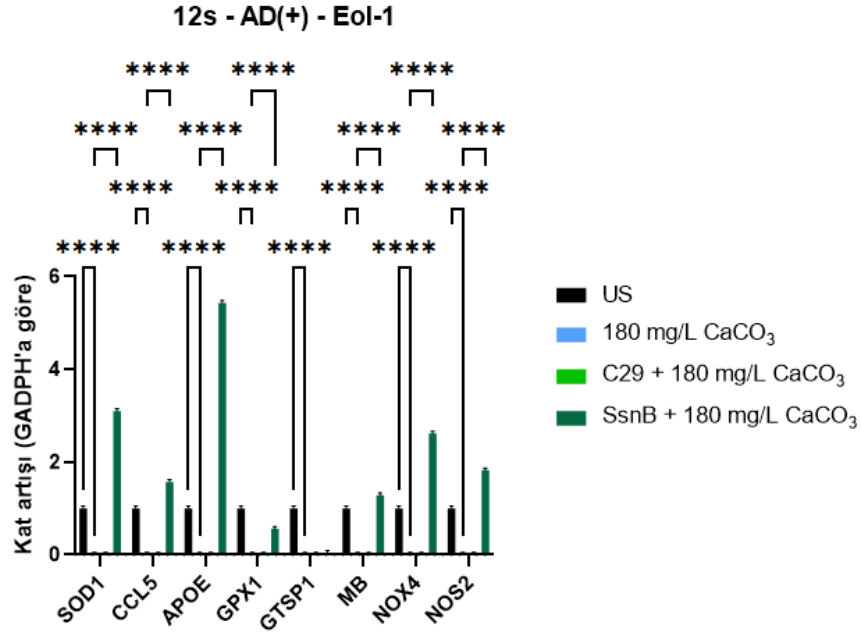
4.4. Sert Suyun Eol-1 Hücre Hattı Üzerinde ROS Genlerine Etkisi

Tez çalışması kapsamında eol-1 hücre hattının CaCO₃ ile karşılaşması sonucu ROS gen profilindeki değişimin gözlenmesi hedeflenmiştir. AD ile ilişkisi olduğu bilinen veya AD bağlantılı çalışmalarda daha önceden gen ve protein profilleri izlenmiş oksidatif genlere tez çalışması kapsamında bakılmıştır [124-126, 129, 139]. Deney düzeneği elde edilen sonuçlardan yola çıkarak 180 mg/L CaCO₃'ün yer aldığı koşullar üzerinden yeniden düzenlenmiştir. İnternal kontrol olarak Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) kullanılmıştır.



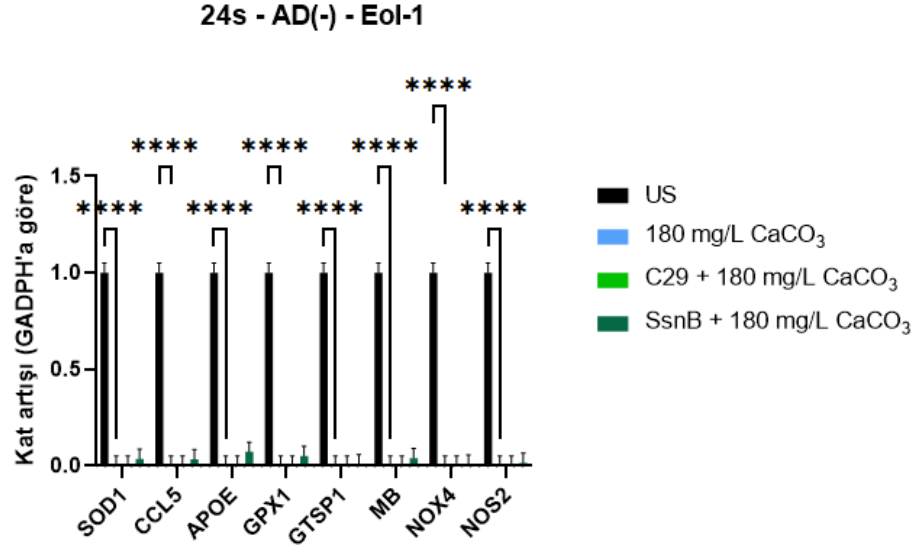
Şekil 4.43 AD-model kurulmadan, 12 saat boyunca ko-kültür sisteminde uyarılan eol-1 hücre hattında değişen oksidatif stres genleri, n=3, US=Uyarılmamış, *p<0,05, ****p<0,0001.

AD-modelinin kurulmadığı uyarım sisteminde 180 mg/L CaCO₃'a 12 saat boyunca maruz kalan eol-1 hücre hattında SOD1 ve APOE gen ifadelerinde artış gözlenmiştir. Bunun yanı sıra ROS için incelenen genlerinin ifadesi SsnB'nin varlığıyla artış göstermiştir. Bu genlerin seviyelerindeki artış ortamda C29 ve SsnB'nin bulunmasıyla durdurulmuştur. GPX1 geninde, uyarılmamış koşula kıyasla 180 mg/L CaCO₃ ile uyarıldığında herhangi bir değişimin olmadığı ancak ortama TLR-2 reseptörler blokanlarının eklenmesi sonucunda ifadesinde düşüş meydana geldiği tespit edilmiştir. AD patogenezinde özellikle eozinofillerin aktive olmasında etkili olan CCL5 geninin ifadesi ise 180 mg/L CaCO₃ varlığında düşerken ortama eklenen SsnB ile 3 kat artış göstermiştir. CCL5'in yanı sıra GTSP1, MB, NOX4 ve NOS2 genlerinde de 180 mg/L CaCO₃ ve C29'un yer aldığı koşullarda herhangi bir gen düzeyi artışı tespit edilmezken; mikro-çevrede SsnB'nin yer almasıyla tüm genlerin ifadelerinde artış meydana gelmiştir (Şekil 4.43).

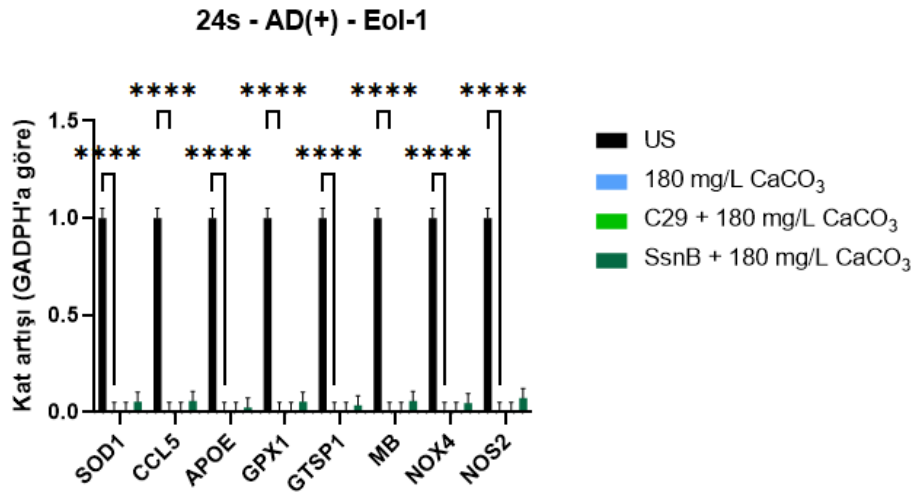


Şekil 4.44 AD-model kurularak, 12 saat boyunca ko-kültür sisteminde uyarılan eol-1 hücre hattında değişen oksidatif stres genleri, n=3, US=Uyarılmamış, ****p<0,0001.

AD-modelinin kurulduğu deney düzenleğinde ise GPX1 geni hariç tüm oksidatif stres genlerinin ifadesi sadece SsnB blokanının varlığına bağlı olarak artış göstermiştir. 180 mg/L CaCO₃'ün tek başına veya C29 ile beraber olduğu koşullarda ise ROS üretimini yapan genlerin ifadesi uyarılmamış koşula kıyasla düşmüştür (Şekil 4.44).



Şekil 4.45 AD-model kurulmadan, 24 saat boyunca ko-kültür sisteminde uyarılan eol-1 hücre hattında değişen oksidatif stres genleri, n=3, US=Uyarılmamış, ****p<0,0001.



Şekil 4.46 AD-model kurularak, 24 saat boyunca ko-kültür sisteminde uyarılan eol-1 hücre hattında değişen oksidatif stres genleri, n=3, US=Uyarılmamış, ****p<0,0001.

AD modeli kurulmadan ve kurularak gerçekleştirilen deney düzeneğinde oksidatif stres genlerinin ifadesi 24 saatlik uyarım koşullarının tümünde düşüş göstermiştir (Şekil 4.45 ve Şekil 4.46).

5. YORUM

HaCaT hücre hatlarının CaCO_3 ile yapılan 6, 12 ve 24 saatlik uyarımlar sonunda konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığının da azaldığı gözlenmiştir. Literatürde CaCO_3 'ün sıklıkla biyomateryal olarak kullanıldığı çalışmalar mevcut iken, CaCO_3 'ün 'sert su' olarak kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. HaCaT hücrelerinin kullanıldığı bu çalışmalarda kullanılan CaCO_3 konsantrasyonlarının düşük olması (0-2 $\mu\text{g/mL}$ [140], 0,1 M [141]) nedeniyle hücre canlılığına olan etkisine dair net bir bilgi bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen tez çalışması, sert su konsantrasyonlarının (180 mg/L ve üstü) etkisini hücre kültürü çalışması ile HaCaT hücrelerinde gösteren ilk çalışma olarak özgün değere sahiptir.

Kan granülositlerden olan eozinofiller güçlü bir efektör hücre olup epitel hücrelerden herhangi bir hasar durumunda salınan sitokinlerden etkilenecek yanıt olarak farklı sitokin ve kemokin üretimiyle inflamasyona katkıda bulunurlar[142]. Eozinofiller kalsiyum artışına bağlı olarak aktive olabilmekte, eotaksin-1 ve RANTES gibi sitokinlerin salımını indüklemekte [143] ve eozinofilik hücre dışı tuzakları (EET) aktive edebilmektedir [144]. Tez çalışmasında eol-1 hücreleri 6,12 ve 24 saat boyunca direkt olarak CaCO_3 ile uyarılmış ve 6 saatlik 100, 150 ve 180 mg/L CaCO_3 uyarımları ile elde edilen hücre canlılığı yüzdelерinin 24 saat ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu gözlenmiştir. Literatürde eol-1 ile CaCO_3 'ün uyarılmasıyla elde edilen herhangi bir hücre canlılığı sonucu bulunmamaktadır. Bununla birlikte literatürde çok yoğun konsantrasyonda kalsiyuma hücrelerin maruz kalması sonucu hücre ölümünün gerçekliğini belirten çalışma mevcuttur ancak bu çalışmada hücre ölümünün hangi saatlerde gerçekleştiği bilgisi bulunmamaktadır [145]. 6. saatte azalan ve sonrasında ilerleyen saatlerde kademeli bir şekilde artan hücre canlılığının kalsiyumun hücreler üzerindeki bu etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

C29 blokunu TLR-2 reseptörü üzerinde TRAP bölgesine bağlanarak TLR-2 ve heterodimer yapı oluşturduğu TLR2/1 ve TLR2/6 reseptör aktivasyonlarını bloklamaktadır [146]. C29 blokunun 2 saatlik bloklama ve yüksek konsantrasyonunun HaCaT hücre morfolojisini

değiştirdiği ve hücre yapılarının daha yuvarlak hale geldikleri tespit edilmiştir. Literatürde C29 blokanının uygulandığı farklı hücre tiplerinin farklı hücre canlılığı sonuçlarına sahip oldukları görülmektedir. Blokan etkinliğinin endotel hücrelerde 48 saat 1 μM [147], fare makrofaj hücrelerinde 1 saat 50 μM ve HEK hücrelerinde 1 saat 10 μM kullanıldığı görülmüştür [108]. Tez çalışmasında kullandığımız konsantrasyonun literatürde HaCaT hücre hattının kullanıldığı Rosacea hastalığı çalışmasında da kullanıldığı görülmüştür [109]. Sparstolonin B molekülü, hücre yüzeyindeki TLR-2 ve TLR-4 reseptörlerinin ligand kısmına bağlanarak bloklama gerçekleştirmektedir [148]. Yapılan canlı/ölü hücre boyama deneyleri sonucunda yüksek konsantrasyonda (100 μM) SsnB blokanının kullanımı sonucunda hücre morfolojisinin değişmeye başladığı ve hücre sayısının azaldığı görülmüştür. Sparstolonin B blokan molekülünün kullanıldığı fare damar düz kas hücrelerinde 100 μM uyarım sonucunda hücre canlılığı %80'e inmiş, insan B16 melanoma hücrelerinde ise 20 μM SsnB konsantrasyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir [149, 150]. Tez çalışması kapsamında kullanılan C29 ve SsnB blokanlarının IL-6 gen ifadesini baskıladığı literatürde gösterilmiştir [146]. TLR-2 reseptör blokanlarının hücrelerdeki IL-6 gen ifadesini baskıladığı, 5 $\mu\text{g/mL}$ LPS uyarımı sonrasında elde edilen yaklaşık 5 katlık artışın bazal seviyeye döndüğü gözlenmiştir.

HaCaT hücre farklılaşmasının kontrolü hücre yüzeyindeki K1 proteininin IF boyaması ile kontrol edilmiş ve Ca^{+2} ile keratinosit hücrelerinin farklılaştırıldığı gösterilmiştir. Derinin bazalinde bulunan hücreler (stratum basale) Keratin proteinlerinden K5 ve K14 proteinlerini üretmektedir. Bazal hücrelerden farklılaşan (stratum spinosum tabakasını oluşturan) hücrelerde hücre içi kalsiyum miktarında artış meydana gelmektedir. Bu artışla beraber sırasıyla K1 ve K10 keratinleri ve transglutamaz-1 ve involukrin proteinlerini ürettikleri görülmüştür [151, 152]. Farklılaştırma çalışması sırasında kullandığımız 2,8 mM Ca^{+2} miktarının HaCaT hücrelerini farklılaştırmada başarılı olduğu görülmüştür. Kalsiyum ile farklılaşmamış ve farklılaştırılmış hücrelerdeki K1 ifadesinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise Western Blot bantlarında K1 proteininin olduğu ancak ortamda kalsiyumun olması ve hücrelerin farklılaştırılması ile K1 miktarının arttığı görülmektedir [153]. Elde ettiğimiz sonuçlarda farklılaşmamış hücrelerde de K1 proteininin görülmesi, hücrelerde bu proteinin

üretildiğini ancak farklılaşmanın bu protein miktarında istatistiksel bir artışa neden olduğunu göstermektedir.

KLK-5, deride en çok bulunan KLK'lerden biridir ve epitelyal bariyerin korunmasında görev almaktadır. Farklı deri hastalıklarında KLK-5 düzeyi hastalığın sıklığına dair bilgi vermektedir [154]. Atopik Dermatit hastalığında da deride inflamatuvar cevabın artışına bağlı olarak KLK-5 seviyesinin normalin üstünde arttığı ve bu durumun deri ilişkili proteaz, enzim ve lipid üretimini de etkilediği raporlanmıştır [155]. Yaptığımız çalışma kapsamında AD modeli oluşturulmayan ve 12 saat 200 mg/L CaCO_3 uyarılan HaCaT hücrelerinde KLK-5 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Literatürde Rosacea hastalarında KLK-5 ifadesinin düşük ve yüksek kalsiyum durumundaki gen ifadelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada yüksek Ca^{+2} miktarının hücrelerden üretilen KLK-5 ifadesinde artışa neden olduğu görülmüştür [87]. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerde KLK-5 seviyesi AD-model kurulmadığı durumlarda hem 180 hem de 200 mg/L konsantrasyon ile 12 ve 24 saat boyunca uyarılması sonucu arttığı tespit edilmiştir. Ancak, AD-modelinin kurulduğu durumda KLK-5 seviyesi ise HaCaT hücrelerinin mono-kültürde bulunduğu koşulda 180 mg/L CaCO_3 ile artarken ko-kültüre edilen HaCaT hücrelerinden salınan KLK-5 200 mg/L CaCO_3 konsantrasyonunda artış göstermektedir. Artan KLK-5 protein seviyesi bazı koşullarda C29 blokunu tarafından bazı koşullarda ise SsnB tarafından tersinir duruma gelmiştir. Atopik dermatit hastalarında ise sert su olan CaCO_3 'e maruz kalma sonucunda KLK-5 ifadesindeki etkiye dair bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. HaCaT ve eol-1 hücre hattının beraber ko-kültüre alınması ve Çizelge 4.1'de belirtildiği gibi tasarlanan deney düzeneğinin ardından yapılan gerçek-zamanlı PZR deneylerinde KLK-5 geni kabul göre C_T değeri aralığının dışında yer aldığı için herhangi bir sonuç elde edilememiştir.

KLK-7, KLK-5'ten sonra deriden en sık bulunan KLK'lardandır. İnflamasyon sırasında miktarı artan KLK-7 proteinlerinin atopik dermatit hastalarında görülen kronik kaşıntı durumu ile ilişkili olduğu bulunmuştur [156]. Tez çalışmasında elde edilen KLK-7 ifadeleri, AD olmayan ve AD'li deney gruplarında CaCO_3 uyarımları ile azalmıştır. Normal insan

epidermal keratinosit hücrelerinde (NHEK) kalsiyum ile uyarım sonrasında KLK-7 gen ifadesinin arttığı gösterilmiştir [157]. Ancak bu çalışmada hücreler farklılaştırılmamış ve %30 kaplama oranına ulaştıklarında 2 mM (80 mg/L) kalsiyum ile uyarımları gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen 2 farklı konsantrasyondaki CaCO_3 uyarımı sonrası HaCaT hücrelerinde ifade olan KLK-7'nin araştırılmasını hedefleyen başka bir çalışma bulunmamaktadır. Sonuçlarımızda 180 mg/L CaCO_3 uyarımının KLK-7 ifadesini AD (-) ve AD (+) durumda azalttığı ve bu azalmanın kullanılan C29 blokanı ile bazal seviyeye geri döndüğü gösterilmiştir. Ko-kültüre edilen HaCaT'larda sentezlenen KLK-7 gen ifadesi 200 mg/L CaCO_3 ile AD-Modelin kurulduğu 12 ve 24 saatlik uyarımlarda ifadesi artarken bu konsantrasyonun KLK-7 üzerine verdiği etki C29 ve SsnB blokanı tarafından geri döndürülmüştür. Ancak, bu reseptör blokanlarının kullanıldığı koşullarda da KLK-7 gen ifadesi artış göstermektedir. Bu durum da KLK-7 aktivasyonunun sadece TLR-2 reseptörü üzerinden değil literatürde de belirtildiği gibi PAR-2 reseptörü üzerinden etkisini gösterdiğini düşündürmektedir [158].

Deri bariyer bütünlüğünün korunmasında antimikrobiyal peptitler de rol almaktadır. AMP'ler arasında farklı alfa ve beta-defensin AMP'lerinin deri bariyer bütünlüğünü korumasının yanında bir diğer AMP ailesi olan ve tek üye ile temsil edilen katelisin ailesinden LL-37 AMP'si de deride tespit edilmiştir [159]. LL-37, epitel hücrelerden pro-formda salındıktan sonra aktifleşmekte ve nötrofillerin göçünde ve deri yara onarımı sırasında rol almaktadır [160]. AD hastalarının deri örneklerinde LL-37 ifadesinin AD hastalarında arttığı gösterilmiştir [161]. Deneylerimizde LL-37 gen ifadesinin AD (+) deney grubunda 12 saatte CaCO_3 ile arttığı ve bu artışın, 12 saatte SsnB blokanının kullanılması ile bazal seviyeye geri döndüğü gösterilmiştir. 24 saat sonunda ise CaCO_3 uyarımı ile LL-37 gen ifadesi değişmezken C29 blokanının kullanımı her iki dozda da artışa yol açmıştır. Bu artışların TLR-2 TRAP alt biriminin bloklanmasının yol açtığı bir etki olduğu düşünülmektedir. LL-37 gen ifadesi ko-kültüre alınan HaCaT hücrelerinde AD-Modelinin kurulduğu 12 saatlik ve AD-Modelinin kurulmadığı koşullarda 180 ve 200 mg/L CaCO_3 'ten etkilenecek artış göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar AD durumunda artan KLK seviyesiyle beraber LL-37'nin aktifleştiğini tespit eden bilgiler ile örtüşmektedir [159]. Bu

artış bazı koşullarda C29 ve SsnB ile geri döndürülürken bu reseptör blokanlarının bulunduğu koşullarda ise LL-37 gen ifadesi daha da artış göstermektedir. Bu durum da CaCO_3 etkisinin TLR-2 reseptöründen bağımsız olarak ortaya çıkmış olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde CaCO_3 ile uyarımı sonucu HaCaT hücrelerinde KLK ifadeleri araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmaların büyük bir bölümü hücre için kalsiyum miktarının değişiminin farklı hastalıklardaki cevabını incelemek ve derideki proteaz-antiproteaz dengesinin araştırılmasına yönelik gerçekleştirilmiştir. Bu dengenin sağlanmasında KLK'ların inhibitörlerinden olan serin proteaz inhibitör ailesinden LEKTI moleküllerinin de etkisi bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada kalsiyum miktarının serin proteaz inhibitör ifadesini arttırdığı öne sürülmüştür. Yüksek kalsiyum konsantrasyonunun 2 mmol/L (80 mg/L) olarak belirlendiği çalışmada KLK-5 ve KLK-7 değerlerinde artışla beraber LEKTI, SLPI ve SPINK5 gibi proteaz inhibitörlerin de artışı gösterilmiştir [162]. Gerçekleştirilen tez çalışması ile karşılaştırıldığında hücrelerin farklılaştırılmadığı ve kalsiyum karbonat ile uyarım yerine kalsiyum ile uyarımın gerçekleştirildiği görülmüştür. Ayrıca CaCO_3 içerisindeki kalsiyum içeriğinin KLK inhibitörlerinin de ifadesini arttırmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle sert suyun KLK'lar üzerindeki etkisinin daha net bir şekilde gösterilmesi için ilerleyen dönemlerde başta LEKTI inhibitörü olmak üzere diğer inhibitörlerin rolü ilerleyen dönemde gösterilmesi planlanmaktadır.

Kalsiyum karbonatın KLK'lar üzerindeki etkisine dair yapılan çalışmalar sınırlıdır. 2022 yılında Lu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada KLK'lar CaCO_3 magnetik mikroküreleri ile tutulmuştur. Bu tutulma sonrasında kallikrein aktivitesinin %80 oranında azaldığı ve immobilize oldukları gözlenmiştir [163]. Gerçekleştirilen bu çalışma, tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz azalan KLK sonuçları ile ilişkilendirilebileceği ve CaCO_3 'ün beklenilenin aksine KLK ifadesinde azalmaya neden olarak deri bariyerinde proteaz-antiproteaz dengesizliğine yol açabileceğini göstermektedir.

Tez çalışması kapsamında atopik dermatit hastalığında rol oynadığı bilinen epitel hücre yüzey reseptörlerinden TLR-2 reseptörünün C29 ve SsnB blokanlarıyla bloklanmasıyla KLK-5, KLK-7 ve LL-37 ifadeleri/seviyeleri gerçekleştirilen gerçek-zamanlı PZR ve ELISA deneyleri sonucunda bazı koşullarda hem artış hem de azalış göstermiştir. Bir başka deri hastalığı olan gül hastalığında artan TLR-2 ifadesinin KLK-5'i aktive edebildiği ve bunun sonucu olarak LL-37 seviyesinde artışın meydana geldiği tespit edilmiştir [164]. Bu bilginin yanı sıra artan kalsiyum konsantrasyonunun da TLR-2 üzerinden KLK-5 ifadesinin artışına sebep olduğu gösterilmiştir [87]. Her ne kadar AD durumunda TLR-2 ile KLK ailesinin ilişkisini doğrudan gösteren bir çalışma bulunmasa da deride meydana gelen inflamasyonda hem TLR-2'nin hem de KLK-5'in önemli rol oynamaları nedeniyle birbirileriyle ilişki içerisinde oldukları düşünülmektedir. Bu nedenle tez deneylerinde TLR-2 reseptörünün bloklanması sonucu KLK-5, KLK-7 ve LL-37 seviyelerindeki düşüş literatürde yer alan bilgiler ile örtüşmektedir. Tez deneylerinden elde edilen bu sonuçlar hem AD durumunda hem de sağlıklı koşulda sert suyun etkisine bağlı olarak ortaya çıkan inflamatuvar cevabın kısmen de olsa baskılayabildiği tespit edilmiştir. Öte yandan, blokanların varlığıyla artan KLK üyeleri ve LL-37 seviyesi hakkında literatürde yer alan bilgiler oldukça kısıtlıdır ve bu durumun ortaya çıkmasında muhtemel olarak birden fazla durumun etkili olduğunu düşünmekteyiz. Bu etkenlerin başında her ne kadar kullanılan blokanların sitotoksik bir etkiye neden olmadığı tez çalışması kapsamında gösterilmiş olsa da hücrelerde inflamatuvar hasara neden olarak ilgili genlerin/proteinlerin seviyesinde artışa neden olabileceğidir. Bir diğer neden olarak TLR-2 reseptörünün bloklanması sonucunda sert su etkisinin epitel hücre yüzey reseptörlerinden PAR-2 üzerinden etkisini gösterip inflamasyona neden olabileceğidir. Bir diğer potansiyel sebep olarak da KLK ailesinin aktivatörü olarak rol yapan MMP ailesinin TLR-2'nin C29 ve SsnB ile bloklanması sonucunda artan kalsiyum konsantrasyonu sonucu aktive olmasıyla KLK seviyesini arttırabileceğidir [165, 166].

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin artması ve anti-oksidan savunma kapasitesinin bu artışı durduramadığı durumlarda meydana gelmektedir. Deride ROS birikiminin AD patogenezine katkıda bulunduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. ROS

miktarındaki artış deride bulunan immün hücrelerinin aktive olmasına ve pro-inflamatuvar bir yanıtın oluşturulmasında etkili olduğu ve bu yol ile AD patogeneze katkıda bulunduğu literatürde yer alan çalışmalar ile gösterilmiştir. ROS ile AD arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalarda KLK-5 ve LL-37'nin keratinosit ve inflamatuvar hücreler üzerinde ROS üretimini indüklediği tespit edilmiştir. Ancak literatürde yer alan ROS ile AD ilişkisini gösteren çalışmalarda uyaran olarak CaCO_3 kullanılmamış ve eozinofillerin AD durumunda oksidatif strese verdiği katkı hakkında bilinen bilgiler kısıtlıdır. *In vivo* ortamda gerçekleştirilen ve eozinofillerin AD patogenezinde oksidatif stres üzerinden nasıl rol oynadığını göstermeyi çalışan bir çalışmada eozinofillerin özellikle NADPH oksidazı aktive ederek oksidatif strese neden olduğu tespit edilmiştir [167]. Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında ko-kültüre alınan HaCaT ve eol-1 hücre hattının CaCO_3 ile karşılaşması sonucu eozinofillerden salınan oksidatif stres genlerinin düzeylerinin incelenmesi ve AD ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Gerçek-zamanlı PZR deneyi ile elde edilen sonuçlar AD-modelinin kurulmadığı deney düzeneğinde AD durumu için biyobelirteç olarak da kullanılan süperoksit dismutaz (SOD)-1 geninin ifadesinde 180 mg/L CaCO_3 ile uyarılması sonucu artış meydana geldiği ve ortama konulan C29 ile SsnB blokanları ile bu artışın durdurulduğu anlaşılmıştır. SOD-1 genine ek olarak AD durumunda oksidatif stres için biyobelirteç olarak kullanılan bir başka gen olan ApoE ifadesinin de 180 mg/L CaCO_3 ile artış gösterdiği tespit edilmiştir [125]. Elde edilen bu sonuçlara rağmen AD durumundan ve uyarım saatinden bağımsız olarak ortamda var olan SsnB blokunu tez çalışması kapsamında incelenen genler arasında özellikle eozinofil ile bağlantılı olan genlerin (CCL5, NOX4 ve NOS2) ifadesini arttırdığı tespit edilmiştir. SsnB'nin varlığıyla elde edilen bu sonuç *in vivo* ortamda SsnB ile gerçekleştirilen bir çalışmada elde edilen ROS artışı ile örtüşmektedir [168]. Bu nedenle C29'un ROS üretimini durdurmada SsnB'ye kıyasla daha başarılı olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, CaCO_3 'ün etkisi ile artan SOD-1 ve ApoE genleri ile eozinofillerin oksidatif strese yol açabileceği de tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] J. Ring, Atopic dermatitis: eczema, Springer 2016.
- [2] S. Weidinger, L.A. Beck, T. Bieber, K. Kabashima, A.D. Irvine, Atopic dermatitis, *Nat Rev Dis Primers*, 4 (2018) 1.
- [3] M. Laughter, M. Maymone, S. Mashayekhi, B. Arents, C. Karimkhani, S. Langan, R. Dellavalle, C. Flohr, The global burden of atopic dermatitis: lessons from the Global Burden of Disease Study 1990–2017, *British Journal of Dermatology*, 184 (2021) 304-309.
- [4] J. Sroka-Tomaszewska, M. Trzeciak, Molecular mechanisms of atopic dermatitis pathogenesis, *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (2021) 4130.
- [5] J. Silvestre Salvador, D. Romero-Pérez, B. Encabo-Durán, Atopic dermatitis in adults: a diagnostic challenge, *J Investig Allergol Clin Immunol*, 27 (2017) 78-88.
- [6] T. Tsakok, R. Woolf, C. Smith, S. Weidinger, C. Flohr, Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond, *British Journal of Dermatology*, 180 (2019) 464-474.
- [7] D. Doğruel, G. Bingöl, D. Altıntaş, M. Yılmaz, S.G. Kendirli, Prevalence of and risk factors for atopic dermatitis: a birth cohort study of infants in southeast Turkey, *Allergologia et immunopathologia*, 44 (2016) 214-220.
- [8] M.E. Bilgili, H. Yildiz, G. Sarici, Prevalence of skin diseases in a dermatology outpatient clinic in Turkey. A cross-sectional, retrospective study, *Journal of dermatological case reports*, 7 (2013) 108.
- [9] E. Tamer, M.N. İlhan, M. Polat, N. Lenk, N. Alli, Prevalence of skin diseases among pediatric patients in Turkey, *The Journal of dermatology*, 35 (2008) 413-418.
- [10] G.J. Patrick, N.K. Archer, L.S. Miller, Which way do we go? Complex interactions in atopic dermatitis pathogenesis, *Journal of investigative dermatology*, 141 (2021) 274-284.
- [11] S.C. Jones, Overview of Immunology and Allergy, *Allergy and Asthma: The Basics to Best Practices*, Springer International Publishing, Cham, 2019, pp. 3-29.
- [12] T. Yoshida, L.A. Beck, A. De Benedetto, Skin barrier defects in atopic dermatitis: From old idea to new opportunity, *Allergology International*, 71 (2022) 3-13.
- [13] D.A. Hill, J.M. Spergel, The atopic march: critical evidence and clinical relevance, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 120 (2018) 131-137.
- [14] L. Yang, J. Fu, Y. Zhou, Research progress in atopic march, *Frontiers in immunology*, 11 (2020) 1907.
- [15] M. Tsuge, M. Ikeda, N. Matsumoto, T. Yorifuji, H. Tsukahara, Current insights into atopic march, *Children*, 8 (2021) 1067.
- [16] S.C. Dharmage, A. Lowe, M.C. Matheson, J. Burgess, K. Allen, M.J. Abramson, Atopic dermatitis and the atopic march revisited, *Allergy*, 69 (2014) 17-27.
- [17] S. Somanunt, J. Veskitkul, P. Pacharn, N. Visitsunthorn, P. Vichyanond, O. Jirapongsananuruk, The Natural History of Atopic Dermatitis and Its Association with Atopic March, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137 (2016) AB148.

- [18] L.B. von Kobyletzki, C.-G. Bornehag, M. Hasselgren, M. Larsson, C.B. Lindström, Å. Svensson, Eczema in early childhood is strongly associated with the development of asthma and rhinitis in a prospective cohort, *BMC dermatology*, 12 (2012) 1-9.
- [19] Z. Zhang, P. Hener, N. Frossard, S. Kato, D. Metzger, M. Li, P. Chambon, Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (2009) 1536-1541.
- [20] H. Han, F. Roan, S.F. Ziegler, The atopic march: current insights into skin barrier dysfunction and epithelial cell-derived cytokines, *Immunological reviews*, 278 (2017) 116-130.
- [21] S. Weidinger, L.A. Beck, T. Bieber, K. Kabashima, A.D. Irvine, Atopic dermatitis, *Nature Reviews Disease Primers*, 4 (2018) 1.
- [22] M. Mazur, H. Tomczak, M. Łodyga, K. Plagens-Rotman, P. Merks, M. Czarnecka-Operacz, The Intestinal and Skin Microbiome in Patients with Atopic Dermatitis and Their Influence on the Course of the Disease: A Literature Review, *Healthcare*, MDPI, 2023, pp. 766.
- [23] L.P. Ngoc, D.R. Gold, A.O. Tzianabos, S.T. Weiss, J.C. Celedon, Cytokines, allergy, and asthma, *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 5 (2005) 161-166.
- [24] P. Licona-Limón, L.K. Kim, N.W. Palm, R.A. Flavell, TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells, *Nature immunology*, 14 (2013) 536-542.
- [25] T.A. Platts-Mills, J.A. Woodfolk, Allergens and their role in the allergic immune response, *Immunological reviews*, 242 (2011) 51-68.
- [26] F.-T. Liu, H. Goodarzi, H.-Y. Chen, IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis, *Clinical reviews in allergy & immunology*, 41 (2011) 298-310.
- [27] T. Werfel, J.-P. Allam, T. Biedermann, K. Eyerich, S. Gilles, E. Guttman-Yassky, W. Hoetzenecker, E. Knol, H.-U. Simon, A. Wollenberg, Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis, *Journal of allergy and clinical immunology*, 138 (2016) 336-349.
- [28] J.E. Kim, J.S. Kim, D.H. Cho, H.J. Park, Molecular mechanisms of cutaneous inflammatory disorder: atopic dermatitis, *International journal of molecular sciences*, 17 (2016) 1234.
- [29] D. Simon, L. Braathen, H.U. Simon, Eosinophils and atopic dermatitis, *Allergy*, 59 (2004) 561-570.
- [30] K.-i. Yamanaka, H. Mizutani, The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis, *Pathogenesis and Management of Atopic Dermatitis*, 41 (2011) 80-92.
- [31] Z. Mu, Y. Zhao, X. Liu, C. Chang, J. Zhang, Molecular biology of atopic dermatitis, *Clinical reviews in allergy & immunology*, 47 (2014) 193-218.
- [32] M. Sugaya, The role of Th17-related cytokines in atopic dermatitis, *International journal of molecular sciences*, 21 (2020) 1314.
- [33] K. Eyerich, D. Pennino, C. Scarponi, S. Foerster, F. Nasorri, H. Behrendt, J. Ring, C. Traidl-Hoffmann, C. Albanesi, A. Cavani, IL-17 in atopic eczema: linking

- allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123 (2009) 59-66. e54.
- [34] J. Esparza-Gordillo, S. Weidinger, R. Fölster-Holst, A. Bauerfeind, F. Ruschendorf, G. Patone, K. Rohde, I. Marenholz, F. Schulz, T. Kerscher, A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis, *Nature genetics*, 41 (2009) 596-601.
- [35] D.J. Margolis, J. Gupta, A.J. Apter, T. Ganguly, O. Hoffstad, M. Papadopoulos, T.R. Rebbeck, N. Mitra, Filaggrin-2 variation is associated with more persistent atopic dermatitis in African American subjects, *Journal of allergy and clinical immunology*, 133 (2014) 784-789.
- [36] I. Marenholz, V.A.G. Rivera, J. Esparza-Gordillo, A. Bauerfeind, M.-A. Lee-Kirsch, A. Ciechanowicz, M. Kurek, T. Piskackova, M. Macek, Y.-A. Lee, Association screening in the Epidermal Differentiation Complex (EDC) identifies an SPRR3 repeat number variant as a risk factor for eczema, *Journal of investigative dermatology*, 131 (2011) 1644-1649.
- [37] K.Y. Park, K. Li, J. Seok, S.J. Seo, An analysis of the filaggrin gene polymorphism in Korean atopic dermatitis patients, *Journal of Korean Medical Science*, 31 (2016) 1136-1142.
- [38] L. Bin, D.Y. Leung, Genetic and epigenetic studies of atopic dermatitis, *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 12 (2016) 1-14.
- [39] E.H. Choi, Genetics of atopic dermatitis, *Practical Insights into Atopic Dermatitis*, Springer2021, pp. 65-74.
- [40] R. Kantor, J.I. Silverberg, Environmental risk factors and their role in the management of atopic dermatitis, *Expert review of clinical immunology*, 13 (2017) 15-26.
- [41] P. Kathuria, J. Silverberg, Association of pollution and climate with atopic eczema in US children, *Pediatric Allergy and Immunology*, 27 (2016) 478-485.
- [42] M. Denda, J. Sato, T. Tsuchiya, P.M. Elias, K.R. Feingold, Low humidity stimulates epidermal DNA synthesis and amplifies the hyperproliferative response to barrier disruption: implication for seasonal exacerbations of inflammatory dermatoses, *Journal of investigative dermatology*, 111 (1998) 873-878.
- [43] M.M. Suárez-Varela, L. García-Marcos Alvarez, M.D. Kogan, A.L. González, A.M. Gimeno, I.A. Ontoso, C.G. Díaz, A.A. Pena, B.D. Aurrecoechea, R.M.B. Monge, Climate and prevalence of atopic eczema in 6-to 7-year-old school children in Spain. ISAAC phase III, *International Journal of Biometeorology*, 52 (2008) 833-840.
- [44] J.I. Silverberg, J. Hanifin, E.L. Simpson, Climatic factors are associated with childhood eczema prevalence in the United States, *Journal of Investigative Dermatology*, 133 (2013) 1752-1759.
- [45] M.R. Sargen, O. Hoffstad, D.J. Margolis, Warm, humid, and high sun exposure climates are associated with poorly controlled eczema: PEER (Pediatric Eczema Elective Registry) cohort, 2004–2012, *Journal of Investigative Dermatology*, 134 (2014) 51-57.
- [46] C. Flohr, J. Mann, New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis, *Allergy*, 69 (2014) 3-16.

- [47] M. Wang, C. Karlsson, C. Olsson, I. Adlerberth, A.E. Wold, D.P. Strachan, P.M. Martricardi, N. Åberg, M.R. Perkin, S. Tripodi, Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema, *Journal of allergy and clinical immunology*, 121 (2008) 129-134.
- [48] M. Visser, L. Landeck, L. Campbell, W. McLean, S. Weidinger, F. Calkoen, S. John, S. Kezic, Impact of atopic dermatitis and loss-of-function mutations in the filaggrin gene on the development of occupational irritant contact dermatitis, *British Journal of Dermatology*, 168 (2013) 326-332.
- [49] G. Mócsai, K. Gáspár, G. Nagy, B. Irinyi, A. Kapitány, T. Bíró, E. Gyimesi, B. Tóth, L. Maródi, A. Szegedi, Severe skin inflammation and filaggrin mutation similarly alter the skin barrier in patients with atopic dermatitis, *British Journal of Dermatology*, 170 (2014) 617-624.
- [50] N. Stefanovic, C. Flohr, A.D. Irvine, The exposome in atopic dermatitis, *Allergy*, 75 (2020) 63-74.
- [51] C. Pénard-Morand, C. Raherison, D. Charpin, C. Kopferschmitt, F. Lavaud, D. Caillaud, I. Annesi-Maesano, Long-term exposure to close-proximity air pollution and asthma and allergies in urban children, *European Respiratory Journal*, 36 (2010) 33-40.
- [52] K. Ahn, The role of air pollutants in atopic dermatitis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134 (2014) 993-999.
- [53] C.-G. Bornehag, J. Sundell, L. Hägerhed-Engman, T. Sigsgaard, Association between ventilation rates in 390 Swedish homes and allergic symptoms in children, *Indoor air*, 15 (2005) 275-280.
- [54] C.G. Carson, M.A. Rasmussen, J.P. Thyssen, T. Menne, H. Bisgaard, Clinical presentation of atopic dermatitis by filaggrin gene mutation status during the first 7 years of life in a prospective cohort study, *PLoS One*, 7 (2012) e48678.
- [55] H. Ji, X.-K. Li, Oxidative stress in atopic dermatitis, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016 (2016).
- [56] K. Nakai, D. Tsuruta, What are reactive oxygen species, free radicals, and oxidative stress in skin diseases?, *International journal of molecular sciences*, 22 (2021) 10799.
- [57] R. Novriani, A. Thaha, S. Diba, Y.F. Yahya, I.A. Aryani, The Role of Oxidative Stress in Atopic Dermatitis, *Bioscientia Medicina: Journal of Biomedicine and Translational Research*, 6 (2022) 2347-2352.
- [58] N. Sivaranjani, S.V. Rao, G. Rajeev, Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis, *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 7 (2013) 2683.
- [59] D.-I. Choi, J.-H. Park, J.-Y. Choi, M. Piao, M.-S. Suh, J.-B. Lee, S.-J. Yun, S.-C. Lee, Keratinocytes-derived reactive oxygen species play an active role to induce type 2 inflammation of the skin: a pathogenic role of reactive oxygen species at the early phase of atopic dermatitis, *Annals of Dermatology*, 33 (2021) 26.
- [60] G. Agrahari, S.K. Sah, C.T. Nguyen, S.S. Choi, H.-Y. Kim, T.-Y. Kim, Superoxide dismutase 3 inhibits LL-37/KLK-5-mediated skin inflammation through

- modulation of EGFR and associated inflammatory cascades, *Journal of Investigative Dermatology*, 140 (2020) 656-665. e658.
- [61] G.S. Tjabringa, D.K. Ninaber, J.W. Drijfhout, K.F. Rabe, P.S. Hiemstra, Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors, *International archives of allergy and immunology*, 140 (2006) 103-112.
- [62] J. Sun, B. Dahlén, B. Agerberth, J. Haeggström, The antimicrobial peptide LL-37 induces synthesis and release of cysteinyl leukotrienes from human eosinophils—implications for asthma, *Allergy*, 68 (2013) 304-311.
- [63] P. Sengupta, Potential health impacts of hard water, *International journal of preventive medicine*, 4 (2013) 866.
- [64] N. McNally, H. Williams, D. Phillips, M. Smallman-Raynor, S. Lewis, A. Venn, J. Britton, Atopic eczema and domestic water hardness, *The Lancet*, 352 (1998) 527-531.
- [65] Y. Miyake, T. Yokoyama, A. Yura, M. Iki, T. Shimizu, Ecological association of water hardness with prevalence of childhood atopic dermatitis in a Japanese urban area, *Environmental research*, 94 (2004) 33-37.
- [66] E. Rubenowitz-Lundin, K.M. Hiscock, Water hardness and health effects, *Essentials of Medical Geology: Revised Edition*, Springer 2012, pp. 337-350.
- [67] M.R. Perkin, J. Craven, K. Logan, D. Strachan, T. Marrs, S. Radulovic, L.E. Campbell, S.F. MacCallum, W.I. McLean, G. Lack, Association between domestic water hardness, chlorine, and atopic dermatitis risk in early life: a population-based cross-sectional study, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138 (2016) 509-516.
- [68] K.A. Engebretsen, P. Bager, J. Wohlfahrt, L. Skov, C. Zachariae, A.-M.N. Andersen, M. Melbye, J.P. Thyssen, Prevalence of atopic dermatitis in infants by domestic water hardness and season of birth: cohort study, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139 (2017) 1568-1574. e1561.
- [69] J. Hui-Beckman, D.Y. Leung, E. Goleva, Hand hygiene impact on the skin barrier in health care workers and individuals with atopic dermatitis, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 128 (2022) 108-110.
- [70] A.B. Simonsen, I.F. Ruge, A.S. Quaade, J.D. Johansen, J.P. Thyssen, C. Zachariae, Increased occurrence of hand eczema in young children following the Danish hand hygiene recommendations during the COVID-19 pandemic, *Contact Dermatitis*, 84 (2021) 144-152.
- [71] G. McKnight, J. Shah, R. Hargest, *Physiology of the skin*, Surgery (Oxford), 40 (2022) 8-12.
- [72] P.A. Kolarsick, M.A. Kolarsick, C. Goodwin, Anatomy and physiology of the skin, *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3 (2011) 203-213.
- [73] T. Matsui, M. Amagai, Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum, *International immunology*, 27 (2015) 269-280.
- [74] G. Yang, J.K. Seok, H.C. Kang, Y.-Y. Cho, H.S. Lee, J.Y. Lee, Skin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis, *International journal of molecular sciences*, 21 (2020) 2867.

- [75] T. Nakahara, M. Kido-Nakahara, G. Tsuji, M. Furue, Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis, *The Journal of dermatology*, 48 (2021) 130-139.
- [76] S. Kezic, N. Novak, I. Jakasa, J.M. Jungersted, M. Simon, J.M. Brandner, M.A. Middelkamp-Hup, S. Weidinger, Skin barrier in atopic dermatitis, *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 19 (2014) 542-556.
- [77] M. Furue, G. Tsuji, C. Mitoma, T. Nakahara, T. Chiba, S. Morino-Koga, H. Uchi, Gene regulation of filaggrin and other skin barrier proteins via aryl hydrocarbon receptor, *Journal of dermatological science*, 80 (2015) 83-88.
- [78] D.Y. Leung, E. Berdyshev, E. Goleva, Cutaneous barrier dysfunction in allergic diseases, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145 (2020) 1485-1497.
- [79] M.A. McAleer, A.D. Irvine, The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131 (2013) 280-291.
- [80] A.L. Byrd, Y. Belkaid, J.A. Segre, The human skin microbiome, *Nature Reviews Microbiology*, 16 (2018) 143-155.
- [81] D. Hrestak, M. Matijašić, H. Čipčić Paljetak, D. Ledić Drvar, S. Ljubojević Hadžavdić, M. Perić, Skin Microbiota in Atopic Dermatitis, *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (2022) 3503.
- [82] M. Doss, M.R. White, T. Tecle, K.L. Hartshorn, Human defensins and LL-37 in mucosal immunity, *Journal of leukocyte biology*, 87 (2010) 79-92.
- [83] A. Fabisiak, N. Murawska, J. Fichna, LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity, *Pharmacological Reports*, 68 (2016) 802-808.
- [84] H.L.T. Nguyen, J.V. Trujillo-Paez, Y. Umehara, H. Yue, G. Peng, C. Kiatsurayanon, P. Chieosilapatham, P. Song, K. Okumura, H. Ogawa, Role of antimicrobial peptides in skin barrier repair in individuals with atopic dermatitis, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2020) 7607.
- [85] L. Sun, W. Liu, L.-j. Zhang, The role of toll-like receptors in skin host defense, psoriasis, and atopic dermatitis, *Journal of immunology research*, 2019 (2019).
- [86] H.D. De Koning, A. Simon, P.L. Zeeuwen, J. Schalkwijk, Pattern recognition receptors in immune disorders affecting the skin, *Journal of innate immunity*, 4 (2012) 225-240.
- [87] K. Yamasaki, K. Kanada, D.T. Macleod, A.W. Borkowski, S. Morizane, T. Nakatsuji, A.L. Cogen, R.L. Gallo, TLR2 expression is increased in rosacea and stimulates enhanced serine protease production by keratinocytes, *Journal of Investigative Dermatology*, 131 (2011) 688-697.
- [88] Ö. Kalayci, EPITHELIAL PROTEASES AND ALLERGIC DISEASES, in: I.A. Cezmi A. Akdis (Ed.) *GLOBAL ATLAS OF ALLERGY* 2014.
- [89] S.E. Lee, S.K. Jeong, S.H. Lee, Protease and protease-activated receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis, *Yonsei medical journal*, 51 (2010) 808-822.
- [90] S.K. Jeong, H.J. Kim, J.-K. Youm, S.K. Ahn, E.H. Choi, M.H. Sohn, K.-E. Kim, J.H. Hong, D.M. Shin, S.H. Lee, Mite and cockroach allergens activate protease-activated receptor 2 and delay epidermal permeability barrier recovery, *Journal of Investigative Dermatology*, 128 (2008) 1930-1939.

- [91] S.G. Danby, M.J. Cork, The skin barrier in atopic dermatitis, *Harper's textbook of pediatric dermatology*, 1 (2011) 27.21-27.18.
- [92] S. Weidinger, N. Novak, Atopic dermatitis, *Lancet*, 387 (2016) 1109-1122.
- [93] Y. Xia, H. Cao, J. Zheng, L. Chen, Claudin-1 Mediated Tight Junction Dysfunction as a Contributor to Atopic March, *Frontiers in Immunology*, 13 (2022).
- [94] S. Katsarou, M. Makris, E. Vakirlis, S. Gregoriou, The Role of Tight Junctions in Atopic Dermatitis: A Systematic Review, *Journal of Clinical Medicine*, 12 (2023) 1538.
- [95] R. Fölster-Holst, The role of the skin microbiome in atopic dermatitis—correlations and consequences, *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 20 (2022) 571-577.
- [96] L.F. Koh, R.Y. Ong, J.E. Common, Skin microbiome of atopic dermatitis, *Allergology International*, 71 (2022) 31-39.
- [97] L. Mallbris, L. Carlen, T. Wei, J. Heilborn, M.F. Nilsson, F. Granath, M. Ståhle, Injury downregulates the expression of the human cathelicidin protein hCAP18/LL-37 in atopic dermatitis, *Experimental dermatology*, 19 (2010) 442-449.
- [98] T. Akiyama, F. Niyonsaba, C. Kiatsurayanon, H. Ushio, T. Fujimura, T. Ueno, K. Okumura, H. Ogawa, S. Ikeda, The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function, *Journal of innate immunity*, 6 (2014) 739-753.
- [99] M. Kishibe, Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis, *Journal of Dermatological Science*, 95 (2019) 50-55.
- [100] G. Sotiropoulou, G. Pampalakis, E.P. Diamandis, Functional roles of human kallikrein-related peptidases, *Journal of Biological Chemistry*, 284 (2009) 32989-32994.
- [101] S. Morizane, The role of kallikrein-related peptidases in atopic dermatitis, *Acta Medica Okayama*, 73 (2019) 1-6.
- [102] P. Goettig, V. Magdolen, H. Brandstetter, Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs), *Biochimie*, 92 (2010) 1546-1567.
- [103] M.B. Zani, A.M. Sant'Ana, R.C. Tognato, J.R. Chagas, L. Puzer, Human tissue kallikreins-related peptidases are targets for the treatment of skin desquamation diseases, *Frontiers in Medicine*, 8 (2022) 2560.
- [104] Å. Lundwall, M. Brattsand, Kallikrein-related peptidases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (2008) 2019-2038.
- [105] A.F. Deyrieux, V.G. Wilson, In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line, *Cytotechnology*, 54 (2007) 77-83.
- [106] J.S. Oh, G.S. Seong, Y.D. Kim, S.Y. Choung, Effects of deacetylasperulosidic acid on atopic dermatitis through modulating immune balance and skin barrier function in HaCaT, HMC-1, and EOL-1 Cells, *Molecules*, 26 (2021) 3298.
- [107] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65 (1983) 55-63.
- [108] P. Mistry, M.H. Laird, R.S. Schwarz, S. Greene, T. Dyson, G.A. Snyder, T.S. Xiao, J. Chauhan, S. Fletcher, V.Y. Toshchakov, Inhibition of TLR2 signaling by

- small molecule inhibitors targeting a pocket within the TLR2 TIR domain, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (2015) 5455-5460.
- [109] G. Li, X. Tang, S. Zhang, Z. Deng, B. Wang, W. Shi, H. Xie, B. Liu, J. Li, Aging-Conferred SIRT7 Decline Inhibits Rosacea-Like Skin Inflammation by Modulating Toll-Like Receptor 2–NF- κ B Signaling, *Journal of Investigative Dermatology*, 142 (2022) 2580-2590. e2586.
- [110] M. Kawaguchi, A. Kanemaru, A. Sawaguchi, K. Yamamoto, T. Baba, C.-Y. Lin, M.D. Johnson, T. Fukushima, H. Kataoka, Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor Type 1 Maintains the Assembly of Keratin into Desmosomes in Keratinocytes by Regulating Protease-Activated Receptor 2–Dependent p38 Signaling, *The American journal of pathology*, 185 (2015) 1610-1623.
- [111] Q. Liang, Q. Wu, J. Jiang, C. Wang, M.D. Smith, H. Lu, Q. Wang, P. Nagarkatti, D. Fan, Characterization of sparstolonin B, a Chinese herb-derived compound, as a selective Toll-like receptor antagonist with potent anti-inflammatory properties, *Journal of Biological Chemistry*, 286 (2011) 26470-26479.
- [112] L.T.-H. Hsieh, H. Frey, M.-V. Nastase, C. Tredup, A. Hoffmann, C. Poluzzi, J. Zeng-Brouwers, T. Manon-Jensen, K. Schröder, R.P. Brandes, Bimodal role of NADPH oxidases in the regulation of biglycan-triggered IL-1 β synthesis, *Matrix Biology*, 49 (2016) 61-81.
- [113] I. Colombo, E. Sangiovanni, R. Maggio, C. Mattozzi, S. Zava, Y. Corbett, M. Fumagalli, C. Carlino, P.A. Corsetto, D. Scaccabarozzi, HaCaT cells as a reliable in vitro differentiation model to dissect the inflammatory/repair response of human keratinocytes, *Mediators of inflammation*, 2017 (2017).
- [114] H.J. Kim, J. Baek, J.R. Lee, J.Y. Roh, Y. Jung, Optimization of cytokine milieu to reproduce atopic dermatitis-related gene expression in HaCaT keratinocyte cell line, *Immune Network*, 18 (2018).
- [115] A. Fullár, J. Dudás, L. Oláh, P. Hollósi, Z. Papp, G. Sobel, K. Karászi, S. Paku, K. Baghy, I. Kovalszky, Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression, *BMC cancer*, 15 (2015) 1-16.
- [116] S. Lei, Q. Zhang, F. Yin, X. He, J. Wang, Expression and clinical significance of KLK5-8 in endometrial cancer, *American journal of translational research*, 11 (2019) 4180.
- [117] J. McGovern, C. Meinert, S. de Veer, B. Hollier, T. Parker, Z. Upton, Attenuated kallikrein-related peptidase activity disrupts desquamation and leads to stratum corneum thickening in human skin equivalent models, *British Journal of Dermatology*, 176 (2017) 145-158.
- [118] M. Peric, S. Koglin, Y. Dombrowski, K. Groß, E. Bradac, A. Büchau, A. Steinmeyer, U. Zügel, T. Ruzicka, J. Schaubert, Vitamin D analogs differentially control antimicrobial peptide/“alarmin” expression in psoriasis, *PloS one*, 4 (2009) e6340.
- [119] M. Furukawa, K. Yamada, M. Kurosawa, Y. Shikama, J. Wang, M. Watanabe, T. Kanekura, K. Matsushita, High concentration of glucose induces filaggrin-1 expression through AP-1 in skin keratinocytes, *Journal of Dermatological Science*, 98 (2020) 137-140.

- [120] S. Pagani, M. Minguzzi, L. Sicuro, F. Veronesi, S. Santi, A. Scotto D'Abusco, M. Fini, R.M. Borzì, The N-acetyl phenylalanine glucosamine derivative attenuates the inflammatory/catabolic environment in a chondrocyte-synoviocyte co-culture system, *Scientific Reports*, 9 (2019) 1-15.
- [121] R.B. Zak, R.J. Shute, M.W. Heesch, D.T. La Salle, M.P. Bubak, N.E. Dinan, T.L. Laursen, D.R. Slivka, Impact of hot and cold exposure on human skeletal muscle gene expression, *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 42 (2017) 319-325.
- [122] J. Wang, X. Yu, X. Cao, L. Tan, B. Jia, R. Chen, J. Li, GAPDH: A common housekeeping gene with an oncogenic role in pan-cancer, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, (2023).
- [123] B. Beken, R. Serttas, M. Yazicioglu, K. Turkecul, S. Erdogan, Quercetin improves inflammation, oxidative stress, and impaired wound healing in atopic dermatitis model of human keratinocytes, *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology*, 33 (2020) 69-79.
- [124] M. Canavese, F. Altruda, L. Silengo, Therapeutic efficacy and immunological response of CCL5 antagonists in models of contact skin reaction, *PloS one*, 5 (2010) e8725.
- [125] W.K. Kim, H.-R. Hwang, D.H. Kim, P.Y. Lee, Y.J. In, H.-Y. Ryu, S.G. Park, K.-H. Bae, S.C. Lee, Glycoproteomic analysis of plasma from patients with atopic dermatitis: CD5L and ApoE as potential biomarkers, *Experimental & molecular medicine*, 40 (2008) 677-685.
- [126] L. Bertino, F. Guarneri, S.P. Cannavò, M. Casciaro, G. Pioggia, S. Gangemi, Oxidative stress and atopic dermatitis, *Antioxidants*, 9 (2020) 196.
- [127] A. Hüls, C. Klümper, E.A. MacIntyre, M. Brauer, E. Melén, M. Bauer, D. Berdel, A. Bergström, B. Brunekreef, M. Chan-Yeung, Atopic dermatitis: Interaction between genetic variants of GSTP 1, TNF, TLR 2, and TLR 4 and air pollution in early life, *Pediatric Allergy and Immunology*, 29 (2018) 596-605.
- [128] A.P. Villani, A.B. Pavel, J. Wu, M. Fernandes, C. Maari, E. Saint-Cyr Proulx, C. Jack, J. Glickman, S. Choi, H. He, Vascular inflammation in moderate-to-severe atopic dermatitis is associated with enhanced Th2 response, *Allergy*, 76 (2021) 3107-3121.
- [129] H. Emmert, M. Fonfara, E. Rodriguez, S. Weidinger, NADPH oxidase inhibition rescues keratinocytes from elevated oxidative stress in a 2D atopic dermatitis and psoriasis model, *Experimental Dermatology*, 29 (2020) 749-758.
- [130] N. Garzorz, K. Eyerich, NOS2 and CCL27: clinical implications for psoriasis and eczema diagnosis and management, *Expert Review of Clinical Immunology*, 11 (2015) 167-169.
- [131] Z. Dong, P. Saikumar, J.M. Weinberg, M.A. Venkatachalam, Calcium in cell injury and death, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1 (2006) 405-434.
- [132] S.L. Kale, N. Arora, Per a 10 activates human derived epithelial cell line in a protease dependent manner via PAR-2, *Immunobiology*, 220 (2015) 525-532.
- [133] L.-L. Chiu, D.-W. Perng, C.-H. Yu, S.-N. Su, L.-P. Chow, Mold allergen, pen C 13, induces IL-8 expression in human airway epithelial cells by activating

- protease-activated receptor 1 and 2, *The Journal of Immunology*, 178 (2007) 5237-5244.
- [134] V.G. Wilson, Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes, *Epidermal Cells: Methods and Protocols*, (2014) 33-41.
- [135] M. Gunay, E. Gocer, R. Balasubramanian, Machine learning for optimum CT-prediction for qPCR, 2016 15th IEEE international conference on machine learning and applications (ICMLA), IEEE, 2016, pp. 588-592.
- [136] Y. Hatano, Y. Adachi, P.M. Elias, D. Crumrine, T. Sakai, R. Kurahashi, K. Katagiri, S. Fujiwara, The T h2 cytokine, interleukin-4, abrogates the cohesion of normal stratum corneum in mice: implications for pathogenesis of atopic dermatitis, *Experimental dermatology*, 22 (2013) 30-35.
- [137] S. Morizane, K. Sunagawa, H. Nomura, M. Ouchida, Aberrant serine protease activities in atopic dermatitis, *Journal of dermatological science*, (2022).
- [138] C.T. Di Paolo, E.P. Diamandis, I. Prassas, The role of kallikreins in inflammatory skin disorders and their potential as therapeutic targets, *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 58 (2021) 1-16.
- [139] L. Yu, L. Li, Potential biomarkers of atopic dermatitis, *Frontiers in Medicine*, 9 (2022) 1028694.
- [140] A. Shafiu Kamba, M. Ismail, T.A. Tengku Ibrahim, Z.A.B. Zakaria, L. Hassan Gusau, In vitro ultrastructural changes of MCF-7 for metastasise bone cancer and induction of apoptosis via mitochondrial cytochrome C released by CaCO₃/Dox nanocrystals, *BioMed research international*, 2014 (2014).
- [141] J. Zhu, A. Jiao, Q. Li, X. Lv, X. Wang, X. Song, B. Li, Y. Zhang, X. Dong, Mitochondrial Ca²⁺-overloading by oxygen/glutathione depletion-boosted photodynamic therapy based on a CaCO₃ nanoplatfrom for tumor synergistic therapy, *Acta Biomaterialia*, 137 (2022) 252-261.
- [142] S. Shimizu, H. Kouzaki, T. Ogawa, K. Takezawa, I. Tojima, T. Shimizu, Eosinophil–epithelial cell interactions stimulate the production of MUC5AC mucin and profibrotic cytokines involved in airway tissue remodeling, *American journal of rhinology & allergy*, 28 (2014) 103-109.
- [143] C. Bandeira-Melo, A. Herbst, P.F. Weller, Eotaxins: contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 24 (2001) 653-657.
- [144] M.S. Sim, H.J. Kim, I. Bae, C. Kim, H.S. Chang, Y. Choi, D.-H. Lee, H.-S. Park, I.Y. Chung, Calcium ionophore-activated platelets induce eosinophil extracellular trap formation, *Allergology International*, 72 (2023) 466-476.
- [145] D. Matuz-Mares, M. González-Andrade, M.G. Araiza-Villanueva, M.M. Vilchis-Landeros, H. Vázquez-Meza, Mitochondrial calcium: effects of its imbalance in disease, *Antioxidants*, 11 (2022) 801.
- [146] M. Grabowski, M.S. Murgueitio, M. Bermudez, G. Wolber, G. Weindl, The novel small-molecule antagonist MMG-11 preferentially inhibits TLR2/1 signaling, *Biochemical Pharmacology*, 171 (2020) 113687.
- [147] M. Dufies, O. Grytsai, C. Ronco, O. Camara, D. Ambrosetti, A. Hagege, J. Parola, L. Mateo, M. Ayrault, S. Giuliano, New CXCR1/CXCR2 inhibitors represent

- an effective treatment for kidney or head and neck cancers sensitive or refractory to reference treatments, *Theranostics*, 9 (2019) 5332.
- [148] N. Yepuri, R. Dhawan, M. Cooney, N. Pruekprasert, Q. Meng, R.N. Cooney, Sparstolonin B: a unique anti-inflammatory agent, *Shock*, 52 (2019) 568-576.
- [149] Q. Liu, J. Li, Q. Liang, D. Wang, Y. Luo, F. Yu, J.S. Janicki, D. Fan, Sparstolonin B suppresses rat vascular smooth muscle cell proliferation, migration, inflammatory response and lipid accumulation, *Vascular pharmacology*, 67 (2015) 59-66.
- [150] Y.-M. Tang, Q.-Y. Cao, X.-Y. Guo, S.-H. Dong, J.-A. Duan, Q.-N. Wu, Q.-L. Liang, Inhibition of p38 and ERK1/2 pathways by Sparstolonin B suppresses inflammation-induced melanoma metastasis, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98 (2018) 382-389.
- [151] D.D. Bikle, Z. Xie, C.-L. Tu, Calcium regulation of keratinocyte differentiation, *Expert review of endocrinology & metabolism*, 7 (2012) 461-472.
- [152] S. Pillai, D.D. Bikle, M.L. Mancianti, P. Cline, M. Hincenbergs, Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium, *Journal of cellular physiology*, 143 (1990) 294-302.
- [153] B. Jia, X. Luo, F.-W. Cheng, L. Li, D.-J. Hu, F. Wang, S.-Q. Zhang, Gardiquimod inhibits the expression of calcium-induced differentiation markers in HaCaT cells, *Molecular biology reports*, 40 (2013) 6363-6369.
- [154] Y. Zhu, J. Underwood, D. Macmillan, L. Shariff, R. O'Shaughnessy, J.I. Harper, C. Pickard, P.S. Friedmann, E. Healy, W.-L. Di, Persistent kallikrein 5 activation induces atopic dermatitis-like skin architecture independent of PAR2 activity, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140 (2017) 1310-1322. e1315.
- [155] N. Komatsu, K. Saijoh, C. Kuk, A.C. Liu, S. Khan, F. Shirasaki, K. Takehara, E.P. Diamandis, Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients, *Experimental dermatology*, 16 (2007) 513-519.
- [156] C.J. Guo, M.R. Mack, L.K. Oetjen, A.M. Trier, M.L. Council, A.B. Pavel, E. Guttman-Yassky, B.S. Kim, Q. Liu, Kallikrein 7 promotes atopic dermatitis-associated itch independently of skin inflammation, *Journal of Investigative Dermatology*, 140 (2020) 1244-1252. e1244.
- [157] S. Morizane, K. Yamasaki, F.D. Kabigting, R.L. Gallo, Kallikrein expression and cathelicidin processing are independently controlled in keratinocytes by calcium, vitamin D3, and retinoic acid, *Journal of investigative dermatology*, 130 (2010) 1297-1306.
- [158] K. Stefansson, M. Brattsand, D. Roosterman, C. Kempkes, G. Bocheva, M. Steinhoff, T. Egelrud, Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases, *Journal of Investigative Dermatology*, 128 (2008) 18-25.
- [159] M. Reinholz, T. Ruzicka, J. Schaubert, Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease, *Annals of dermatology*, 24 (2012) 126-135.
- [160] J. Schaubert, R.A. Dorschner, A.B. Coda, A.S. Büchau, P.T. Liu, D. Kiken, Y.R. Helfrich, S. Kang, H.Z. Elalieh, A. Steinmeyer, Injury enhances TLR2 function

- and antimicrobial peptide expression through a vitamin D–dependent mechanism, *The Journal of clinical investigation*, 117 (2007) 803-811.
- [161] N. Ballardini, C. Johansson, G. Lilja, M. Lindh, Y. Linde, A. Scheynius, B. Agerberth, Enhanced expression of the antimicrobial peptide LL-37 in lesional skin of adults with atopic eczema, *British Journal of Dermatology*, 161 (2009) 40-47.
- [162] M. Kobashi, S. Morizane, S. Sugimoto, S. Sugihara, K. Iwatsuki, Expression of serine protease inhibitors in epidermal keratinocytes is increased by calcium but not 1, 25-dihydroxyvitamin D3 or retinoic acid, *British Journal of Dermatology*, 176 (2017) 1525-1532.
- [163] M. Lu, H. Zhang, S.J. Yin, H. Jiang, X. Wang, F.Q. Yang, Biomimetic mineralization synthesis of poly (sodium 4-styrenesulfonate)-mediated calcium carbonate magnetic microsphere for kallikrein immobilization, *Separation Science Plus*, 5 (2022) 237-246.
- [164] K. Yamasaki, J. Schaubert, A. Coda, H. Lin, R.A. Dorschner, N.M. Schechter, C. Bonnart, P. Descargues, A. Hovnanian, R.L. Gallo, Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin, *The FASEB journal*, 20 (2006) 2068-2080.
- [165] H. Nagase, R. Visse, G. Murphy, Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs, *Cardiovascular research*, 69 (2006) 562-573.
- [166] A.M. Two, W. Wu, R.L. Gallo, T.R. Hata, Rosacea: part I. Introduction, categorization, histology, pathogenesis, and risk factors, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 72 (2015) 749-758.
- [167] M. Kubo, Y. Kambayashi, K. Takemoto, J. Okuda, M. Muto, K. Ogino, Reactive nitrogen species formation in eosinophils and imbalance in nitric oxide metabolism are involved in atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice, *Free radical research*, 39 (2005) 719-727.
- [168] S. Liu, J. Hu, C. Shi, L. Sun, W. Yan, Y. Song, Sparstolonin B exerts beneficial effects on prostate cancer by acting on the reactive oxygen species-mediated PI3K/AKT pathway, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25 (2021) 5511-5524.