T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ

DENEYSEL ALERJİK KONTAKT DERMATİT FARE MODELİNDE HİDROJEN SÜLFÜR DONÖRÜ SODYUM SÜLFÜRÜN ANTİPRURİTİK VE ANTİİNFLAMATUVAR ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nermin ÖZLEN ERGİN

EDİRNE - 2023

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ

DENEYSEL ALERJİK KONTAKT DERMATİT FARE MODELİNDE HİDROJEN SÜLFÜR DONÖRÜ SODYUM SÜLFÜRÜN ANTİPRURİTİK VE ANTİİNFLAMATUVAR ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nermin ÖZLEN ERGİN

Destekleyen kurum: TÜBAP-2021/94

Tez No:

EDİRNE - 2023

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde değerli katkılarından dolayı danışman hocam Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'e, ayrıca Prof. Dr. Hakan KARADAĞ'a, Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'e, Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'ye, Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ'a, histolojik çalışmalarda desteklerinden dolayı Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN ve Arş. Gör. Deniz ERÇETİN'e, çalışmalarımda yardımlarından dolayı Öğr. Gör. Kübra DUVAN AYDEMİR, Arş. Gör. Mehmet Zahit ÇETİNKAYA ve Arş. Gör. Dilşat ERÜMİT'e, desteklerinden dolayı TÜBAP'a ve en büyük destekçilerim ailem ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

DERMATİT 3

DENEY HAYVANLARINDA ALERJİK KONTAKT DERMATİT MODELLERİ 12

HİDROJEN SÜLFÜR 13

GEREÇ VE YÖNTEMLER 18

BULGULAR 27

TARTIŞMA 39

ÖZET 45

SUMMARY 47

KAYNAKLAR 49

ŞEKİLLER LİSTESİ 55

ÖZGEÇMİŞ 57

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

AKD : Alerjik kontakt dermatit
CBS : Sistatiyonin β-sentaz
CHS : *Contact hipersensitivity*
CO : Karbonmonoksit
CSE : Sistatiyonin γ-liyaz
CXCL : C-X-C motif ligand
DNCB : Dinitroklorobenzen
DNFB : 1-floro-2,4-dinitrobenzen
FITC : Floresan izotiyosiyanat
H_2S : Hidrojen sülfür
IFN-γ : İnterferon-γ
IL : İnterlökin
i.d. : İntradermal
i.p. : İntraperitoneal
İKD : İrritan kontakt dermatit
KD : Kontakt dermatit
LD : Lenf düğümü
NO : Nitrik oksit

Ox : Oksazolon

PGE2 : Prostaglandin E2

PI : Pikril klorür

PUVA : Psoralen artı Ultraviyole A

Tc : T cytotoxic (sitotoksik) hücreler

Th : T helper (yardımcı) hücreler

TNCB : Trinitroklorobenzen

TNF-α : Tümör nekroz faktörü- α

Treg : T regülatör hücreler

UVB : Ultraviyole B

GİRİŞ VE AMAÇ

Dermatit ve egzama çoğunlukla aynı anlamda kullanılan kaşıntılı, kırmızı döküntü ile karakterize inflamatuvar cilt hastalığıdır (1-3). Kontakt dermatit, en yaygın dermatolojik hastalıklardan biridir ve deri ya da mukoza zarlarında iltihaplanma ile kendini gösteren bağışıklık tepkisidir (4). Kontakt dermatit irritan, alerjik ve protein kontakt dermatit olmak üzere sınıflandırılır (5).

İrritan kontakt dermatit doğrudan kimyasal cilt hasarına bağlı spesifik olmayan bir cilt yanıtı iken alerjik kontakt dermatit, alerjene bir kez duyarlandıktan sonra tekrar tekrar maruziyetle ortaya çıkan hapten spesifik T hücre yanıtıdır (6,7-11). Protein kontakt dermatit ise genellikle mesleki ortamlarda proteinli bir alerjene karşı gelişen dermatit türüdür (12,13).

Alerjik kontakt dermatit yaşam kalitesini ciddi anlamda düşüren kızarıklık, eritem, ödem, ciltte kalınlaşma ve kaşıntı gibi belirtilere neden olur. Kaşıntı hissi rahatsız edicidir ve kaşımak geçici olarak rahatlama sağlasa da kaşıntı kaşınma döngüsüne yol açar. Çoğu zaman en etkili tedavi adımı maruziyeti engellemektir (7-11,14,15). Genellikle çevre koşulları ve iş ortamı sebebiyle maruziyet engellenemediğinden ilaçla tedavi yoluna gidilir.

Alerjik kontakt dermatit patofizyolojisine ilişkin bilgiler esas olarak deney hayvanlarında oluşturulan ve *contact hipersensitivity* (CHS) olarak adlandırılan modellerden elde edilir (9,16,17). CHS, insan alerjik kontakt dermatitini iyi taklit eder ve alerjik kontakt dermatit çalışmaları için oldukça yararlıdır (18).

Hidrojen sülfür (H_2S) immün hücrelerin tamamında sentezlenen ve kaşıntıya neden olabilecek melanom ve sedef gibi birçok hastalıkta rol aldığı gösterilen endojen bir moleküldür (19,20). H_2S'nin kaşıntıyı azalttığını gösteren çalışmalar yapılmıştır (20,21). H_2S'nin alerjik kontakt dermatit üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. H_2S çalışmaları donörleri ile yapılır. H_2S'nin T lenfosit ve diğer immün hücrelerin fonksiyonlarını etkilediği bilinmektedir (22).

Bu verilerden yola çıkarak çalışmamızda;

hidrojen sülfür donörü sodyum sülfürün lokal ve sistemik uygulanmasının AKD belirtileri olan kaşıntı ve ödem üzerine olası etkisini göstermek ve bu olası etkinin hangi inflamatuvar hücreler-sitokinler üzerinden olduğunu belirlemek amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

DERMATİT

Dermatit, epidermisin ve dermisin karakteristik klinik özellikler (aynı anda ortaya çıkan veya birbirinden evrimleşen; kaşıntı, eritem, papül, seropapül, vezikül, pul, skuam, kabuk veya likenifikasyon) ve belirgin histolojik tablo (spongioz, akantoz, parakeratoz, lenfositik ve granülositik infiltratlar) ile kendini gösteren bulaşıcı olmayan inflamasyonudur (1,2).

"Egzama" ve "dermatit" terimleri arasındaki farklar hakkındaki tartışmalar, kesin bir sonuca varmadan, onlarca yıldır devam etmektedir. Birçok kaynakta bu iki terim eş anlamlı olarak değerlendirilmektedir. Bu hastalıkların klinik özellikleri ve patomekanizmaları, herhangi bir kesin farklılaşmayı neredeyse imkansız hale getirecek ölçüde örtüşmektedir (1-3).

Mevcut epidemiyolojik verilerin bir araya getirilmesi ile oluşturulan sınıflandırmada, dermatitler; atopik egzama, kontakt dermatit, seboreik dermatit, asteatotik dermatit, staz dermatiti, nummular egzama, dishidrotik egzama (pomfoliks), el dermatiti ve mesleki dermatit olarak sınıflandırılır (1,3).

Kontakt Dermatit

Kontakt dermatit (KD), genellikle, bulaşıcı olmayan immünolojik, kimyasal veya fiziksel harici faktörler tarafından indüklenir (4). Bu yabancı maddeler ciltte ve/veya mukoza zarlarında bir bağışıklık tepkisine neden olur ve iltihaplanma ile sonuçlanır (5). Meslek hastalıklarının önemli bir kısmını oluşturan kontakt dermatit, en yaygın inflamatuvar dermatolojik hastalıklardandır (5,23).

Kontakt dermatite çevredeki çok sayıda hassaslaştırıcı ve tahriş edici fiziksel, kimyasal ya da termal maddeler sebep olabilir (23).

Kontakt dermatit temelde, alerjik kontakt dermatit (AKD), irritan kontakt dermatit (İKD) ve protein kontakt dermatit olarak üçe ayrılır (1,5).

Protein kontakt dermatitin tam olarak mekanizması anlaşılmamış olsa da genellikle mesleki ortamlarda, proteinli bir alerjenle temastan sonra görülen kaşıntılı kızarıklıklardır (12,13).

İrritan kontakt dermatit, doğal bağışıklık sisteminin aktivasyonuna yol açan doğrudan hücresel toksisiteden kaynaklanırken; AKD, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık tepkilerini içeren tip IV gecikmiş tip aşırı duyarlılıktan kaynaklanır (5).

İrritan kontakt dermatit (İKD): Doğrudan kimyasal cilt hasarına bağlı ve inflamatuvar mediyatörlerin salınmasıyla oluşan spesifik olmayan bir cilt tepkisidir (6). İrritan kontakt dermatitte doğal bağışıklık sistemi tetiklenir ve fiziksel/kimyasal dış uyaranlara karşı inflamatuvar bir cilt tepkisi oluşur. Alerjik kontakt dermatitten farklı olarak önceden sensitizasyon (duyarlılaşma) gerektirmez ve bu tür güçlü irritan bir maddeye maruz kalan çoğu kişi benzer bir reaksiyon gösterir. İKD, tüm kontakt dermatit vakalarının %80'ini oluşturur ve çoğunlukla sabun ve su gibi zayıf tahriş edici maddelere kümülatif maruziyetten kaynaklanır (5,24,25).

İki tipte irritan kontakt dermatit gözlenir;

Akut irritan kontakt dermatit**:** Akut İKD, maruz kalan hemen hemen herkesin geliştirebileceği yeteri kadar ve yeterince tahriş edici özellikteki madde ile maruziyetin neden olduğu akut cilt hasarını ifade eder. Semptomlar çok değişkendir, alerjik kontakt dermatitten ayırt etmek güçtür ve sıklıkla yanlış teşhis edilir. Yaygın kuru eritem ve deskuamasyon akut irritan dermatite özgüdür, ancak ödem, veziküller ve büller de görülebilir. Maruziyetin sonlandırılmasından sonra, akut İKD hızla kaybolma

eğilimindedir, ancak bazı durumlarda aylarca devam edebilir. Yaygın irritan maddeler arasında asit, alkali, amonyak, arsenik, kalsiyum silikat, çimento, temizlik maddeleri, epoksi reçine, formalin, kroton yağı, talaş, gümüş, kerosen, dimetilsülfoksit, kapsaisin, laktik asit, nikel sülfat, potasyum dikromat, antralin, retinoik asit, yapışkan bantlar ve çocuk bezleri bulunur. Ciltte yanma hissi ve hafif bir kaşıntı olur. Bazı kimyasallar, gecikmiş akut İKD olarak adlandırılan temastan 8 ila 24 saat sonra inflamasyona neden olabilir, bu da hekimi alerjik kontakt dermatite yönlendirebilir, ancak İKD'de şüpheli ajanlarla yama testi negatiftir (6,26).

Kronik irritan kontakt dermatit: Kümülatif İKD olarak da adlandırılan kronik İKD, 6 haftadan uzun süren kronik egzamatöz lezyonları ifade eder. Suya, deterjana, kimyasal çözücülere, tahriş edici yiyeceklere ve bilinen diğer hafif ve orta derecede tahriş edici maddelere uzun süreli maruziyet sonrasında görülür. Özellikle ellerde daha sık görülür. Döküntü kuru, pullu eritem ve genellikle kabarcıklar olmadan çatlamış cilt şeklindedir. Sıklıkla alerjik kontakt dermatit ile birlikte görüldüğünden yama testi pozitif sonuç verebilir. Kronik İKD'ye yaygın olarak neden olan maddeler sabun, deterjan, endüstriyel temizlik maddeleri, yapıştırıcı, boya, meyve suyu, bitki suyu, oksitleyici ve indirgeyici maddeler, hayvan vücut sıvıları (ya da dokuları), böcek ilacı, çimento, kireç taşı, ahşap koruyucu, çamaşır suyu, asit ve alkali maddelerdir (6,26).

Alerjik kontakt dermatit: AKD, dünya çapındaki en yaygın dermatolojik hastalıklardan biridir. Kişinin yaşam kalitesinin düşmesine sebep olur ve üretkenlik kaybına yol açar (16). AKD, alerjenlere tekrar tekrar maruz kaldıktan sonra ortaya çıkan, hapten spesifik T hücrelerinin aracılık ettiği, kızarıklık, eritem, kaşıntı, ödem ve ciltte kalınlaşma ile karakterize yaygın inflamatuvar bir deri hastalığıdır (7-11).

Epidemiyoloji: Alerjik kontakt dermatitin görülme sıklığı yüksektir ve kadınlarda daha sık görülmektedir (10,27).

Belirli bir alerjene maruz kalan tüm insanlar bu alerjene duyarlı hale gelmez. Bir alerjene karşı duyarlı olan bireyler, bir başkasına karşı duyarlı olmaya daha yatkındır. Bazı grupların, hem genetik eğilimlerin hem de çevresel maruziyetin bir sonucu olarak, AKD geliştirme riski daha yüksektir (27).

Hem alerjik hem de irritan kontakt dermatit, dünyadaki mesleki cilt hastalıklarının büyük çoğunluğunu oluşturur (9,27). Saf AKD prevalansını ölçmek zordur çünkü AKD ve İKD genellikle bir arada bulunur. Gençlerde temas ile oluşan hassasiyetin prevalansı %15,2'dir. Yetişkinlerde bu çok daha yüksektir ve %18,6'ya ulaşabilir ki bu yüksek oranın nedeni, yaşın etkisinden ziyade kümülatif duyarlılık olabilir (27).

Alerjik kontakt dermatit, mesleki deri hastalıklarının önemli bir nedenidir ve Amerika Birleşik Devletleri'nde işle ilgili tüm sağlık şikayetlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Tahminen 4 milyon kayıp iş günü ile sonuçlanır ve yıllık yaklaşık 400 milyon ABD doları tutarında bir maliyeti vardır (9).

Etyopatogenez: Belirli bir alerjene maruz kalan tüm insanlar duyarlı hale gelmez. AKD gelişiminde; genetik faktörler, primer duyarlanma ve tolerans gelişimi, yaş, cinsiyet ve ırk gibi faktörlerin etkili olduğu belirlenmiştir (27,28).

Alerjik kontakt dermatitli kişilerin çocuklarında, kardeşlerinde ve aile üyelerinde AKD görülme olasılığı fazladır, bu da genetik yatkınlık konusunu ortaya çıkarmıştır. HLA-A3 ve HLA-B7 genleri bulunan kişilerin birlikteliğinin AKD'ye yatkınlığı gösterilmiştir. Fakat genetik çalışmalar hala devam etmektedir (27,28).

Yaşlılarda ve yenidoğanlarda alerjen maddelerle temasın daha az olması sebebiyle AKD daha az görülür. Kadın ve erkek arasında AKD gelişmesi yalnızca cinsiyete bağlı olarak değişmese de farklı cinslerin farklı maruziyetleri olması sebebiyle cinsiyetler arası farklılıklar görülür. Kadınların sabun, deterjan, kozmetik vb. maddelerle maruziyeti daha fazla olduğundan görülme sıklığı daha fazladır. Beyaz ırkta AKD görülme oranı daha yüksektir (10,11,27,28).

Derinin daha kalın olduğu avuç içi ve ayak altı gibi bölgelerde AKD daha az görülürken; derinin ince olduğu göz kapakları, skrotum ve aksilla gibi bölgelerde görülme sıklığı daha fazladır. Ayrıca deri bütünlüğünün bozulduğu yerlerde AKD daha sık karışımıza çıkar. İmmün yetmezliğe neden olan tüm hastalıklarda ve gebelik gibi durumlarda AKD gelişme olasılığı azalır. Kortikosteroidler, siklosporin, azatioprin gibi ilaçlar AKD'yi baskılar. Yüksek ısı ve nem AKD'ye duyarlılığı artırır. Alerjenin konsantrasyonu, taşıyıcısı, temas sıklığı, temas süresi ve penetrasyon gücü AKD seyrinde etkilidir (28).

Patofizyoloji: Alerjen maddelerle ile daha önce duyarlanmış bireylerde aynı alerjene tekrar maruziyet sonrası özgün (hapten spesifik) T hücrelerinin aktivasyonu ile ortaya çıkan gecikmiş tip IV aşırı duyarlılık reaksiyonudur (27,29).

İmmünolojik yanıtın gelişimi için haptenlerin, keratinositler ve Langerhans hücreleri gibi epidermal hücrelerin, T hücrelerinin ve monositler, makrofajlar ve nötrofiller gibi reaktif hücrelerin bulunması temeldir (28).

Alerjik kontakt dermatit oluşumuna yol açan alerjenler genellikle düşük molekül ağırlıklı (500-1000 dalton) haptenlerdir. Tek başına antijenik özellikte olmayan haptenler epidermal hücrelerin sitoplazmik membran proteinlerine bağlanır ve antijenik özellik kazanırlar (8,27,28). Potansiyel AKD sebebi olarak belirlenen hapten sayısı 3700'den fazladır ve bu sayı giderek artmaktadır (30). Haptenler, haptenizasyon adı verilen bir süreçle immünojenik neo-antijenler oluşturmak için ilgili proteinlerle bağlanırlar (5,16,27).

Haptenler, cilt içinde ya da cilt dışında fiziksel, kimyasal ya da biyolojik yollarla aktifleşerek daha güçlü alerjenler oluşturabilirler. Hava oksidasyonu veya foto-aktivasyon gibi kimyasal veya fiziksel aktivatörler yoluyla cildin dışında aktifleşen haptenler prehaptenler olarak adlandırılırken, sitokrom P450 izoenzimleri, alkol ve aldehit dehidrogenazlar, monoamin oksidazlar ve diğer farklı detoksifiye edici enzimler tarafından cilt içinde aktifleşen haptenler prohaptenler olarak adlandırılır (5,16,31).

Alerjik kontakt dermatit iki fazda gerçekleşen bir hipersensitivite reaksiyonudur. Birinci faz, hapten ile protein etkileşimleri sonucu oluşan alerjenik yapının işlendiği ve T lenfositlere tanıtıldığı duyarlılaşma, sensitizasyon ya da afferent faz olarak adlandırılan fazdır. İkinci faz ise alerjene yeniden maruz kalma ile daha önce bu alerjeni tanımış olan T hücrelerinin aktivasyonu ile ortaya çıkan ve AKD'nin klinik belirtilerinin oluşmasına neden olan inflamasyonun tetiklendiği sataşma, elisitizasyon, efferent ya da ortaya çıkarma fazıdır (5,16,27,28).

Cildin bariyer işlevi, alerjenlerin vücuda girmesini engeller (32). İlk bariyer hattı, epidermisin en üst tabakası olan *stratum corneum*dur. Filagrin (FLG), *stratum corneum*da bulunan geç epidermal farklılaşma proteinidir ve bariyer fonksiyonunda önemli bir işleve sahiptir. FLG'de meydana gelen mutasyonlar ve FLG'de herhangi bir işlev kaybı cilt bariyeri işlevinde bozulmaya yol açar ve AKD ve atopik dermatit gibi hastalıkların görülme riskini artırır (33). Antijenin cilde nüfuz etmesini engelleyen ikinci bariyer sıkı bağlantılar (*Tight Junctions*)'dır. Protein antijenlerinin vücuda girmesi bu

bariyer tarafından engellenir (34). Tüm bu bariyerlere karşın haptenler çok küçük yapılı moleküller olduğundan bu bariyerleri geçer ve kutanöz dendritik hücrelere ulaşır (35).

Duyarlılaşma fazında; tek başına antijenik özellikte olmayan haptenler, epidermal hücrelerin sitoplazmik membran proteinlerine bağlanır ve hapten-protein kompleksi oluşur. Hapten-protein kompleksi aktif ve immünojenik özelliktedir. Proinflamatuvar özellikleri sayesinde haptenler, doğal bağışıklığı aktive eder (16,28). Haptene maruziyet sonrasında keratinositler, aktive olur ve cilt dendritik hücrelerinin bu bölgeye göçünü ve cilt dendriktik hücrelerinin olgunlaşmasını destekleyen tümör nekroz faktörü-α (TNF-α), interlökin 1-β (IL-1β) ve prostaglandin E2 (PGE2) gibi çeşitli sitokinleri üretirler (16,35,36).

Langerhans hücreleri, in vitro yüksek antijen sunma kapasitelidir ve epidermiste bol miktarda bulunurlar. Langerhans hücrelerinin ortamdan uzaklaşmaları ile hipersensitivite yanıtının azalmış olması gösterildiğinden antijen sunumunda rol oynayan hücreler olarak kabul edilirler (37,38).

Doğal bağışıklık, haptenlerin maruziyeti ile inflamasyon sinyal yolaklarını aktive eden zarla ilişkili Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve sitozolik nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptörlerin hücreleri aktifleştirmesiyle başlar (39).

Hapten-protein kompleksleri derideki antijen sunan hücrelerdeki Klas II antijeni ile birleşir ve daha sonra pinositoz ya da reseptör aracılı endositoz yoluyla kutanöz dendritik hücreler içine alınır. Hapten taşıyan DH'ler deriden, parakortikal bölgedeki spesifik $CD8^+$ ve $CD4^+$ T lenfositlerinin yerleşim gösterdiği bölgesel lenf düğümlerine (LD) göç eder. Langerhans hücreleri, antijeni bu bölgede bulunan olgunlaşmamış $CD4^+$ T hücrelerine sunar. Hafıza $CD4^+$ T hücreleri çoğalır ve LD'lerden kana göç eder ve burada lenfoid organlar ile cilt arasında yeniden dolaşırlar (16,28).

Dudeck ve ark. (40) yaptığı bir çalışmada mast hücre eksikliği olan farelerde cilt dendritik hücrelerinin lenf düğümlerine göçünün azaldığını ve mast hücrelerinin yokluğunda alerjik kontakt dermatit gelişiminin azaldığını göstermişlerdir.

Duyarlılaşma aşaması insanda 10-15 gün, farede 5-7 gün sürer. Bu ilk fazın vakaların çoğunda klinik bir sonucu yoktur, ancak ilk cilt temasından 5-15 gün sonra aynı alerjenle yeniden temas etmek AKD gelişimini indükleyebilir (16).

Sataşma fazı alerjenlerle sonraki temaslarda ortaya çıkar. Duyarlılaşma fazından daha hızlı gerçekleşen bu fazda, 24-72 saat içerisinde AKD semptomları

ortaya çıkar (28). Sataşma fazındaki inflamatuvar hücre infiltrasyonunun mekanizması, antijene özgü olmayan ve antijene özgü inflamatuvar sinyaller kullanılarak açıklanmaya çalışılmaktadır (32).

Keratinositler, nötrofiller ve mast hücreleri sataşma sırasında antijene özgü olmayan inflamasyonu gerçekleştiren ana hücrelerdir, antijene özgü olan inflamasyon ise T hücreleri aracılığı ile gerçekleştirilir (32).

Haptenlerle yeniden maruziyet sonrası haptenler cilde yayılır ve duyarlılaşma fazından farklı olarak bu kez, Langerhans hücreleri yanı sıra makrofaj hücreleri, mast hücreleri ve keratinositler tarafından da sunulabilir (16). İlk olarak haptenler keratinositleri IL-1β, IL-18 ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinleri üretmeleri için uyarır (16,41). Bu sitokinler daha sonra vasküler endotel hücrelerini aktive ederler. Vasküler endotel hücreler ICAM-1 ve P/E-selektinler gibi adezyon proteinlerini eksprese eder ve bu adezyon proteinleri kandaki T hücrelerini dokulara göç etmeye yönlendirir. Haptenler ayrıca mast hücre kaynaklı histamin yoluyla vasküler geçirgenliği arttırır, bu da nötrofillerin cilde sızmasına yardımcı olur (40). Ayrıca, haptenler CXCL(C-X-C motif ligand)1 ve CXCL2 gibi nötrofillerin inflamasyon bölgesine toplanmasını sağlayan kemokinler üretmek için mast hücrelerini ve keratinositleri aktive eder (42).

Antijene spesifik olmayan inflamasyonun ardından T hücre aracılı antijene özgü inflamasyon başlatılır. T hücreleri deriye sızdığında, kutanöz antijen sunan hücreler tarafından aktive edilirler ve interferon-γ (IFN-γ) ve interlökin-17 (IL-17) gibi sitokinler üretirler. Aktive edilmiş T hücreleri tarafından üretilen sitokinler daha sonra ciltte yerleşik hücreleri uyarır, bu da daha fazla T hücresinin aktifleştirilmesine yol açar ve inflamasyonu güçlendirir. Her T hücresi alt kümesi (yani, Th1/Tc1(*T helper 1*/*T cytotoxic 1*), Th2 ve Th17/Tc17) ciltte yerleşik hücreleri farklı şekilde aktive eder ve kendilerine özgü inflamasyon tipini oluştururlar (43,44).

*Contact hypersensitivity'*de (CHS) sataşmayı takiben ilk 3 saat içerisinde kapiller vazodilatasyon gerçekleşir. Erken dönemde (sataşmadan 6 saat sonra) CXCL1 gibi kemokinlerin seviyesinin artmasıyla nötrofiller ve daha sonra (sataşmadan 12 saat sonra) CXCL 9 ve CXCL 10 kemokinlerinin yoğunluğu artmasıyla lenfosit, monosit, eozinofil ve bazofil gibi diğer lökositler de bölgeye toplanmaya başlar. Keratinositler kemokin üretiminin en önemli kaynağıdır. Aktive edilmiş keratinositler, CXCL1, CXCL2,

CXCL9, CXCL10, CCL8, CCL17 ve CCL27 gibi çoklu kemokinler üretirler. CXCL10, Th1 hücrelerini güçlü bir şekilde uyarabilir (32).

$CD8^+$ ve $CD4^+$ T hücreleri CHS'de önemli rollere sahiptir fakat mekanizmaları ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir (45). He ve ark. (46) yaptıkları çalışmada $CD8^+$ T hücrelerinin tükenmesinin CHS yanıtlarını önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (46). Gocinski ve ark. (45) yaptığı çalışmada, duyarlılaşma aşamasından önce $CD4^+$ T hücrelerinin tüketilmesiyle CHS yanıtı artarken, $CD8^+$ T hücrelerinin tüketilmesiyle CHS yanıtı azalmıştır. Bu sonuçlar da $CD8^+$ T hücrelerinin muhtemelen doku hasarına neden olan ana efektör mekanizmaları sağladığını, $CD4^+$ T hücrelerinin ise hem efektör hem de düzenleyici rolleri olduğunu düşündürmektedir.

$CD4^+$ Th hücreleri ve $CD8^+$ Tc hücreleri kütanöz immün yanıtlarla ilgi olarak en az üç alt gruba ayrılabilir. Bunlar; Th1/Tc1, Th2/Tc2 ve Th17/Tc17 hücreleridir. Th1/Tc1 hücreleri, IFN-γ'nın, Th2/Tc2 hücreleri IL-4, IL-5 ve IL-13'ün ve Th17/Tc17 hücreleri ise IL-17A ve IL-22 salgılanmasında başlıca rol alırlar. Örneğin, sataşma fazında inflamasyon bölgesinde yüksek oranda Th1 ve Tc1 hücrelerinin varlığı ile yüksek IFN-γ seviyeleri gözlemlenir. Bununla birlikte, her hapten farklı özelliklerde olduğundan farklı bir Th/Tc alt kümesi tipini indükleyebilir. Bunun yanı sıra kullanılan fare türü de sonuçları etkileyebilir. Her bir T hücresi alt kümesinin rolünü yorumlarken bu faktörler göz önünde bulundurulmalıdır (32).

Tomura ve ark. (47) T düzenleyici hücrelerin (T regülatör, Treg) lokal lenf noduna göç edip etmediklerini araştırdıkları çalışmalarında işaretli Treg'lerin deriden lenf nodu geçtiğini bildirilmiştir. Treg olmayan $CD4^+$ T ve $CD8^+$ T hücreleri gibi inflamasyon bölgesinde toplanan diğer hücrelerin de deriden lenf noduna göç ettiği göstermişlerdir.

Alerjik kontakt dermatitin sataşma fazı insanda 72 saat ve farede 24-48 saat sürer. İnflamatuvar reaksiyon sadece birkaç gün devam eder ve down regülasyon mekanizmalar ile hızla azalır (16).

Teşhis: Alerjik kontakt dermatit dünya çapında en yaygın dermatolojik hastalıklardan biridir ve alerjik kontakt dermatitin psikososyal ve ekonomik yükü, tıbbi literatürde kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır (8,14). Hastadan ayrıntılı bir anamnez alınması tanı koymada yardımcı olur. Hastanın mesleği, ilgi alanları, giysileri, kullandığı kozmetikler, yaşadığı ortam, varsa öncesinde uygulanan tedavi bilgileri tanıda

önemlidir (28). Hem yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemesi hem de sağlık sistemine önemli maliyetler getirmesi nedeniyle doğru teşhis zorunludur ve doğru teşhis koyulması için en iyi yöntem yama testidir (14,48).

Yama testinde alerjen madde deriye kontrollü ve irritasyona sebep olmayacak miktarda uygulanır (28). Yama testi ile alerjik kontakt dermatite sebep olan alerjenin belirlenip, maruziyetin engellenmesi, tedavinin etkililiğinde en önemli adımdır (15).

İnce tabaka hızlı yama testi (Thin-layer rapiduse epicutaneous) ön karıştırma ve hazırlama süreci gerektirmeyen, standart hale getirilmiş, uygulamaya hazır, uygulanabilirliği geliştirilmiş yeni bir yama testidir (8).

Tedavi: Tedavide temel prensip alerjenin tespiti ile alerjenle temastan kaçınılması ve alerjik kontakt dermatitin iyileştirilmesidir (15,34,48). Alerjenin belirlenmesi, alerjen ile temasın azaltılmasını dolayısıyla AKD'nin tekrar tekrar alevlenmesini engelleyebilecek en önemli adımdır. Ancak iş veya çevresel koşullar nedeniyle her zaman mümkün olamamaktadır. Yama testi ile alerjen tespit edilmeli ve hasta bu konuda bilgilendirilmelidir (28,49). Maruziyetin engellenemediği durumlarda koruyucu ekipmanlar (maske, eldiven vs.) kullanılmalıdır (49).

Alerjik kontakt dermatit medikal tedavisinde akut dönemde lezyonlar için ıslak pansuman ve kortikosteroid içerikli kremler (çoğunlukla betametazon dipropropiyonat veya mometazon furoat) önerilir. Akut alevlenme dönemlerinde sistemik kortikosteroidler (örneğin prednizolon enjeksiyonu gibi) kullanılabilir (28,49).

Alerjik kontakt dermatitin kronik döneminde ise kortikosteroid içerikli merhem ve pomadlar (çoğunlukla betametazon dipropropiyonat veya mometazon furoat) kullanılabilir. Kortikosteroidler lenfositlerin antijen spesifik aktivasyonunu, proliferasyonunu ve sitokin salgılamalarını engeller, kapiller geçirgenliği azaltır ve inflamasyonu baskılarlar. Kaşıntı yanma gibi semptomları azaltmak için antihistaminikler kullanılabilir. Sistemik kortikosteroidler yaygın ve şiddetli AKD durumlarına saklanmalıdır. Tekrarlayan AKD olgularında ve genelde derinin kalın olduğu bölgelerde topikal kalsinörün inhibitörleri (takrolimus, pimekrolimus) gibi ilaçlar tercih edilir. Daha inatçı olgularda mikofenolat mofetil, azatioprin, metotreksat gibi sistemik immünomodülatörler ve immunoglobulinler kullanılır. Ultraviyole B (UVB) ve psoralen artı Ultraviyole A (PUVA) da tedavide başarılı bir seçenektir. (28,49). Tüm bu

tedavilerin yanında nemlendirici, onarıcı ve bariyer kremler kullanılarak tedavi desteklenebilir (49,50).

DENEY HAYVANLARINDA ALERJİK KONTAKT DERMATİT MODELLERİ

1936 yılında Landsteiner ve Jacobs (9) ilk kez kimyasal bir ajanın alerjik reaksiyona yol açabilme kabiliyetinin taşıyıcı proteinlerle reaksiyona girme yeteneği ile ilişkili olduğu hipotezini ileri sürmüşlerdir.

Alerjik kontakt dermatitin patofizyolojisine ilişkin bilgiler, esas olarak deri üzerine bir hapten uygulanarak deri inflamasyonunun indüklendiği, *contact hypersensitivity* (CHS) olarak adlandırılan AKD hayvan modellerinden elde edilir (9,16,17).

İnsan AKD'si, hayvan CHS modelleri kullanılarak doğru bir şekilde taklit edilebilir. Alerjik kontakt dermatit fare modelleri, AKD'nin nedenlerini, mekanizmalarını ve potansiyel terapötik etkileri incelemek için oldukça yararlıdır. İnsan AKD'sinde olduğu gibi, CHS modelleri de iki fazda gerçekleşir. Duyarlılaşma olarak bilinen ilk aşama, farelerin doğal bağışıklık yanıtını etkinleştiren bir haptene maruz bırakılmasıdır. Haptenler, hapten-protein kompleksleri oluşturmak için proteinlerle birleşir ve daha sonra antijen sunan hücreler tarafından tanınır ve olgunlaşmamış T hücrelerine sunulur. Hapten-protein komplekslerinin T hücrelerine sunulması efektör T hücrelerinin oluşumuna yol açar. Sataşma olarak adlandırılan ikinci aşamada aynı hapten daha düşük bir dozda derinin duyarlılaşma bölgesinden daha uzak bir bölgesine yeniden uygulanır. Sataşma fazı ile birlikte, T hücreleri tarafından yönetilen ve nötrofiller, eozinofiller ve mast hücreleri dahil olmak üzere farklı immün hücre popülasyonlarının infiltrasyonu ve/veya aktivasyonu ile karakterize edilen hızlı, çok adımlı bir inflamatuvar yanıt oluşur (18).

Alerjik kontakt dermatit ile ilgili mevcut verilerin büyük çoğunluğu, günlük hayatımızda bulunmayan güçlü deneysel temas duyarlılaştırıcılar olan 1-floro-2,4-dinitrobenzen (DNFB), dinitroklorobenzen (DNCB), trinitroklorobenzen (TNCB), dimetilbenzantrasen (DMBA) oksazolon (Ox), pikril klorür (PI) ve floresan izotiyosiyanat (FITC)'ın kullanıldığı CHS modellerinden elde edilmiştir. Bu moleküller, benzersiz kimyasal ve immünolojik özelliklere ve insan AKD'sinden sorumlu haptenlerin çoğundan farklı olarak çok güçlü proinflamatuvar özelliklere sahiptirler (9,16-18).

1-floro-2,4-dinitrobenzen, alerjik deri hastalığının birçok özelliğinin araştırılmasında yararlı olan ve yaygın olarak kullanılan kimyasal bir haptendir. Günümüzde bilinen birçok mekanizma DNFB kullanılarak oluşturulan CHS modeliyle açıklanmıştır. Örneğin; nötrofillerin, sataşma fazındaki kilit rolleri, mast hücrelerinin kontakt hipersensitivitedeki rolünün netleştirilmesi gibi birçok olay bu model ile yapılan çalışmalarla açıklanmıştır (18).

1-floro-2,4-dinitrobenzen ile farklı fare türlerinde CHS modeli başarıyla uygulanabilmektedir. Ayrıca DNFB farelerde belirgin bir toksisiteye yol açmamaktadır. Bu nedenle alerjik kontakt dermatit araştırmaları için tercih edilen bir laboratuvar modelidir (18).

Tüm bu nedenler ve deney prosedürünün açıkça belirlenmiş olması sebebiyle alerjik kontakt dermatiti incelediğimiz bu çalışmamızda DNFB ile oluşturulan CHS modelini tercih ettik.

HİDROJEN SÜLFÜR

H_2S, çürük yumurta kokusunda, renksiz ve yanıcı bir gazdır. Hidrojen sülfür -82,3 ºC'de erir ve -60,3 ºC'de kaynar. Su ve alkolde çözünür. H_2S suyun kükürt analoğudur, çeşitli maddeler tarafından sülfür dioksit ve sülfürik aside oksitlenebilir. Suyun aksine moleküller arası bağlar zayıf olduğu için oda koşullarında gaz halde bulunur (51,52).

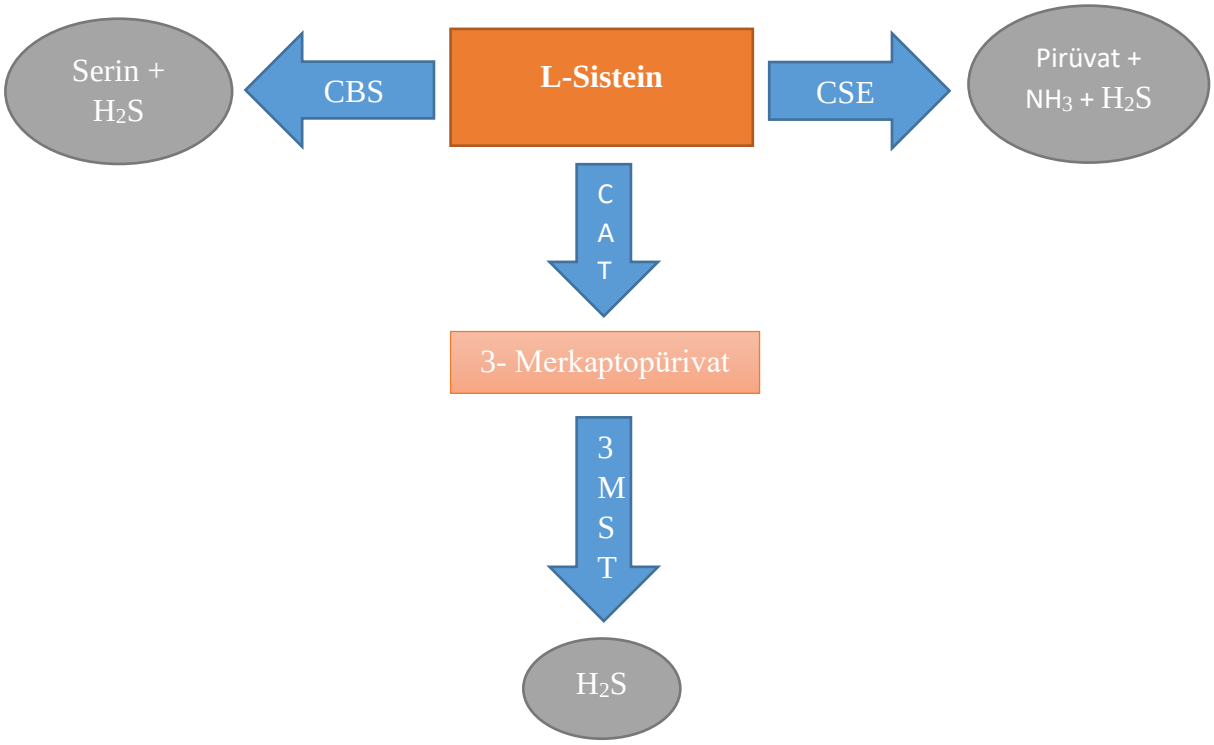
Memeli vücudunda fizyolojik pH'da H_2S'nin üçte biri ayrışmamış olarak ve üçte ikisi H^+ ve HS^-'ye (hidrosülfit iyonu) ayrışmış halde bulunur. Sodyum hidrosülfür (NaHS), Na^+ ve HS'ye ayrıştığı için yaygın olarak H_2S donörü olarak kullanılır. HS^- daha sonra H_2S oluşturmak için H^+ ile kısmi olarak bağlanır. H_2S lipofiliktir ve plazma zarlarına serbestçe nüfuz eder. Kısmi ayrışma geçirgenliği bir miktar azaltabilir (52,53).

Uzun yıllar H_2S'nin zehirli bir gaz olduğu düşünülmüştür. Ancak memelilerde endojen varlığının saptanması, enzimatik üretiminin karakterize edilmesi ve nöromodülatör olarak rolünün keşfedilmesinden sonra nitrik oksit (NO) ve karbonmonoksit (CO) gibi üçüncü bir gaz transmitter (sinyal molekülü) olduğu kabul edilmiştir. H_2S'nin kardiyovasküler, nörolojik, üreme ve endokrin sistemlerde çeşitli biyolojik işlevlere sahip olduğu bulunmuştur (54-56). Sedef hastalığı, melanom ve diğer dermatozlar gibi çeşitli dermatolojik hastalıklarla H_2S'nin üretiminin değiştiği gösterilmiştir (54,55).

Hidrojen Sülfür Biyosentezi

H_2S, memelilerde majör olarak sistatiyonin β-sentaz (CBS), sistatiyonin γ-liyaz (CSE) ve minör olarak sistein amino transferaz (CAT)/3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz (3-MST) enzim ikilisi ile L-sistein aminoasitinden sentezlenir (Şekil 1) (19,22,55). Endojen H_2S üretimi için tek substrat L-sisteindir. CBS ve CSE, dokularda yaygın olarak bulunur ancak bazı dokularda yoğunlukları değişiklik gösterir. Örneğin; CBS, merkezi sinir sistemi, beyin ve böbreklerde; CSE kardiyovasküler sistem, karaciğer, ince bağırsak ve midede daha baskın olarak bulunur. Ayrıca karaciğer ve böbrek gibi bazı dokularda her iki enzim de H_2S oluşumuna katkıda bulunur. 3MST/CAT enzim ikilisi, nöronlar, kalp, vasküler endotel, karaciğer, böbrek ve düz kaslarda lokalizedir (53,55).

Enzimatik yolaklara ek olarak, H_2S enzimatik olmayan yollar ile üretilebilse de bu yollar bugüne kadar deride tanımlanmamıştır. Örneğin; H_2S, glikoliz yoluyla sağlanan elektron donörleri olarak NADH veya NADPH'ı içeren glutatyon (GSH) varlığında elemental sülfürün indirgenmesiyle bağlı kükürtten H_2S oluşması ya da ferredoksinler ve Rieske proteinleri gibi oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarına girebilen, demir-kükürt proteinlerinden salgılanması gibi yollarla üretilebilir (55).



Şekil 1. H_2S biyosentezi

CBS: sistatiyonin β-sentaz, **CSE:** sistatiyonin γ-liyaz, **CAT:** sistein amino transferaz, **3MST:** 3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz, **H_2S:** hidrojen sülfür.

Hidrojen Sülfür Metabolizması

H_2S katabolizması farklı yollarla gerçekleşmektedir. Ana yolak, H_2S'nin mitokondride oksidasyona uğrayarak önce tiyosülfata ($S_2O_3^{2-}$) daha sonra ise sülfit (SO_3^{2-}) ve sülfata (SO_4^{2-}) dönüşmesidir. H_2S'nin oksidasyonu muhtemelen mitokondride elektron taşınması kaynaklı enzimatik olmayan bir süreçtir fakat süperoksit dismutaz da bu reaksiyonu katalize edebilir. Sonuç olarak fizyolojik koşullarda H_2S'nin son ürünü sülfattır.

H_2S'nin ikinci bir metabolik yolağı sitozolde gerçekleşen tiyol S-metiltransferaz (TSMT) enzimi tarafından metantiyol (CH_3SH) ve dimetilsülfüre (CH_3SCH_3) metilasyonudur.

Son olarak H_2S, kolonda rodanaz enzimiyle tiyosiyanata (SCN^-) metabolize olur (53).

H_2S'nin deri hücrelerindeki metabolizma süreci henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. İnsan derisi fibroblastlarında ana metabolizma yolağı mitokondride oksidasyona uğradığı yolaktır (55).

Hidrojen Sülfürün Derideki Etkileri

Doğal termal sularda banyo yapmak kükürt içeriğinin etkisi ile yara iyileşmesi, akne, rozasea, uyuz, atopik dermatit, sedef hastalığı ve ürtiker üzerinde olumlu etkiler gösterir (44). DNCB ile oluşturulan topik dermatit modelinde, yüksek kükürt, klor ve kalsiyum içeren maden suyu ile tedavi uygulanarak yapılmış bir çalışmada kaşınma davranışının, cilt lezyonlarının şiddetinin azaldığı ve serum IgE, IL-1, IL-13 seviyelerini düştüğü gösterilmiştir (57). Fakat kükürtlü termal sularla yapılan çalışmalarda yalnızca kükürtün etkisinin olmadığı, içeriğindeki tuzlar, pH, sıcaklık hatta plasebo etkisinin de tedavide etkili olabileceği düşünülmelidir (55).

Deride endojen H_2S'nin vazodilatasyon, hücre proliferasyonu, apoptoz ve inflamasyon gibi önemli fonksiyonların düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir. H_2S, düşük konsantrasyonlarda fizyolojik düzenleyici ve modülatör etki gösterir; bu dozlarda sitoprotektif, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilidir. Düşük konsantrasyonlarda ayrıca keratinosit proliferasyonunu uyarır. Yüksek konsantrasyonlarda prooksidan ve proapoptotik etki oluşturur. Bu H_2S'nin ikili farmakolojik etkisi olduğunu gösterir (19,55).

Hidrojen Sülfürün Kaşıntıdaki Rolü

Kaşıntı, kaşınma refleksine neden olan, ağrıya benzer fakat ağrıdan bağımsız bir fizyolojik kendini koruma mekanizmasıdır. Kaşıntı hissi rahatsız edicidir ve yaşam kalitesini büyük oranda etkiler. İnflamatuvar deri hastalıkları, sistemik hastalıklar, nöropatik durumlar ve psikolojik bozukluklar kaşıntıyı tetikleyebilir (21,54). Kaşıntı, kaşınma ile geçici olarak giderilse bile kaşıntı-kaşınma döngüleri cilt problemlerini daha da şiddetlendirir (54).

H_2S'nin bağışıklık tepkilerinin modülasyonundaki rolünü anlamak için, eksojen H_2S verilerek ya da endojen olarak H_2S üreten enzimleri inhibe ederek çalışmalar yapılır (19).

H_2S doğrudan uygulanmaz. Bunun yerine yaygın olarak, hızlı salıveren donörler (NaHS ve Na_2S gibi H_2S tuzları) veya yavaş salıveren donörler (prototipik ajanlardan biri olan morfolino bileşiği, GYY4137) terapötik etki amacıyla kullanılırlar (19,56). Naproksen HBTA hem Na_2S hem de NaHS donörüdür (55).

H_2S biyosentezinin inhibisyonu için CBS, CSE ve 3-MST'nin geçici veya kalıcı olarak inhibisyonu veya bu enzimlerden birinin eksik olduğu fareler kullanılır. Örneğin,

aminooksiasetat (AOAA), bazı enzimatik olmayan H_2S üretim yollarının yanı sıra CSE'yi ve CBS'yi inhibe ederek H_2S sentezini engeller (19).

Yapılan çalışmalarda tüm immün hücrelerin endojen H_2S'yi değişen oranlarda sentezlediği ve H_2S'nin sitokin sentezi ve salıverilmesinde anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir (19).

Rodrigues ve ark. (21) tarafından yapılan bir çalışmada histamin ve 48/80 ile kaşıntı oluşturulan farelere lokal (intradermal) olarak Na_2S, Lawesson reaktifi ve yavaş salımlı H_2S donörü GYY4137 uygulanmış ve H_2S donörlerinin kaşıntıyı azalttığı gösterilmiştir.

Alshorafa ve ark. (20) tarafından yapılan bir çalışmada, psoriazis hastalarının serum H_2S seviyeleri incelenmek üzere 15 sedef hastası ve 15 sağlıklı insan ile çalışılmıştır. Çalışma sonucunda psoriazis hastalarında serum H_2S seviyelerinin anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir.

Sanchez ve ark. (58) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, farelerde Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu-NH_2 (SLIGRL-NH_2) ile oluşturulmuş bir kaşıntı modelinde, H_2S'nin hızlı salıveren donörü (NaHS) ve yavaş salınım gösteren donörü GYY4137, kaşıntı davranışında doza bağlı olarak önce azalan sonrasında doz arttıkça artan U şeklinde bir profil oluşturdular.

H_2S donörlerinin AKD'nin patofizyolojisi üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. H_2S donörlerinin T lenfosit fonksiyonlarını etkilemesi ve interferon-gama (IFN-γ), interleukin 2 (IL-2), IL-4, IL-5 sentezini veya salıverilmesini etkilemeleri beklenebilir ve bu nedenle tedavide rol oynayabilir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 28.05.2021 tarih ve 2021.05.02 karar numarası ile onaylandıktan sonra (EK-1), Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP-2021/94) Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

HAYVANLAR VE ETİK

Çalışma için 8-10 haftalık, 20-30 g ağırlığında 80 adet BALB/c dişi fare Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nden temin edilmiştir. Hayvanlar deney süresince standart laboratuvar koşullarında (12 saat aydınlık/karanlık döngüsü, %50 ± 5 nem ve 21 ± 2 °C sıcaklık) bireysel havalandırmalı kafes sisteminde (Tecniplast, Buguggiate, İtalya) barındırılmıştır. Standart bir laboratuvar diyetiyle beslenmiş ve ad libitum su verilmiştir. Bu çalışmanın deneysel prosedürleri National Academies Press (NAP) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals'e göre yürütülmüştür (59).

REAKTİF VE ANTİKORLAR

1-floro-2,4-dinitrobenzen (DNFB), zeytinyağı ve sodyum sülfür (Na_2S) Sigma Aldrich (MO, ABD), aseton Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. İmmünohistokimyasal analizde kullanılan primer antikorlar olan anti-CD4 antikoru ve anti-CD8 antikoru Santa Cruz Biotechnology (CA, ABD) firmasından satın alınmıştır.

ÇALIŞMA TASARIMI

Seksen BALB/c dişi fare rastgele lokal veya sistemik olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. Her ana grup kendi içinde beş alt gruba ayrıldı. Sistemik tedavi grupları kontrol, CHS, CHS+Na_2S (0.2 mg/kg/i.p.), CHS+Na_2S (2 mg/kg/i.p.), CHS+Na_2S (20 mg/kg/i.p.) olarak belirlendi. Lokal tedavi grupları kontrol, CHS, CHS+Na_2S (1 nmol/kulak/i.d.), CHS+Na_2S (3 nmol/kulak/i.d.), CHS+Na_2S (10 nmol/kulak/i.d.) olarak ayrıldı. Sistemik ve lokal grupların deney protokolü Tablo 1 ve Tablo 2'de sunuldu.

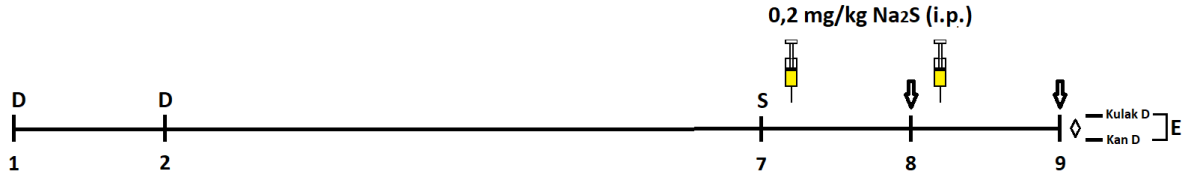
Deneysel CHS modeli, Manresa (18) tarafından açıklanan yöntemde minimal değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi.

Deneysel CHS modeli DNFB kullanılarak oluşturuldu. DNFB kullanılmadan hemen önce aseton/zeytinyağı (4:1 v/v) karışımında çözüldü. Farelerin karın bölgesi elektrikli tıraş makinesi ile tıraş edildi (Şekil 2). Duyarlılaşma, 1. ve 2. günlerde karın bölgesine %0,2'lik 100 mikrolitre DNFB solüsyonu uygulanarak oluşturuldu (Şekil 3). 7. günde, farelerin her iki kulağına 20 mikrolitre %0,3 DNFB uygulanarak sataşma yapıldı (Şekil 4). Kontrol gruplarına ise sadece aseton/zeytinyağı (4:1 v/v) karışımı uygulandı.

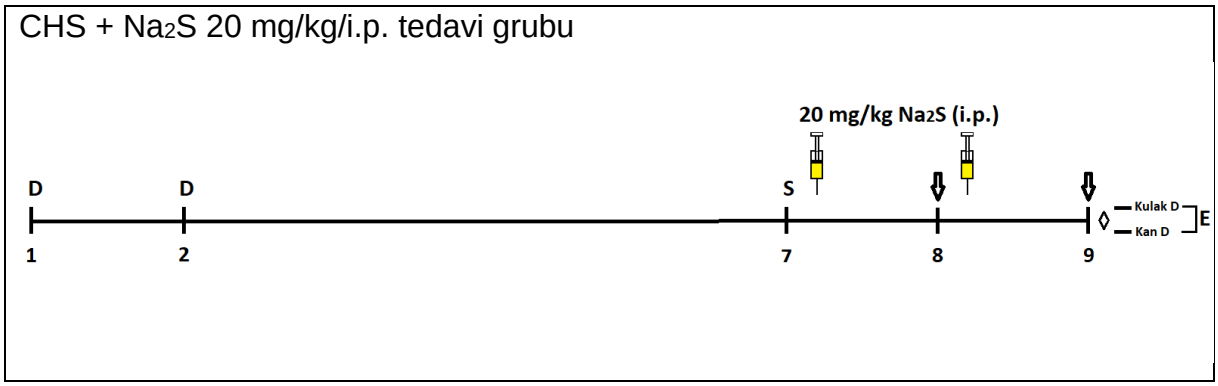
H_2S donörü olan Na_2S tedavi gruplarına farklı konsantrasyonlarda, sistemik (Şekil 5) 0,2-2-20 mg/kg/i.p. veya lokal (Şekil 6) olarak 1-3-10 nmol/her iki kulak/i.d. sataşmadan 3 saat ve 25 saat sonra uygulandı. Hem lokal hem de sistemik uygulamalarda çözücü olarak fizyolojik salin (%0,9 NaCl) kullanıldı. Sistemik uygulamalarda hacim 0.1 ml iken, lokal uygulamalar için 10 mikrolitre hacim kullanıldı. Lokal enjeksiyonlardan önce hayvanlara ketamin/ksilazin anestezisi yapıldı. Kulak kalınlığı (Şekil 7) ve kaşıma sayısı (Şekil 8) enjeksiyondan 24 saat ve 48 saat sonra değerlendirildi. Ölçümlerin 48. saatinde anestezi altında kalpten kan alınarak ötenazi uygulandı. Toplanan kan 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi ve ELISA ölçümleri yapılana kadar -80 ℃'de saklandı. Ardından sağ ve sol kulak dokuları alındı. Her grup için, ilk dört hayvandan alınan sağ kulaklar ve diğer dört hayvandan

alınan sol kulaklar ELISA ile sitokin seviyelerini ölçmek için -80 ℃'de saklandı. Benzer şekilde, karşı kulaklar nötral formaldehitte sabitlendi ve hematoksilen/eozin, toluidin ve immunohistokimyasal boyamalar için ayrıldı.

Tablo 1. Sistemik tedavi grupları

Kontrol grubu (sistemik) 
CHS model grubu (sistemik) 
CHS + Na_2S 0,2 mg/kg/i.p. tedavi grubu 
CHS + Na_2S 2 mg/kg/i.p. tedavi grubu 

Tablo 1. (Devam) Sistemik tedavi grupları



D: Duyarlılaştırma (sensitizasyon) (100 µl %0,5 DNFB karın cildine 2 gün)

V: DNFB çözücü (4:1 v/v aseton/zeytinyağı karışımı)

S: Sataşma (elisititazyon) (20 µl %0,3 DNFB kulak başına, kulağın her iki yüzüne)

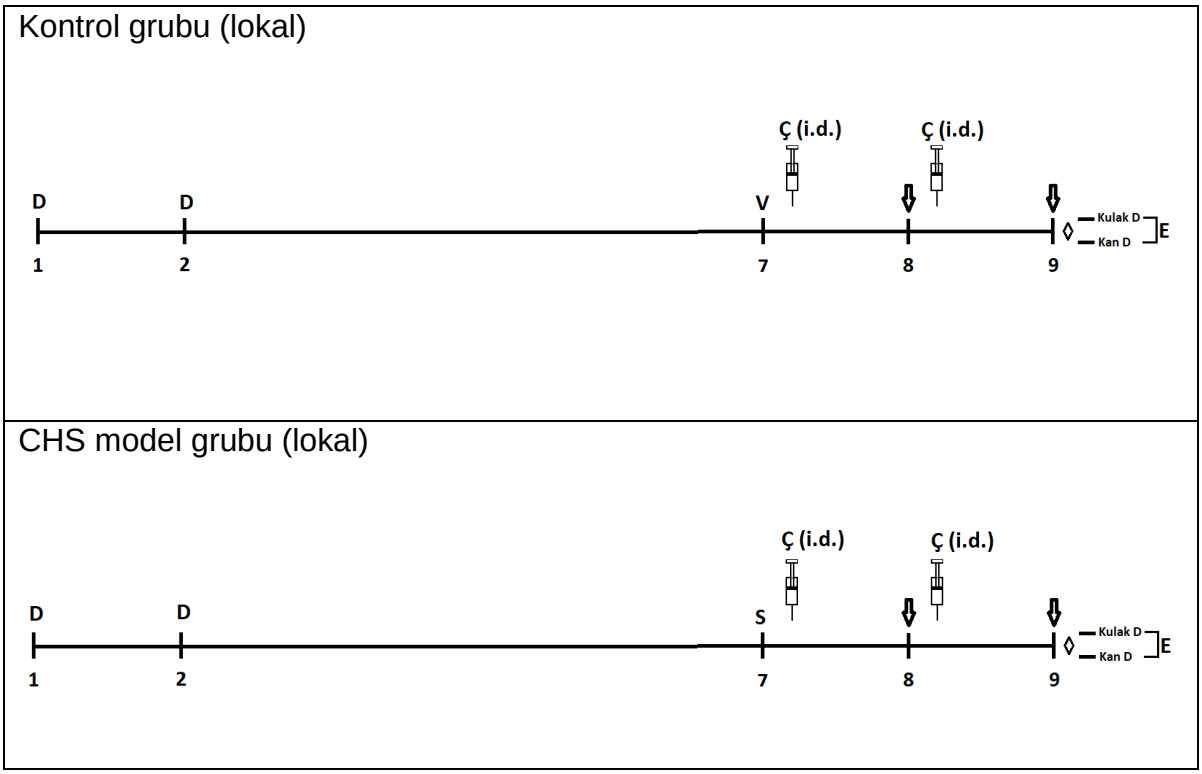
Ç: H_2S donörü çözücüsü (Serum fizyolojik sistemik gruplarda 0,1 ml; lokal gruplarda 10 µl)

⇩ : Kulak kalınlığı ve kaşıntı ölçümleri

◊ : Ötenazi

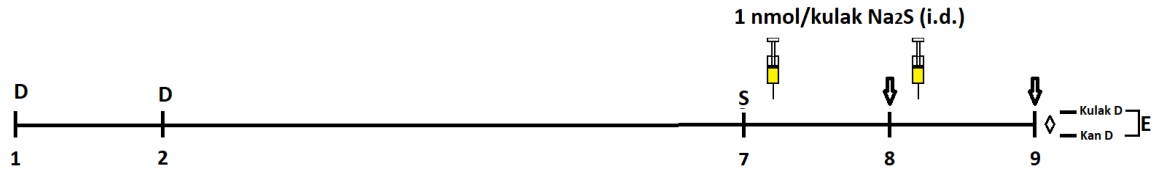
E: Elisa ölçümleri (Sağ kulak dokusu veya kan dokusundan) + Histolojik analizler sol kulak kepçesinden

Tablo 2. Lokal tedavi grupları

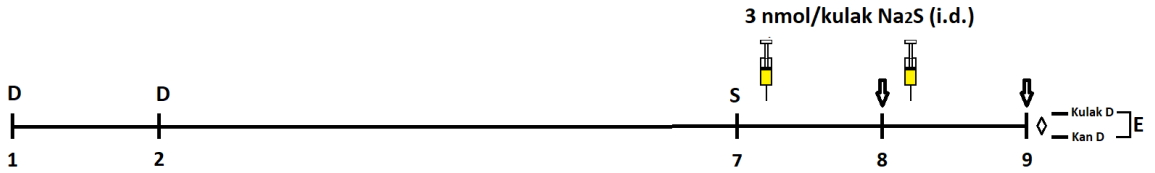


Tablo 2. (Devam) Lokal tedavi grupları

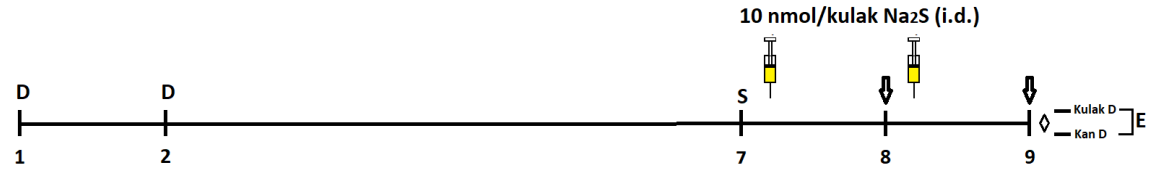
CHS + Na_2S 1 nmol/kulak/i.d./10 µl tedavi grubu



CHS + Na_2S 3 nmol/kulak/i.d./10 µl tedavi grubu



CHS + Na_2S 10 nmol/kulak/i.d./10 µl tedavi grubu



D: Duyarlılaştırma (sensitizasyon) (100 µl %0,5 DNFB karın cildine 2 gün)

V: DNFB çözücü (4:1 v/v aseton/zeytinyağı karışımı)

S: Sataşma (elisititazyon) (20 µl %0,3 DNFB kulak başına, kulağın her iki yüzüne)

Ç: H_2S donörü çözücüsü (Serum fizyolojik sistemik gruplarda 0,1 ml; lokal gruplarda 10 µl)

⇩ : Kulak kalınlığı ve kaşıntı ölçümleri

◊ : Ötenazi

E: Elisa ölçümleri (Sağ kulak dokusu veya kan dokusundan) + Histolojik analizler sol kulak kepçesinden

KAŞINMA DAVRANIŞI ÖLÇÜMÜ

Kaşınma sayısı, sataşma sonrası 24. ve 48. saatlerde değerlendirildi. Kaşıma davranışları odanın tavanına takılan bir video kamera ile 1 saat boyunca kaydedildi.

Kayıtlar ses geçirmez bir odada aynı ışık yoğunluğunda yapıldı. Kayıtlardan otuz dakika önce, hayvanlar ortama alışmaları için ses geçirmez odaya alındı. Tipik olarak, fareler saniyede birkaç kaşınma gerçekleştirmiştir ve böyle bir tepki bir kaşınma nöbeti olarak değerlendirildi (60,61).

KULAK KALINLIĞI ÖLÇÜMÜ

Aynı araştırmacı, 0,01 mm hassasiyete ve ± 0,04 mm doğruluğa sahip bir dijital kumpas (Accud, İstanbul, Türkiye) kullanarak her iki kulağın kalınlığını çalışmadan bir gün önce ve sataşmadan 24 ve 48 saat sonra ölçmüştür.

SİTOKİN SEVİYELERİNİN ÖLÇÜMÜ

Kulak dokuları tartıldı ve makasla küçük parçalar halinde kesildi. Daha sonra kilitli mikrosantrifüj tüplere (Eppendorf, Hamburg, Almanya) alındı. 1 mg doku için 10 mikrolitre PBS pH 7.4 (Invitrogen, MD, ABD) eklendi. Ardından uygun miktarda 0,9-2,0 mm paslanmaz çelik boncuklar (Next Advance, NY, ABD) mikrosantrifüj tüplerine eklendi. Tüpler bullet blender içine yerleştirildi ve numuneler 10 dakika boyunca cihazın 8. hızında homojenize edildi. Örnekler 4°C'de 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) için toplandı. Süpernatant protein konsantrasyonları nanodrop cihazı (Mecasys, Daejeon, Kore) kullanılarak mg/ml olarak ölçüldü. İnterferon-γ (IFN-γ), interlökin 2 (IL-2), IL-4 ve IL-5 sitokin konsantrasyonları üreticinin (Andy Gene, Pekin, Çin) önerilerine göre sandviç ELISA kiti kullanılarak ölçüldü. Sitokin konsantrasyonları pg/ml veya pg/mg protein olarak ifade edildi.

HİSTOLOJİK ANALİZ

Farelerin sağ kulaklarının üst kısımları %10 nötral formalin içinde sabitlendi, parafine gömüldü ve 5 μm'lik dilimler halinde kesildi. Kesitler derinin morfolojik yapısını görselleştirmek için hematoksilen ve eozin (H&E) ile ve mast hücrelerinin (MCs) sayısını değerlendirmek için toluidin mavisi (TB) ile boyandı.

H&E ile boyanmış slaytlar 40X-100X-200X-400X büyütmelerde ışık mikroskobu (Olympus BX51) kullanılarak analiz edildi. Kantitatif histolojik hasar skoru (0: değişiklik yok; 1: hafif; 2: orta; 3: şiddetli; ve 4: çok şiddetli) hiperkeratoz, parakeratoz, apoptotik

keratinositler, lenfosit ekzositozu, spongioz, lenfositik ve nötrofilik infiltrat, foliküler infiltrasyon, vazodilatasyon ve perivasküler infiltrasyona göre yapıldı (62).

Epidermis ve dermisin kalınlıkları Olympus BX51 ışık mikroskobu kullanılarak 100× büyütmede H&E boyama ile tanımlandı. Epidermis (stratum corneum'dan stratum basale'ye) ve dermis (bazal membrandan hipodermise) kalınlığı, alınan mikrograflar üzerinde AxioVision Rel 4.8 yazılımı kullanılarak iki kör gözlemci tarafından ölçüldü. Fare başına iki lam boyandı ve her lamda rastgele beş ölçüm incelendi.

Metakromatik MC'lerin dağılımı yüzeysel (subepidermal) ve perifoliküler dermisten yüksek büyütmede (×400) değerlendirildi. MC'ler kesit başına seçilen 10 alanda sayıldı. Değerler % sayılan hücre sayısı olarak ifade edildi.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

Kontrol ve lezyonlu doku örnekleri üzerinde immünohistokimyasal inceleme yapıldı. Formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş kulak dokuları 5μm kalınlığında kesildi. İmmünohistokimyasal işlem için kesitler deparafinize ve rehidrate edildi ve ısı aracılı bir antijen geri kazanımı gerçekleştirildi. Kesitler daha sonra 10 dakika boyunca %3 hidrojen peroksite maruz bırakıldı. Primer antikorlarla bir gece inkübasyondan sonra anti-CD4 antikoru (Santa Cruz, MT310, sc-19641, 1:50 dilüsyon); anti-CD8 antikoru (Santa Cruz, D-9, sc-7970, 1:100 dilüsyon) ve peroksidaz konjuge sekonder antikorlar uygulandı. İmmünoreaktivite diaminobenzidin (Vector Laboratories) ile görselleştirildi ve hematoksilen ile karşı boyama yapıldı. CD4 ve CD8 pozitif hücreler rastgele seçilen 10 alanda mikroskop altında yüksek büyütmede (400×) değerlendirildi. Veriler kesit başına hücre sayısı yüzdesi olarak ifade edildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Kulak kalınlığı ve kaşıntı sayılarının zamana göre değişimi, tekrarlanan ölçümlerde iki yönlü varyans analizi, post hoc Tukey testi kullanılarak değerlendirildi. Epidermis + dermis kalınlığı ve ELISA ölçümleri tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey testi kullanılarak değerlendirildi. Doku hasarı skoru ve $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin immünoreaktivite yüzdesi Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirildi.

İstatistiksel analizler için GraphPad Prism sürüm 6.0c (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, ABD) kullanıldı. Tüm veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edildi. P değerinin 0,05'ten küçük olması anlamlı kabul edildi.



Şekil 2. Hayvanların karınlarının tıraş edilmesi



Şekil 3. Duyarlılaşma için solüsyon uygulanması



Şekil 4. Sataşma için kulaklara solüsyon uygulanması



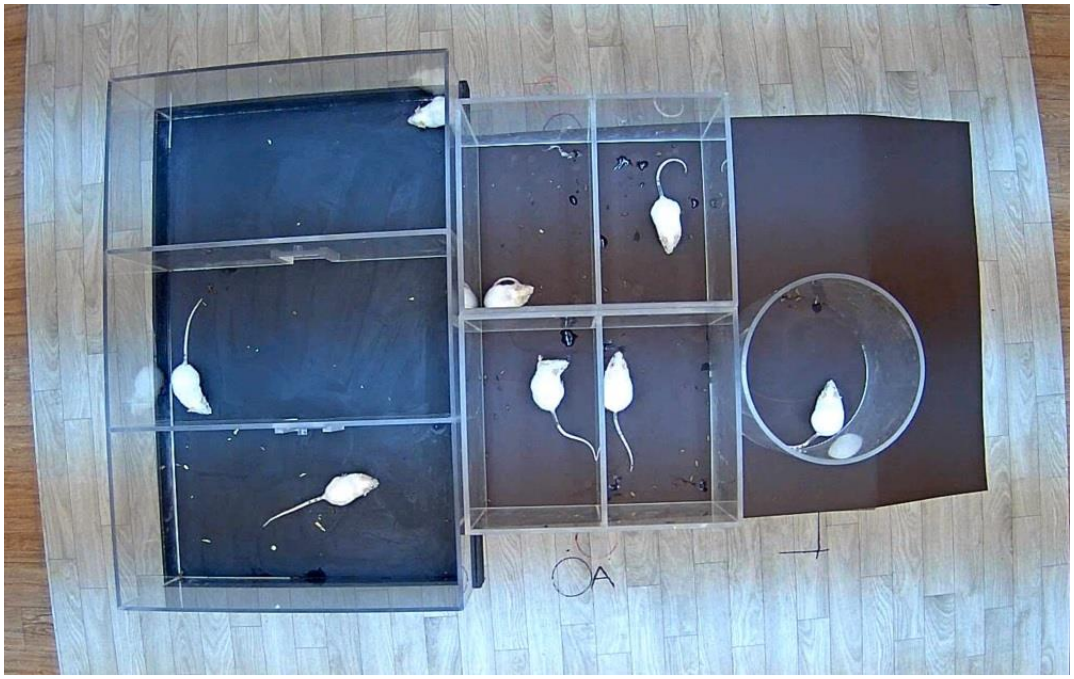
Şekil 5. İntraperitoneal (i.p.) enjeksiyon



Şekil 6. Kulağa intradermal (i.d.) enjeksiyon



Şekil 7. Kulak kalınlığı ölçümü



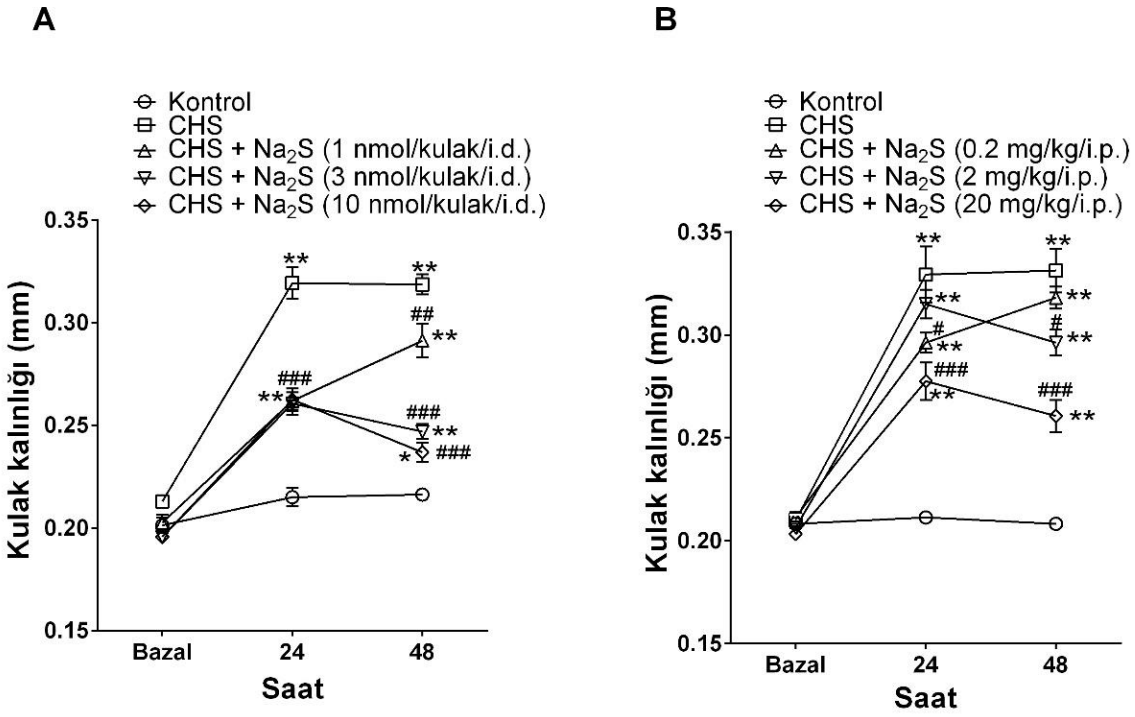
Şekil 8. Kaşıntı sayımı

BULGULAR

Hidrojen sülfürün alerjik kontakt dermatit üzerine etkisini değerlendirmek üzere deney hayvanlarında DNFB ile CHS modeli oluşturuldu ve bu hayvanlara sistemik ve lokal olarak hidrojen sülfür donörü Na_2S uygulandı. Na_2S uygulanmasından sonra olası etkileri 24. ve 48. saatlerde kaşınma davranışının sayılması, kulak kalınlığının ölçülmesi, serum ve kulak dokusu IFN-γ, IL-2, IL-4 ve IL-5 sitokin seviyelerinin ölçülmesi, kulak dokusundan alınan kesitte mast hücre sayılarının belirlenmesi ve morfolojik yapının incelenmesi ve immunohistokimyasal olarak $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin sayımı ile değerlendirildi.

HİDROJEN SÜLFÜRÜN KULAK KALINLIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Hem lokal (Şekil 9A, **p<0,0001 her iki zaman noktasında) hem de sistemik (Şekil 9B, **p<0,0001 her iki zaman noktasında) CHS gruplarında 24 ve 48 saat sonra kulak kalınlığında belirgin bir artış gözlendi. Lokal hidrojen sülfür tedavisi (1-3-10 nmol/kulak/i.d.) hem 24. saatte (Şekil 9A, ##p<0,0001 tüm dozlar) hem de 48. saatte (Şekil 9A, ##p<0.001, ###p<0,0001, ###p<0,0001 sırasıyla) kulak kalınlığını azalttı. Sistemik olarak verildiğinde, hidrojen sülfür tedavisi 24. saatte 0,2 ve 20 mg/kg dozlarında (Şekil 9B, sırasıyla #p<0,01, ###p<0,0001) ve 48. saatte 2 ve 20 mg/kg dozlarında (Şekil 9B, sırasıyla #p<0,01, ###p<0,0001) kulak kalınlığını azalttı.



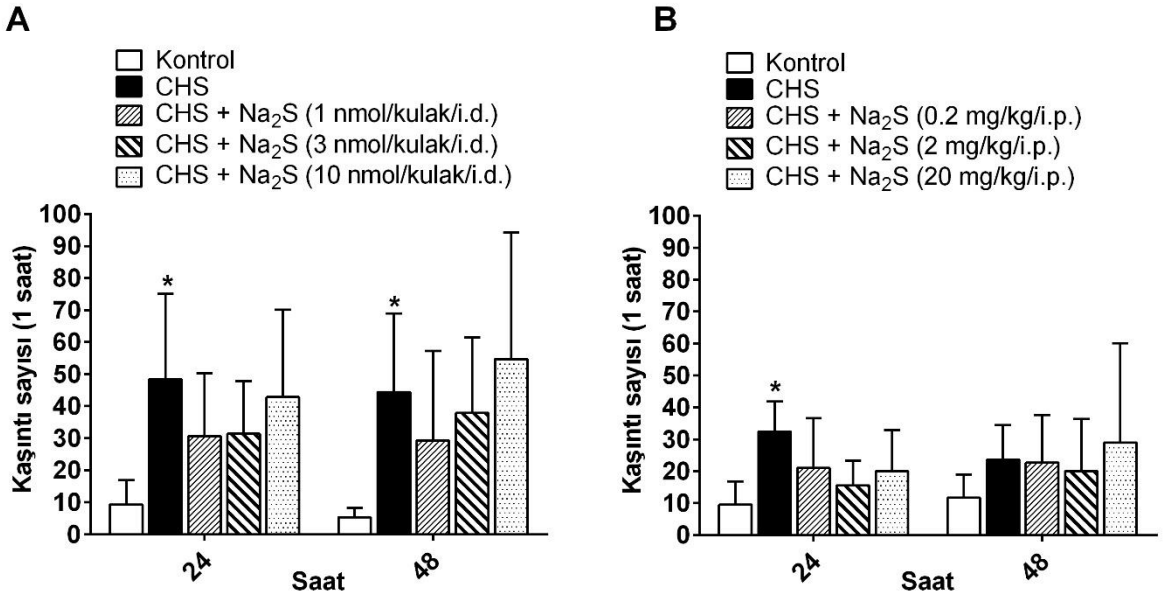
Şekil 9. A. Lokal; B. Sistemik hidrojen sülfür uygulamalarının kulak kalınlığı üzerindeki etkisi

CHS: *Contact hipersensitvity;* **Na_2S:** Sodyum sülfür.

Kontrol grubuna göre *p<0,05,**p<0.0001; CHS grubuna göre #p<0,01, ##p<0,001, ###p<0,0001. Tekrarlanan ölçümlerde iki yönlü varyans analizi, post hoc Tukey testi. Veriler ortalama ± SD olarak sunulmuştur (n = 14-16 kulak).

HİDROJEN SÜLFÜRÜN KAŞINMA DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİSİ

Lokal CHS grubunda (Şekil10A, *p<0,05 her iki zaman noktasında da), 24 ve 48 saat sonra kontrol gruplarına kıyasla kaşınma sayısında anlamlı bir artış gözlendi. Sistemik CHS grubunda, kulak kaşıma sayısındaki artış sadece 24. saatte gözlendi (Şekil 10B, *p<0,05). Ne lokal ne de sistemik Na_2S tedavisinin kaşınma sayısı üzerinde herhangi bir etkisi olmadı (Şekil 10A-B).



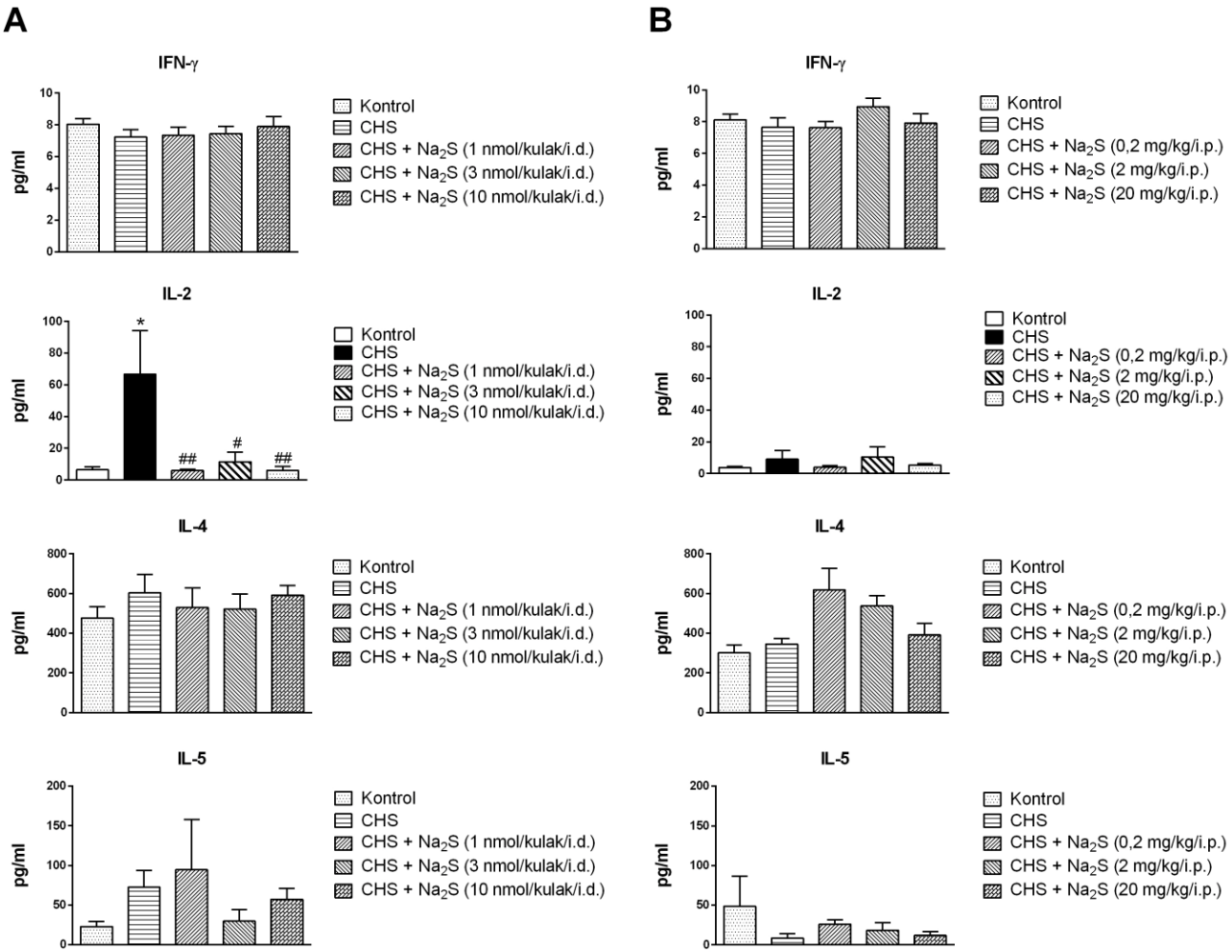
Şekil 10. A. Lokal; B. Sistemik hidrojen sülfür uygulamasının kaşıma sayısı üzerindeki etkisi

CHS: *Contact hipersensitvity*; **Na_2S:** Sodyum sülfür.

Kontrol grubuna göre *p<0,05. Tekrarlanan ölçümlerde iki yönlü varyans analizi, post hoc Tukey testi. Veriler ortalama ± SD olarak sunulmuştur (n = 7-8).

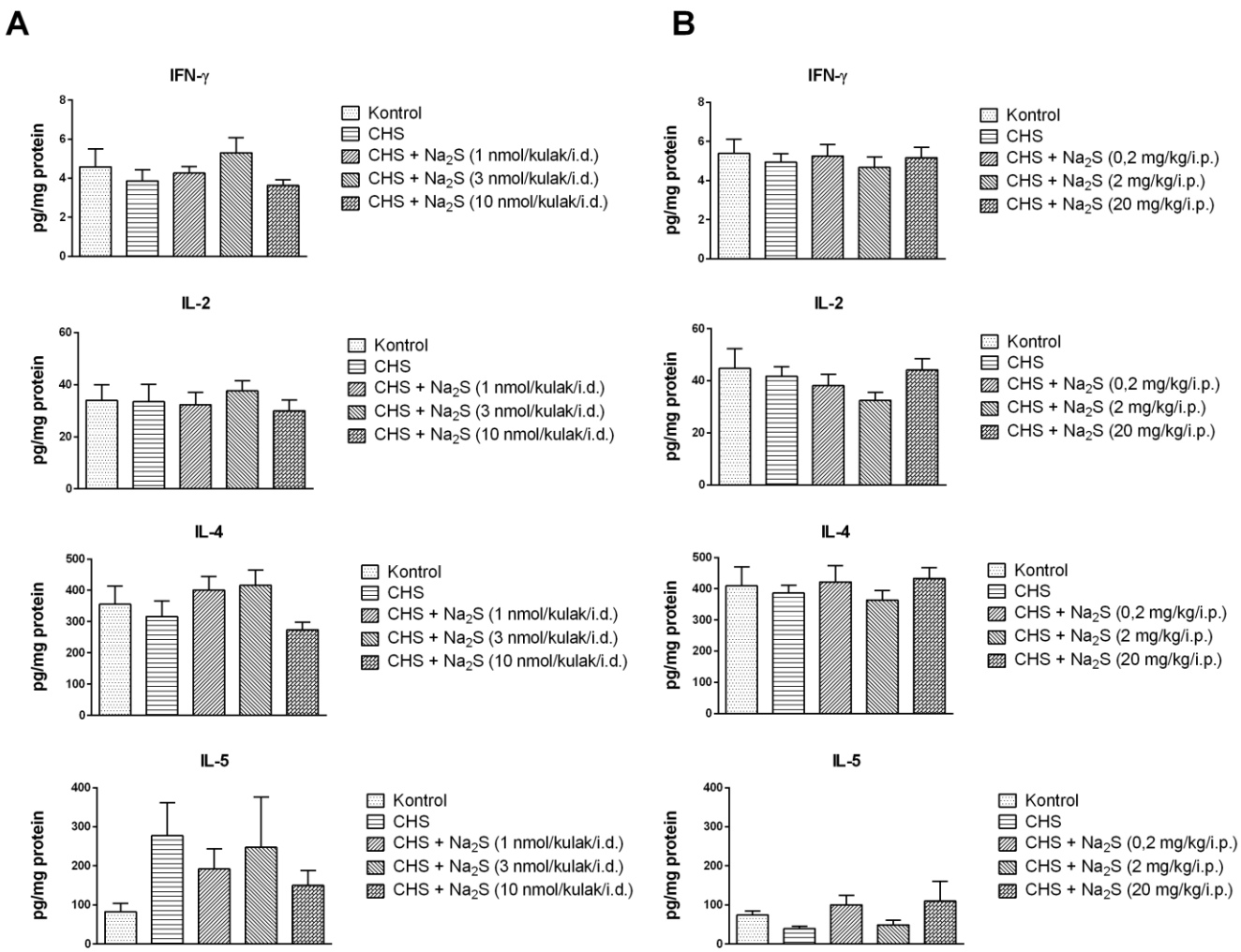
HİDROJEN SÜLFÜRÜN DERİ VE SERUM SİTOKİN KONSANTRASYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Sataşma sonrası 48. saatte alınan serumda IL-2 düzeyi lokal CHS grubunda belirgin şekilde artarken, sistemik CHS grubunda enjeksiyonlarından sonra değişmemiştir (Şekil 11A-B, *p<0,05). Lokal hidrojen sülfür tedavisi (1-3-10 nmol/kulak/i.d.) CHS grubuna kıyasla serum IL-2 seviyesini düşürdü (Şekil 11A, $^{\#\#}$p<0,01, $^{\#}$p<0,05, $^{\#\#}$p<0,01 sırasıyla). CHS ve hidrojen sülfür tedavisini takiben serum ve deri dokusu IFN-γ, IL-4 ve IL-5 sitokin konsantrasyonlarında fark bulunmadı (Şekil 11A-B ve Şekil 12A-B).



Şekil 11. A. Lokal; B. Sistemik hidrojen sülfür uygulamasının serum sitokin düzeyleri üzerinde etkisi

CHS: *Contact hipersensitvity*; **Na_2S:** Sodyum sülfür. Kontrol grubuna göre *p<0,05; CHS grubuna göre $^{\#}$p<0,05, $^{\#\#}$p<0,01. Tek yönlü varyans analizi, post hoc Tukey testi. Veriler ortalama ± SD olarak sunulmuştur (n = 6-7)



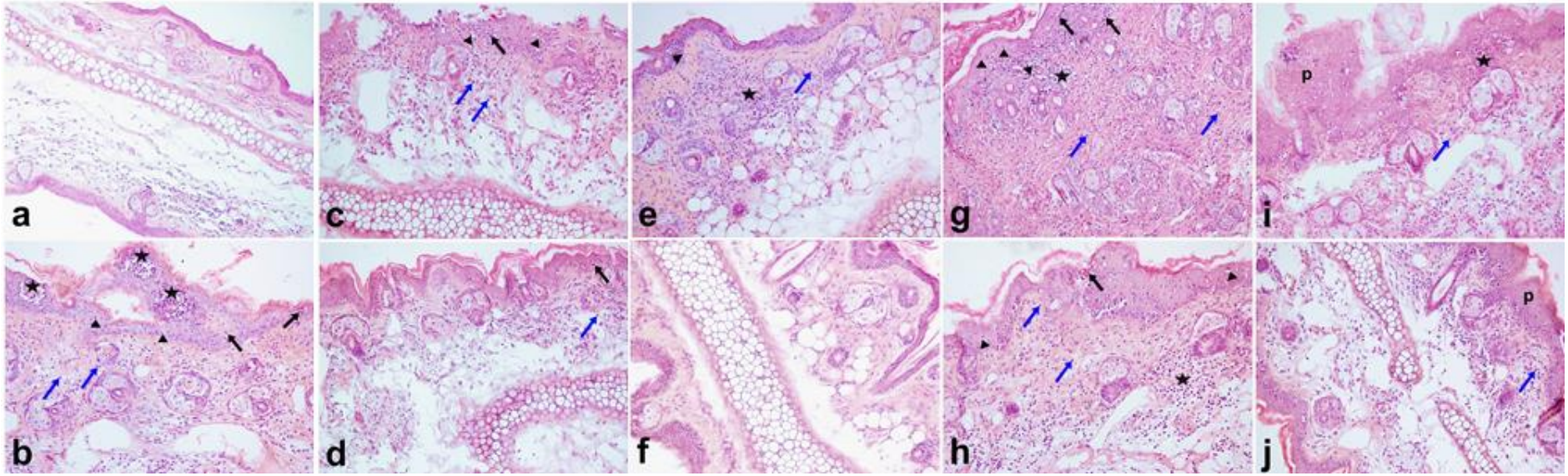
Şekil 12. A. Lokal; B. Sistemik hidrojen sülfür uygulamasının deri dokusu sitokin düzeyleri üzerine etkisi

CHS: *Contact hipersensitvity*; **Na_2S:** Sodyum sülfür. Tek yönlü varyans analizi, post hoc Tukey testi. Veriler ortalama ± SD olarak sunulmuştur (n = 6-7)

HİDROJEN SÜLFÜRÜN HİSTOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE ETKİSİ

Hematoksilen & Eozin Boyaması

Tedavi edilmemiş farelerin (lokal ve sistemik kontroller) H&E boyalı kesitlerinden elde edilen fotomikrograflar, iyi tanımlanmış epidermal ve dermal katmanlara sahip normal deri yapısı görüldü. Keratin tabakası iyi şekillenmişti ve epidermisin en üst tabakasının hemen bitişiğinde yer alıyordu (Şekil 13-a,f). CHS gruplarında hafif ila orta derecede hiperkeratoz veya parakeratoz görüldü. Keratinositler arasında piknotik çekirdeklerle apoptoz tespit edildi. Etkilenen kulak derisinin diğer histolojik özelliği epidermal ödem (spongiozis) idi. Çoğunlukla nötrofilik ve daha az lenfoid infiltrat hem epidermis hem de dermiste lokalize olmuştu. Papiller dermiste ciddi şekilde genişlemiş küçük kan damarları ve fokal ve yaygın inflamatuvar infiltrat görüldü (Şekil 13-b-e, g-j).



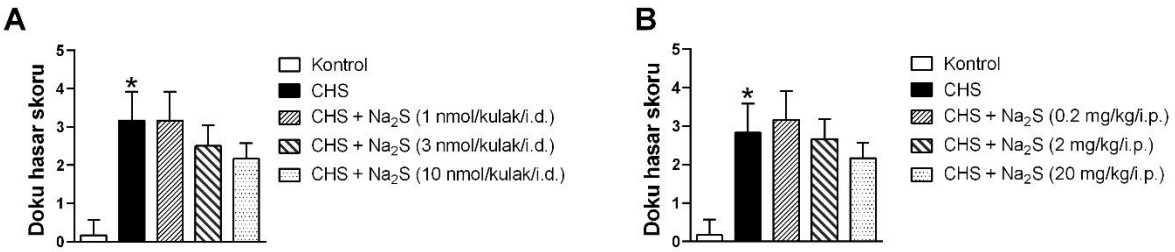
Şekil 13. Kulak dokusu H&E boyamaları

a) lokal kontrol, **b)** lokal CHS, **c)** CHS + Na_2S (1 nmol/kulak/i.d.), **d)** CHS + Na_2S (3 nmol/kulak/i.d.), **e)** CHS + Na_2S (10 nmol/kulak/i.d.), **f)** sistemik kontrol, **g)** sistemik CHS, **h)** CHS + Na_2S (0,2 mg/kg/i.p.) **i)** CHS + Na_2S (2 mg/kg/i.p.) **j)** CHS + Na_2S (20 mg/kg/i.p.). 200X. **Siyah ok**: apoptotik keratinosit, **ok başı**: spongioz, **yıldız:** nötrofil, **mavi ok:** lenfosit, **p:** parakeratoz.

CHS: *Contact hipersensitvity*; **Na_2S:** Sodyum sülfür.

Histolojik Hasar Skoru

Histopatolojik kriterlere göre sataşma sonrası 48. saatte lokal ve sistemik CHS gruplarında kontrol grubuna göre histolojik skorda artış görüldü (**p<0,001). 3 ve 10 nmol/kulak/i.d. Na_2S ve 20 mg/kg/i.p. Na_2S'nin i.p enjeksiyonu doku hasar gelişimini azalttı. Ancak CHS grubuna göre hasar skorundaki azalma istatistiksel anlamlı değildi (Şekil 14A-B).



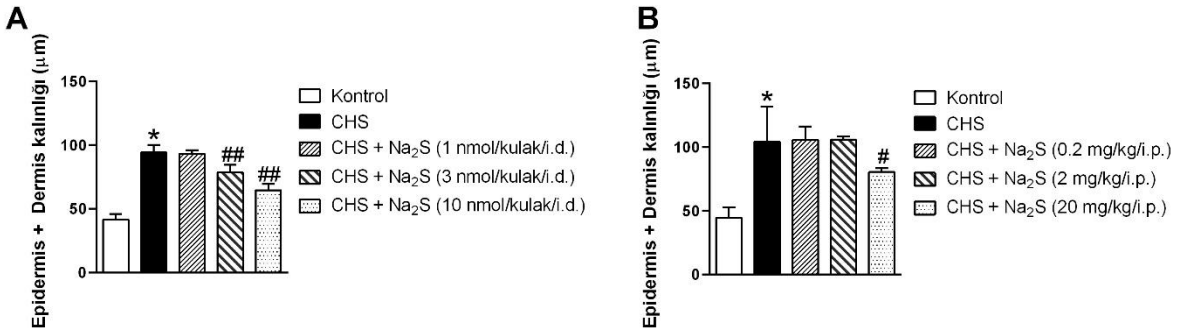
Şekil 14. A. Lokal; B. Sistemik tedavi grupları için doku hasar skoru

CHS: *Contact hipersensitvity*; **Na_2S:** Sodyum sülfür.

Kontrol grubuna kıyasla *p<0,01. Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's çoklu karşılaştırma testi. Veriler ortalama ± SD olarak sunulmuştur.

Epidermis + Dermis Total Kalınlığı

DFNB, epidermis + dermis kalınlığını lokal ve sistemik CHS gruplarında arttırdı (**p<0,0001). lokal 3 nmol\kulak\i.d., 10 nmol\kulak\i.d. ve sistemik 20 mg/kg/i.p. Na_2S uygulamaları epidermis + dermis kalınlığında azalmaya yol açtı ($^{\#\#}$p<0,0001, $^{\#\#}$p<0,0001 ve $^{\#}$p<0,01 sırasıyla, Şekil 15A-B).



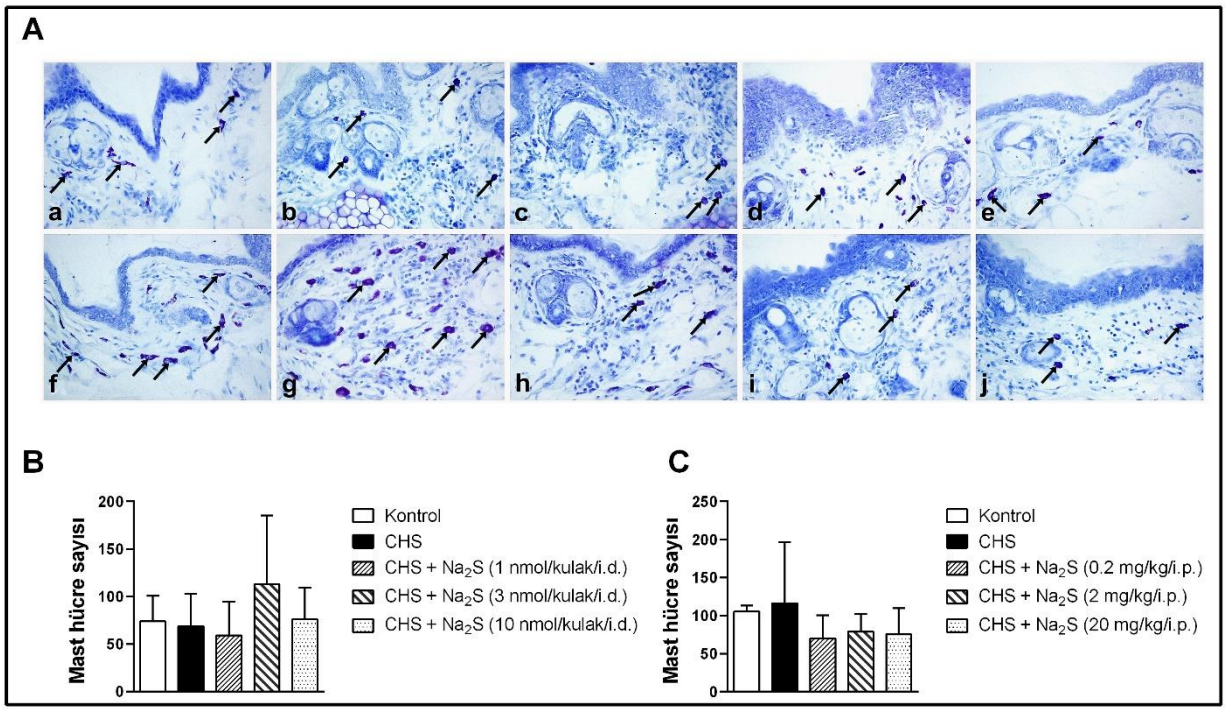
Şekil 15. A. Lokal; B. Sistemik tedavi grupları için epidermis + dermis kalınlığı

CHS: *Contact hipersensitvity*; **Na_2S:** Sodyum sülfür.

Kontrol grubuna göre *p<0,0001; CHS grubuna göre $^{\#}$p<0,05, $^{\#\#}$p<0,0001. Tek yönlü varyans analizi, post hoc Tukey testi. Veriler ortalama ± SD olarak sunulmuştur.

Toluidin Boyaması

Şekil 16'da toluidin mavisi ile etiketlenmiş MC'ler gösterildi. Metakromatik hücreler dermiste sayıldı. Mast hücrelerinin 48. saatteki sayıları karşılaştırıldığında, kontrol ve CHS grupları arasında bir fark gözlenmedi.



Şekil 16. A. Kulak dokusu toluidin mavisi boyamaları B. Lokal tedavi gruplarında mast hücre sayısı. C. Sistemik tedavi gruplarında mast hücre sayısı

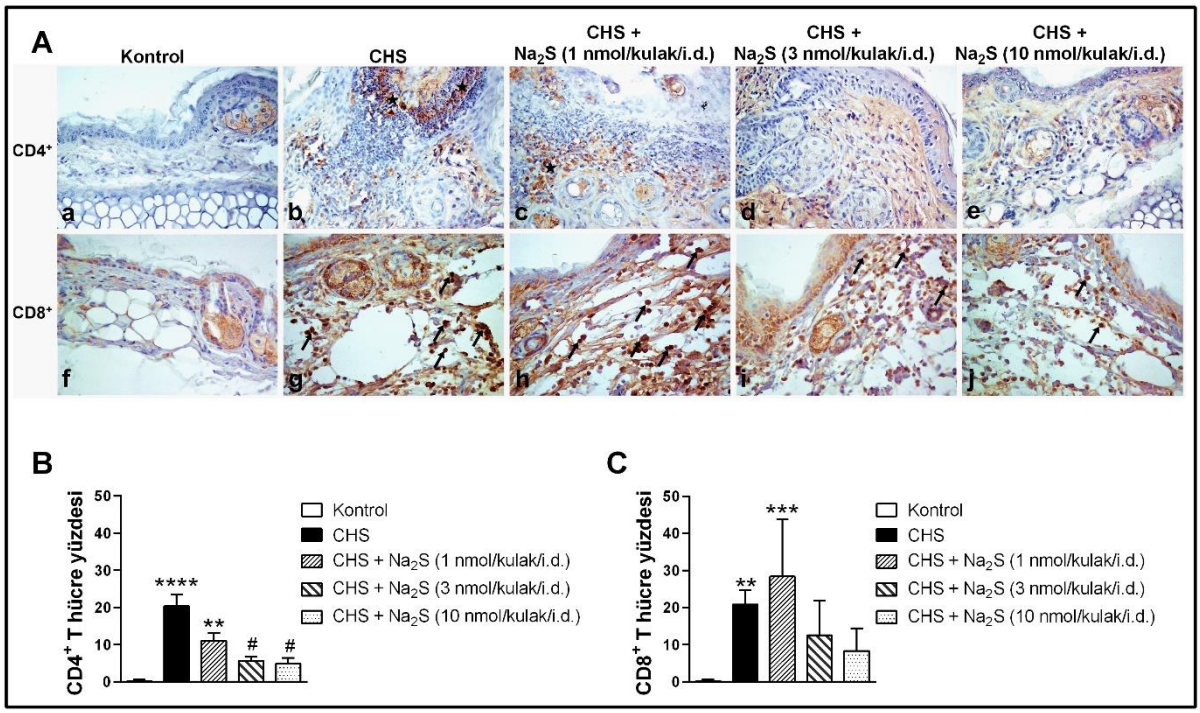
a) lokal kontrol, **b)** lokal CHS, **c)** CHS + Na_2S (1 nmol/kulak/i.d.), **d)** CHS + Na_2S (3 nmol/kulak/i.d.), **e)** CHS + Na_2S (10 nmol/kulak/i.d.), **f)** sistemik kontrol, **g)** sistemik CHS, **h)** CHS + Na_2S (0,2 mg/kg/i.p.) **i)** CHS + Na_2S (2 mg/kg/i.p.) **j)** CHS + Na_2S (20 mg/kg/i.p.). 200X. **Siyah ok**: mast hücresi. Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's çoklu karşılaştırma testi. Veriler ortalama ± SD olarak sunulmuştur.
CHS: *Contact hipersensitvity*; **Na_2S:** Sodyum sülfür.

HİDROJEN SÜLFÜRÜN T HÜCRE İNFİLTRASYONU VE FARKLILAŞMASI ÜZERİNE ETKİSİ

Lokal Tedavinin Etkisi

İmmünohistokimyasal profil, yaygın $CD8^+$ ve fokal $CD4^+$ eksprese eden atipik lenfositler gözlendi. DNFB ile indüklenen CHS gruplarında $CD8^+$ hücre yüzdesi $CD4^+$ hücre yüzdesinden daha yüksekti (Şekil 17B-C, Şekil 18B-C).

Şekil 17, lokal tedavi gruplarından $CD4^+$ (a-e) ve $CD8^+$ (f-j) immünoreaktivitesini göstermektedir. Kahverengi sitoplazmik boyanma her iki T lenfosit tipi için de sayılmıştır. $CD4^+$ immünoreaktivitesi epidermis ve papiller dermisteki fokal nötrofilik infiltratların periferinde görüldü. $CD8^+$ T lenfositleri dermiste çoğunlukla yaygın dağılım gösterdi (g-j). Lokal Na_2S uygulamaları 1 nmol/kulak/i.d. tedavi grubu hariç $CD4^+$ hücre yüzdesini azalttı (Şekil 17C).



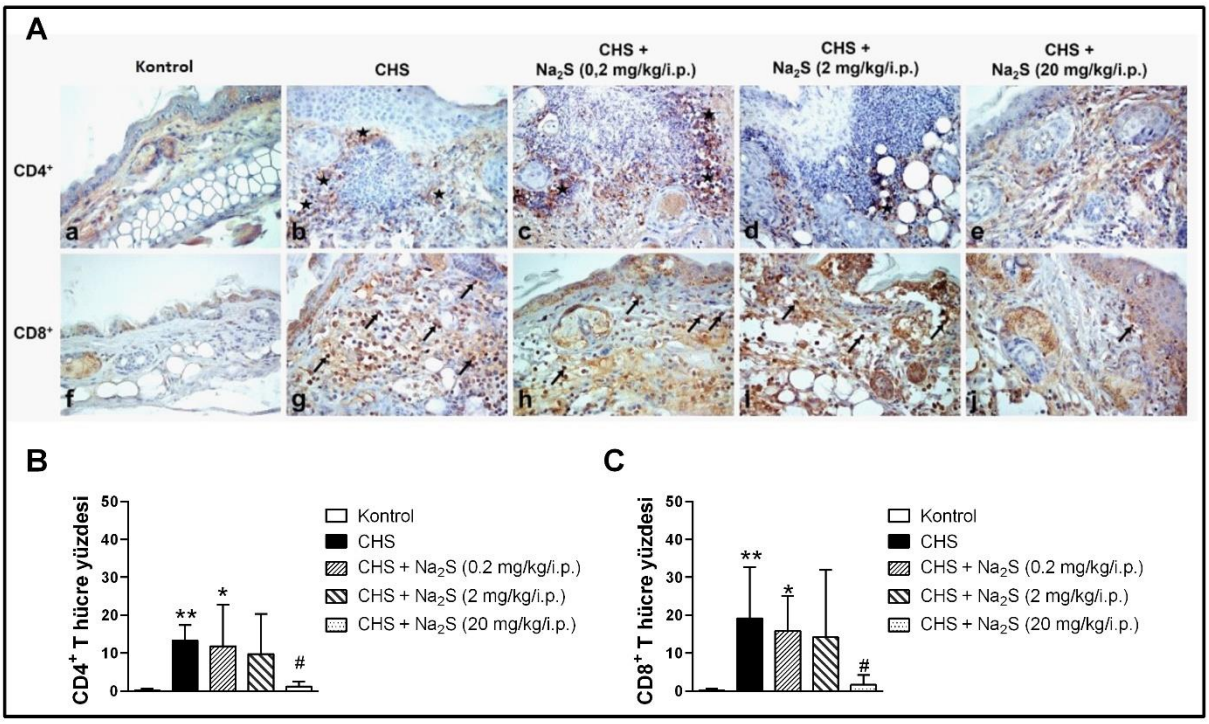
Şekil 17. A. Lokal tedavi gruplarında kulak örneklerinde $CD4^+$ (a-e) ve $CD8^+$ (f-j) hücrelerinin dağılımı; B. $CD4^+$ hücrelerin yüzdesi; C. $CD8^+$ hücrelerinin yüzdesi.

A. a,f) lokal kontrol, **b,g)** lokal CHS, **c,h)** CHS + Na_2S (1 nmol/kulak/i.d.), **d,i)** CHS + Na_2S (3 nmol/kulak/i.d.), **e, j)** CHS + Na_2S (10 nmol/kulak/i.d.). **Yıldız:** $CD4^+$ hücreleri, **ok:** $CD8^+$ hücreleri. Hematoksilen karşı boyama. 400X. **B.** $CD4^+$ hücrelerinin yüzdesi. **C.** $CD8^+$ hücrelerinin yüzdesi. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 kontrol grubuna göre. CHS grubuna göre #p<0,05. Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's çoklu karşılaştırma testi. Veriler ortalama ± SD olarak sunulmuştur.

CHS: *Contact hipersensitvity*; **Na_2S:** Sodyum sülfür.

Sistemik Tedavinin Etkisi

Şekil 18 sistemik tedavi gruplarından $CD4^+$ (a-e) ve $CD8^+$ (f-j) immünoreaktivitesini göstermektedir. İnflamatuvar hücrelerin dağılımı lokal gruplara benzerdi. Sadece Na_2S 20 mg/kg/i.p. tedavisi $CD4^+$ ve $CD8^+$ hücre yüzdesini azalttı (Şekil 18B-C).



Şekil 18. A. Sistemik tedavi gruplarında kulak örneklerinde $CD4^+$ (a-e) ve $CD8^+$ (f-j) hücrelerin dağılımı; B. CD4+ hücre yüzdesi; C. CD8+ hücre yüzdesi.

Sistemik tedavi gruplarında kulak örneklerinde immünohistokimya boyaması. **A**. **a,f)** sistemik kontrol, **b,g)** sistemik CHS, **c,h)** CHS + Na_2S (0,2 mg/kg/i.p.), **d,i)** CHS + Na_2S (2 mg/kg/i.p.), **e,j)** CHS + Na_2S (20 mg/kg/i.p.) kulak örneklerinde $CD4^+$ (a-e) ve $CD8^+$ **(f-j). Yıldız:** $CD4^+$ hücreleri, **ok:** $CD8^+$ hücreleri. Hematoksilen karşı boyama. 400X. **B.** $CD4^+$ hücre yüzdesi, **C.** $CD8^+$ hücre yüzdesi. Kontrol grubuna göre *p<0,05, **p<0,01. CHS grubuna göre $^{\#}$p<0,05. Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's çoklu karşılaştırma testi. Veriler ortalama ± SD olarak sunulmuştur.

CHS: *Contact hipersensitvity*; **Na_2S:** Sodyum sülfür.

TARTIŞMA

Alerjik kontakt dermatit, yaşam kalitesini düşüren ve aynı zamanda ciddi ekonomik kayıplara yol açan dermatolojik bir hastalıktır. Alerjik kontakt dermatite yol açan haptenler ile maruziyet çoğu kez engellenemediğinden ilaç tedavisine ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde kullanılan standart tedavilerin yanında alerjik kontakt dermatite etkili olabilecek yeni etken madde arayışları halen devam etmektedir.

Kaşıntı deri hastalıklarının en sık görülen semptomudur ve kaşıntıya proteinaz ile aktive olan reseptör-2 (PAR-2) aktivasyonu aracılık eder. Sanchez ve ark. (58) farelerde SLIGRL-NH_2 ile oluşturdukları kaşıntı üzerine H_2S donörleri olan NaHS ve GYY4137'nin etkisini araştırmışlar ve doz bağımlı olarak etkinin değiştiğini göstermişlerdir. Rodrigues ve ark. (21) histamin ve 48/80 ile kaşıntı oluşturulan fare modellerinde Na_2S ve GYY4137'nin kaşıntıyı azalttığını göstermişlerdir.

Alshorafa ve ark. (20) yaptığı çalışmada psoriazis hastalarının serum H_2S seviyelerini anlamlı derecede düşük bulunmuşlardır.

Çalışmamız lokal ve sistemik uygulanan hidrojen sülfür donörü Na_2S tedavisinin AKD belirtisi olan kaşıntı üzerine etkisiz olduğunu göstermiştir. Ancak Na_2S'nin histamin ve 48/80 ile indüklenen kaşıntı üzerine etkili olduğunun gösterilmesi ve doz-yanıt grafiğinin çalışmamızla uyumlu olması (Şekil 10A-B U-şekilli eğriler), Na_2S'nin AKD belirtisi olarak oluşan kaşıntı üzerine etkisinin grup başına daha fazla hayvanla yapılacak çalışmalarla yeniden değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir (56).

Hidrojen sülfürün antiinflamatuvar etkili olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (21,63). İmmün hücrelerin değişen oranlarda H_2S sentezlediği ve H_2S'nin sitokin salımında rol aldığı bilinmektedir (19). Ancak H_2S'nin AKD belirtisi olan ve inflamasyona bağlı oluşan kulak ödemi üzerindeki etkisi araştırılmamıştır.

CHS modelinde genellikle inflamasyonun basit bir göstergesi olarak ölçülen parametre, ödeme bağlı kulak kalınlığıdır. Hem lokal hem de sistemik CHS kontrol gruplarımızda önceki çalışmalara benzer şekilde, kulak kalınlığının sataşma sonrası 24. saatte arttığını ve bu artışın 48. saatte de devam ettiğini belirledik (7,64,65). Lokal Na_2S tedavisinin tüm dozlarda kulak kalınlığını azaltırken, sistemik tedavinin 2 ve 20 mg/kg/i.p. dozlarında kulak kalınlığını azalttığını gözlemledik. Lokal ödem oluşumunda artan kapiller geçirgenlik önemli bir rol oynamaktadır (66). Aktive T lenfositlerin ve diğer inflamatuvar hücrelerin kapiller geçirgenliği artırdığı bilinmektedir (32). Hem lokal hem de sistemik Na_2S tedavisi 48. saatte $CD4^+$ T lenfosit sayısındaki azalmaya ek olarak ödemi de azaltmıştır; bu bulgu $CD4^+$ T lenfosit kaynaklı sitokinlerin ödem oluşumunda rol oynadığını düşündürmektedir. Sataşma sonrası 48. saatte alınan kulak dokusu ve serumda IFN-γ, IL-2, IL-4 ve IL-5 sitokinlerinin miktarlarını değerlendirdiğimizde, sadece lokal tedavi ile serum IL-2 seviyesinde bir düşüş tespit ettik. IL-2'nin kapiller geçirgenliği artırdığı ve hücreler arası boşlukta sıvı birikimine yol açtığı gösterilmiştir (67). Lokal uygulanan Na_2S tedavisinin serum IL-2 miktarını azaltarak ödem oluşumunu önlediğini düşünebiliriz, ancak sistemik CHS grubunda serum IL-2'de artış tespit edememiz önemli bir eksiklik olmuştur.

H_2S'nin alerjenle indüklenen hava yolu aşırı duyarlılığına ve iltihaplanmaya karşı koruyucu rolünün araştırıldığı bir çalışmada, farelerde ovalbümin ile uyarılan alerjik astım modelinde CSE ekspresyonu ve H_2S üretiminin azaldığı hava yolu direnci ve inflamasyonun arttığı ve bronkoalveolar lavaj sıvısında IL-5, IL-13 ve eotaksin-1 gibi Th2 sitokinlerin seviyelerinin yükseldiği görülmüştür. Eksojen NaHS uygulanması bu etkileri tersine çevirmiştir (68). Çalışmamızda gruplar arası IL-5 seviyeleri arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Th2 kaynaklı sitokinlerin alerjik astım patofizyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir. Th2 kaynaklı IL-5, alerjik astım patofizyolojisinde rol oynamasına rağmen AKD'de rolü tartışmalıdır (32).

Alerjik kontakt dermatit modeli oluşturularak oksimatrinin antipruritif ve antiinflamatuvar etkilerinin incelendiği bir çalışmada ilk sataşmadan 48, ikinci sataşmadan 24 saat sonra IL-2 ve IFN-γ'nın serum ve dalak dokusundaki seviyelerinde

anlamlı bir artış gözlenmiştir (69). Çalışmamızda benzer şekilde serum IL-2 seviyesinde sataşma sonrası 48. saatte anlamlı artış gözlendi. Ancak kulak dokusu IL-2 seviyelerinde bu artış tespit edilemedi. Kulak dokusu IL-2 ve IFN-γ seviyesinde istatistiksel anlamlılık tespit edememizin sebebi çalışmamızdaki fare tür ve cinsiyetinin farklı olması, sitokin seviyelerinin ölçüldüğü dokuların farklı olması olabileceği gibi çalışmada tercih edilen CHS metodunun (çalışmamızda iki gün duyarlılaşma ve tek sataşma uygulanması) farklı olması da olabilir. Yine aynı çalışmada IL-4 sitokin seviyeleri ölçülmüş ve çalışmamıza benzer şekilde gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilememiştir (69).

Histolojik bulgular incelendiğinde, lokal 3 ve 10 nmol/kulak/i.d. ve sistemik 20 mg/kg/i.p. Na_2S tedavi gruplarında 48. saatte nötrofilik/lenfositik infiltrasyon, spongiozis ve apoptozisde azalma görülmesine rağmen, tüm parametrelerin birlikte değerlendirildiği doku hasarı skorunda azalma görülmemiştir. Histolojik değişikliklerin zamanlamasını inceleyen çalışmalarda sataşma sonrası 24. saatten itibaren nötrofilik infiltrasyonun azaldığı ve lenfositik infiltrasyonun arttığı gösterilmiştir (70,71). Ancak bizim çalışmamızda 48. saatte hem tedavi hem de CHS gruplarında nötrofilik infiltrasyon daha yoğundu. Bu bulgu Na_2S'nin etkisinin muhtemelen lenfosit infiltrasyonu üzerine olduğunu düşündürmektedir. Epidermis ve dermis kalınlığı histolojik olarak ölçüldüğünde, kontrol ve CHS gruplarında önceki çalışmalara benzer sonuçlar elde edildi (72). Epidermis + dermis toplam kalınlığı değerlendirildiğinde, CHS gruplarında kontrol grubuna kıyasla kalınlığın yaklaşık iki kat arttığı belirlendi. Lokal 3-10 nmol/kulak/i.d. ve sistemik 20 mg/kg/i.p. tedavi gruplarında toplam kalınlıkta azalma gözlendi. Lokal 1 nmol/kulak/i.d. ve sistemik 2 mg/kg/i.p. tedavi grupları dışında, kulak kalınlığı ölçümü ve epidermis + dermis toplam kalınlık ölçümleri bulguları benzerdi.

CHS patofizyolojisinde mast hücrelerinin rolü tartışmalıdır. Sataşma sonrası 5. günde, genetik olarak mast hücre eksikliği bulunan farelerde kulak ödemi wild tip farelere kıyasla artmıştır. Mast hücreleri tarafından sentezlenen IL-10'un ödem gelişimini baskıladığı belirlenmiştir (73). Bizim çalışmamızda, 48. saatte mast hücrelerinin sayısında bir fark bulunmamıştır. Bu gözlem, mast hücrelerinin sayısının Na_2S'nin ödem önleyici etkisinde rol oynamadığını düşündürmektedir. Na_2S'nin mast hücrelerinden sentezlenen IL-10 üzerindeki etkisini değerlendirmek için sataşma sonrası 5.gün ve daha sonrasını inceleyen çalışmalar yapılmalıdır.

İmmünohistokimyasal boyamalar incelendiğinde, kontrol gruplarında epidermis veya dermiste önemli bir T hücresi infiltrasyonu gözlenmemiştir. Lenfositik infiltrasyon değerlendirildiğinde, CHS gruplarında $CD8^+$ T hücre yoğunluğunun $CD4^+$ T hücre yoğunluğundan daha fazla olduğu belirlendi. $CD8^+$ T hücrelerinin dermise yerleştiği, $CD4^+$ T hücrelerinin ise papiller dermis ve epidermiste nötrofillerin etrafında lokalize olduğu gözlenmiştir. Sataşma döneminde yeniden maruz kalınan antijenin efektör T lenfositlerine nasıl sunulduğu araştırılmaktadır. Son yıllarda, postkapiller venüllerin etrafında bulunan makrofajlar, dendritik hücreler ve efektör T lenfositlerinden oluşan ve deri ile ilişkili lenfoid doku (iSALT) olarak adlandırılan geçici bir yapıda bu sunumun gerçekleştiği gösterilmiştir (36,74). $CD4^+$ T hücrelerinin lokal odaklar halinde yerleşmesi iSALT oluşumuna benzemektedir; çalışmamızda makrofaj ve damar boyaması yapılamadığı için bu durum doğrulanamamıştır. Lokal 3-10 nmol/kulak/i.d. ve sistemik 20 mg/kg/i.p. Na_2S dozları ile tedavide, odaklarda bulunan $CD4^+$ T lenfositlerin sayısında azalmalar tespit edilmiştir. Bu durum Na_2S tedavisinin iSALT oluşumunu etkileyebileceğini düşündürmektedir. Sistemik 20 mg/kg/i.p. Na_2S uygulaması ile $CD8^+$ T lenfosit sayısında da azalma tespit edilmiştir. Bu bulgu, sistemik uygulamanın lokal iSALT oluşumu dışında lenf düğümlerinde bulunan hücreleri de etkileyebileceğini düşündürmektedir. Birlikte ele alındığında, Na_2S'nin etkisini özellikle $CD4^+$ T lenfositleri üzerinde gösterdiği düşünülmektedir. Çalışmamızda $CD4^+$ T hücre alt tipleri belirlenmemiştir. Bununla birlikte, lokal tedavi ile serum IL-2 seviyesindeki düşüş göz önüne alındığında, etkinin Th1 alt tipi üzerinde olduğu düşünülebilir.

SONUÇLAR

Alerjik kontakt dermatitin neden olduğu semptomlar üzerine H_2S'nin etkilerini incelemek amacıyla yaptığımız çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- Hem lokal hem de sistemik Na_2S tedavisi 48. saatte cilt $CD4^+$ T lenfosit sayısında azalmaya ek olarak ödemi de azalttı. Bu bulgu $CD4^+$ T lenfosit kaynaklı sitokinlerin ödem oluşumunda rol oynadığını düşündürmektedir.
- Lokal uygulanan Na_2S tedavisinin serum IL-2 miktarını azaltarak ödem oluşumunu önlediğini düşündük, ancak sistemik CHS grubunda serum IL-2'de artış tespit edememiz önemli bir eksiklik oldu.
- Lokal ve sistemik uygulanan Na_2S tedavisine yanıt olarak 48. saatte azalan $CD4^+$ T hücre alt tipinin/tiplerinin hangileri olduğunu belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Lokal ve sistemik olarak uygulanan Na_2S, DNFB uygulanması ile artan epidermis + dermis kalınlığında azalmaya neden oldu. Bu bulgunun kulak kalınlığının kumpas ile ölçümü ile uyumlu olduğu görüldü.
- Lokal ve sistemik Na_2S uygulaması kaşıntıyı azaltmamıştır. Bununla birlikte, Na_2S'nin histamin ve bileşik 48/80 ile indüklenen kaşıntılar üzerinde etkili bulunması ve doz-yanıt grafiğinin çalışmamızla uyumlu olması, grup başına daha fazla denekle çalışmalar yapılması gerektiğini düşündürmektedir.
- Lokal ve sistemik Na_2S tedavisi ile mast hücre yoğunluğunda bir değişiklik gözlenmedi. Mast hücrelerinin AKD'deki rolü tartışmalı olsa da mast hücreleri tarafından üretilen IL-10'un ödem gelişimini baskıladığı gösterilmiştir. IL-10'un

ödem azalmasındakini etkisini incelemek amacıyla daha uzun gözlemlerin yapıldığı kronik AKD modelleri ile çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda sataşma sonrası 48 saatlik gözlem yapılmıştır ve IL-10 seviyeleri ölçülmemiştir. Sonuç olarak lokal ve sistemik Na_2S tedavisinin CHS belirtilerinden ödemi azalttığını, kaşıntı üzerine etkisinin olmadığını, etki mekanizmasının $CD4^+$ T lenfositler üzerinden olduğunu belirledik.

ÖZET

Bu çalışmada hidrojen sülfür donörü sodyum sülfürün lokal ve sistemik yolla uygulanmasının alerjik kontakt dermatit belirtileri olan kaşıntı ve ödem üzerine olası etkisini göstermeyi ve etkinin hangi inflamatuvar hücreler-sitokinler üzerinden olduğunu belirlemeyi amaçladık.

Seksen BALB/c dişi fare rastgele lokal veya sistemik olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. Her ana grup kendi içinde beş alt gruba ayrıldı. Farelerde deneysel alerjik kontakt dermatit modeli DNFB kullanılarak oluşturuldu.

Farelerin karın bölgesine 1. ve 2. gün %0,2'lik 100 mikrolitre DNFB uygulanarak duyarlılaştırma yapıldı. 7. gün farelerin her iki kulağına 20 mikrolitre %0,3 DNFB uygulanarak sataşma yapıldı. Sataşma sonrası 3. ve 25. saatlerde H_2S donörü Na_2S sistemik olarak 0,2-2 ve 20mg/kg/i.p. dozlarında ve lokal olarak 1-3 ve 10 nmol/kulak/i.d. dozlarında uygulandı. Sataşma sonrasında 24. ve 48. saatlerde kulak kalınlıkları ölçüldü ve kaşınma davranışları sayıldı. Ölçümlerin ardından 48. saatte kulak dokusu ve kan örneği alındı. Serum ve kulak dokusu sitokin seviyeleri ölçüldü. Dokular histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi.

Lokal 3-10 nmol/kulak, sistemik 20 mg/kg Na_2S tedavisi 48. saatte cilt $CD4^+$ T lenfosit sayısını azalttı ($p<0,05$). Lokal 1-3-10 nmol/kulak, sistemik 2-20 mg/kg Na_2S tedavisi 48. saatte kulak ödemini azalttı ($p<0,05$). Lokal Na_2S tedavisi tüm dozlarda serum IL-2 seviyelerinde azalma oluşturdu ($p<0,05$). Kaşıntı sayısı, mast hücre yoğunluğu, IL-4,IL-5 ve IFN-γ seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmedi.

Sonuçlarımız lokal ve sistemik uygulanan Na_2S'nin, muhtemelen $CD4^+$ T lenfosit infiltrasyonunu ve proliferasyonunu önleyerek ve IL-2 sentezini azaltarak AKD semptomlarından biri olan kulak kalınlığını azalttığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Alerjik kontakt dermatit, hidrojen sülfür, sodyum sülfür

ANTIPRURITIC AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF HYDROGEN SULFIDE DONOR SODIUM-SULFIDE IN AN EXPERIMENTAL MOUSE MODEL OF ALLERGIC CONTACT DERMATITIS

SUMMARY

In this study, we aimed to show the possible effects of local and systemic application of the hydrogen sulfide donor sodium sulfide on itching and edema, which are the symptoms of allergic contact dermatitis, and to determine which inflammatory cells-cytokines mediate the effect.

Eighty BALB/c female mice were randomly divided into two main groups: local or systemic. Each main group was divided into five subgroups in its own. An experimental model of allergic contact dermatitis in mice was established using by DNFB.

Sensitization was performed by applying 100 microliters of 0.2% DNFB to the abdominal region of mice on the 1st and 2nd day. On the 7th day, elicitating was done by applying 20 microliters of 0.3% DNFB to both ears of the mice. At 3 and 25 hours after elicitation, the H_2S donor Na_2S was administered systemically at doses of 0.2-2 and 20 mg/kg/i.p. and locally at doses of 1-3 and 10 nmol/ear/i.d. At 24 and 48 hours after elicitation, ear thickness was measured and scratching behaviors were counted. Ear tissue and blood samples were taken at 48 hours after the measurements. Serum and ear tissue cytokine levels were measured. Tissues were examined histologically and immunohistochemically.

Local 3-10 nmol/ear and systemic 20 mg/kg Na_2S treatment decreased number of skin CD4+ T lymphocyte at 48 hours ($p<0.05$). Local 1-3-10 nmol/ear and systemic 2-20 mg/kg Na_2S treatment decreased 48th ear edema ($p<0.05$). Local Na_2S treatment decreased serum IL-2 levels at all doses ($p<0.05$). No statistically significant change was observed in itch count, mast cell density, IL-4, IL-5 and IFN-γ levels.

Keywords: Allergic contact dermatitis, hydrogen sulfıde, sodium sulfide.

KAYNAKLAR

1. Dorynska A, Spiewak R. Epidemiology of skin diseases from the spectrum of dermatitis and eczema. Malays J Dermatol 2012;29:1-11.

2. Makrgeorgou A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall FJ, Murrell DF, Tang MLK, Roberts A, Boyle RJ. Probiotics for treating eczema. Cochrane Database Syst Rev 2018 Issue 11. Art. No:CD006135.

3. Ackerman AB, Ragaz A. A plea to expunge the word “eczema” from the lexicon of dermatology and dermatopathology. Arch Dermatol Res 1982;272(3-4):407-20.

4. Brasch J, Becker D, Aberer W, Bircher A, Kranke B, Fürst SD, et al. Contact Dermatitis. J Dtsch Dermatol Ges 1610-0379. 2007;P.943-51.

5. Scheinman PL, Vocanson M, Thyssen JP, Johansen JD, Nixon BL, Sevgili K, et al. Contact dermatitis. Nat Rev Dis Primers 2021;7:38.

6. Novak-Bilic G, Vucic M, Japundzic I, Mestrovic-Stefekov J, Stanic-Duktaj S, Lugovic-Mihic L. Irritant and allergic contact dermatitis–skin lesion characteristics. Acta Clin Croat 2018;57(4):713-20.

7. Petrosino S, Cristino L, Karsak M, Gaffal E, Ueda N, Tüting T, et al. Protective role of palmitoylethanolamide in contact allergic dermatitis. Allergy 2010;65(6):698-711.

8. Alikhan A, Maibach H. I. Allergic contact dermatitis. In History of Allergy Chem Immunol Allergy 2014;10:97-100.

9. Kaplan DH, Igyarto BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. Nat Rev Immunol 2012;12(2):114-24.

10. Diepgen TL, Ofenloch RF, Bruze M, Bertuccio P, Cazzaniga S, Coenraads PJ, et al. Prevalence of contact allergy in the general population in different European regions. Br J of Dermatol 2016;174(2):319-29.

11. Uter W, Werfel T, Lepoittevin JP, White IR. Contact allergy—emerging allergens and public health impact. Int. J. Environ. Res. Public Health 2020;17(7):2404.

12. Pesonen M, Koskela K, Aalto-Korte K. Contact urticaria and protein contact dermatitis in the Finnish Register of Occupational Diseases in a period of 12 years. Contact Dermatitis 2020;83(1):1-7.

13. Helaskoski E, Suojalehto H, Kuuliala O, Aalto-Korte K. Occupational contact urticaria and protein contact dermatitis: causes and concomitant airway diseases. Contact Dermatitis 2017;77(6):390-96.

14. Uyesugi BA, Sheehan MP. Patch testing pearls. Clinic Rev Allerg Immuno 2019;56:110-18.

15. Ada S, Aşkın Ü, Güleç AT, Seçkin D. Alerjik Kontakt Dermatit Tanısıyla Deri Yama Testi Yapılan 775 Hastanın Sonuçları, Türkderm. 2010;44:187-92.

16. Vocanson M, Hennino A, Rozieres A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. Allergy 2009;64(12):1699-1714.

17. Simonetta F, Bourgeois C. Animal Models of Contact Dermatitis, ResearchGate 2011;p.24-38.

18. Manresa MC. Animal Models of Contact Dermatitis: 2,4-Dinitrofluorobenzene-Induced Contact Hypersensitivity. In: Nagamoto-Combs K, ed. Animal Models of Allergic Disease Methods and Protocols. US_Humana 2021;87-100:chap 7.

19. Dilek N, Papapetropoulos A, Kinsky TT, Szabo C. Hydrogen sulfide: An endogenous regulator of the immune system, Pharmacol Res 2020;161:105119.

20. Alshorafa AKH, Guo Ç, Zeng F, Chen MC, Tan G, Tang Z, et al. Psoriasis Is Associated with Low Serum Levels of Hydrogen Sulfide, A Potential Anti-ıinflamatory Molecule, Tohoku J. Exp. Med. 2012;228:325-32.

21. Rodrigues L, Valentim EE, Florenzano J, Cerqueira ARA, Soares AG, Schmidt TP, et al. Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice, Pharmacol Res 2017;115:255–66.

22. Moore PK, Whiteman M. Chemistry, Handbook of Experimental Pharmacology In: Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide. United Kingdom: University of Exeter Medical School Exeter 2015;P.3-7.

23. Frosch PJ, Rustemeyer TH, Schnuch A. Kontakt dermatitis, Hautarzt 1996;47:874–82

24. Bains SN, Fonacier L. Irritant contact dermatitis. Clinic Rev Allerg Immuno. 2019;56(1):99-109.

25. Rubins A, Romanova A, Septe M, Maddukuri S, Schwartz RA, Rubins S. Contact dermatitis: Etiologies of the allergic and irritant type. Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica et Adriat 2020;29:181-184.

26. Li Y, Li L. Contact dermatitis: classifications and management. Clinic Rev Allerg Immuno 2021;61(3):245-81.

27. Nassau S, Fonacier L. Allergic contact dermatitis. Medical Clinics 2020;104(1):61-76.

28. Önder M. Allerjik Kontakt Dermatitler/Allergic Contact Dermatitis. Türkderm 2009;43(1):3.

29. Korkmaz P. Yama Testinin Allerjik Kontakt Dermatit Hastalarında Uzun Dönemde Yaşam Kalitesi Üzerine Etkisi ve Bu Etkide Rol Oynayan Faktörler (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2017.

30. Curzytek K, Kubera M, Szczepanik M, Kaim AB, Leskiewicz M, Budziszewska B, et al. Crosstalk between contact hypersensitivity reaction and antidepressant drugs. Pharmacol Rep 2013;65(6):1673-80.

31. Karlberg AT, Börje A, Johansen JD, Liden C, Rastogi S, Roberts D, et al. Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent sensitizers–prehaptens and prohaptens. Contact Dermatitis 2013;69(6):323-34.

32. Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. J Invest Dermatol 2013;133(2):303-15.

33. McAleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. J Allergy Clin Immunol. 2013;131(2):280-291.

34. Bäsler K, Brandner J.M. Tight junctions in skin inflammation. Pflugers Arch 2017;469(1):3-14.

35. Christensen AD, Haase C. (2012). Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice. Apmis 120(1):1-27.

36. Honda T, Kabashima K. Novel concept of iSALT (inducible skin-associated lymphoid tissue) in the elicitation of allergic contact dermatitis. Proc. Jpn. Acad., Ser. B 2016;92(1):20-28.

37. McMinn PC, Halliday GM, Muller HK. Effects of gliotoxin on Langerhans' cell function: contact hypersensitivity responses and skin graft survival. Immunology 1990;71(1):46.

38. Cumberbatch M, Kimber I. Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. Immunology 1995;84(1):31.

39. Martin SF, Esser PR, Weber FC, Jakob T, Freudenberg MA, Schmidt M, et al. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. Allergy 2011;66(9):1152-63.

40. Dudeck A, Dudek J, Scholten J, Petzold A, Surianarayanan S, Köhler A, et al. Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. Immunity 2011;34(6):973-84.

41. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Tejero L, Lichtenberger S, Grant EP, et al. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. Immunity 2006;24(3):317-27.

42. Honda T, Matsuoka T, Ueta M, Kabashima K, Miyachi Y, Narumiya Ş Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol 2009;124:809–18 e2

43. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. J. Immunol 2006;177(10):6852-6858.

44. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H. IL-17 and IFN-γ mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses. J. Immunol 2009;183(2):1463-1470.

45. Gocinski BL, Tigelaar RE. Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. J Immunol 1990;144:4121:8.

46. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H. IL-17 and IFN-γ mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses. J. Immunol 2009;183(2):1463-70.

47. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, et al. Kabashima, K. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. The J Clin Invest 2010;120(3):883-93.

48. Thomson KF, Wilkinson SM, Sommer S, Pollock B. Epidemiology and Health Services Research Eczema: quality of life by body site and the effect of patch testing, Br J Dermatol 2002;146:627–30.

49. Kostner L, Anzengruber F, Guillod C, Recher M, Grendelmeier PS, Navarini AA. Allergic Contact Dermatitis, Immunol Allergy Clin N Am 37 2017;141–152.

50. https://www.aid.org.tr/hastaliklar/alerji-ve-bagisiklik-sistemi-hastaliklari/kontakt-dermatit (son erişim tarihi:29.11.2022)

51. Wang R. Physiological Implıcations of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration That Blossomed, Physiol Rev 2012;92:791–896.

52. Qu K, Lee SW, Bian JS, Low CM, Wong PTH. Hydrogen sulfide: Neurochemistry and neurobiology, Neurochem Int 2008;52:155–65.

53. Lowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H_2S) – the third gas of interest for pharmacologists, Pharmacol Rep 2007;59:4-24.

54. Wang XL, Tian B, Huang Y, Peng XY, Chen LH, Li JC, et al. Hydrogen sulfide-induced itch requires activation of Cav3.2 T-type calcium channel in mice, Sci Rep 2015;5:16768.

55. Sanchez SAC, Costa SKP, Muscara MN. Hydrogen sulfide and dermatological diseases, Br J Pharmacol 2020;177:857–865.

56. Xu M, Zhang L, Song S, Pan L, Arslan IM, Chen Y, Yang S. Hydrogen sulfide: Recent progress and perspectives for the treatment of dermatological diseases, J Adv Res 2021;27:11-17.

57. Bajgai J, Fadriquela A, Ara J, Begum R, Ahmed MF, Kim CS, et al. Balneotherapeutic effects of high mineral spring water on the atopic dermatitis-like inflammation in hairless mice via immunomodulation and redox balance, BMC Complement Altern Med 2017;17:481.

58. Sanchez SAC, Rodrigues L, Teixeira SA, Soares AG, Torregrossa R, Wood ME, et al. Hydrogen sulfide donors alleviate itch secondary to the activation of type-2 protease activated receptors (PAR-2) in mice, Pharmacol Res 2016;113:686-94.

59. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. The National Academies Press 2011;246.

60. Saglam G, Gunduz O, Ulugol A. Blockade of cannabinoid CB1 and CB2 receptors does not prevent the antipruritic effect of systemic paracetamol. Acta Neurol Belg 2014;114(4):307-9.

61. Gunduz O, Topuz RD, Todurga ZG, Duvan K, Karadag CH, Ulugol A. Effect of Activation of the GLT-1 Transporter by a Beta-Lactam Antibiotic on Serotonin-Induced Scratching Behavior in Mice. Neurophysiology 2015;47(1):36-39.

62. Sosa TM, Sanchez MB, Pietrobon MB, Fernandez Munoz JM, Martin Zoppino FC, Neira FJ, et al. Desmoglein-4 Deficiency Exacerbates Psoriasiform Dermatitis in Rats While Psoriasis Patients Displayed a Decreased Gene Expression of DSG4. Front Immunol 2021;12:625617.

63. Wallace JL, Ferraz JG, Muscara MN. Hydrogen sulfide: an endogenous mediator of resolution of inflammation and injury. Antioxid Redox Signal 2012;17(1):58-67.

64. Saika A, Nagatake T, Hirata SI, Sawane K, Adachi H, Abe Y, et al. ω3 fatty acid metabolite, 12-hydroxyeicosapentaenoic acid, alleviates contact hypersensitivity by downregulation of CXCL1 and CXCL2 gene expression in keratinocytes via retinoid X receptor α. Faseb j. 2021;35(4):e21354.

65. Liu J, Harberts E, Tammora A, Girardi N, Dolgu RB, Fishelevich R, et al. IL-9 regulates allergen-specific Th1 responses in allergic contact dermatitis. J Invest Dermatol 2014;134(7):1903-11.

66. Lent-Schochet D, Jialal I. Physiology, Edema. StatPearls. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC 2022.

67. Dhupkar P, Gordon N. Interleukin-2: Old and New Approaches to Enhance Immune-Therapeutic Efficacy. Adv Exp Med Biol 2017;995:33-51.

68. Zhang G, Wang P, Yang G, Cao Q, Wang R. The inhibitory role of hydrogen sulfide in airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of asthma.Am J Pathol 2013;182(4):1188-95.

69. Xu X, Xiao W, Zhang Z, Pan JH, Yan Y, Zhu T, et al. Anti-pruritic and anti-inflammatory effects of oxymatrine in a mouse model of allergic contact dermatitis. J Dermatol Sci 2018;91(2):134-41.

70. Mitsui G, Hirano T, Niwano Y, Mitsui K, Ohara O, Yanagihara S, et al. Effect of a topical steroid on gene expressions for chemokines in mice with contact hypersensitivity. Int Immunopharmacol 2004;4(1):57-69.

71. Mitsui G, Mitsui K, Hirano T, Ohara O, Kato M, Niwano Y. Kinetic profiles of sequential gene expressions for chemokines in mice with contact hypersensitivity. Immunol Lett 2003;86(2):191-7.

72. Zaladonis A, Zhang X, Manupipatpong KK, Kalaiselvan S, Alvarez P, Jensen LE. Interleukin-36 (IL-36) system in the 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB) mouse model of allergic contact dermatitis. Allergy 2020;75(8):2078-81.

73. Grimbaldeston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, Galli SJ. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. Nat Immunol 2007;8(10):1095-104.

74. Honda T, Egawa G, Kabashima K. Antigen presentation and adaptive immune responses in skin. Int Immunol 2019;31(7):423-29.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. H_2S biyosentezi……..…15

Şekil 2. Hayvanların karınlarının tıraş edilmesi……25

Şekil 3. Duyarlılaşma için solüsyon uygulanması……..……25

Şekil 4. Sataşma için kulaklara solüsyon uygulanması……..……25

Şekil 5. İntraperitoneal (i.p.) enjeksiyon……...……25

Şekil 6. Kulağa intradermal (i.d.) enjeksiyon……...……26

Şekil 7. Kulak kalınlığı ölçümü……...……26

Şekil 8. Kaşıntı sayımı……..……26

Şekil 9. A. Lokal; **B.** Sistemik hidrojen sülfür uygulamalarının kulak kalınlığı üzerindeki etkisi……..…….....……28

Şekil 10. A. Lokal; **B.** Sistemik hidrojen sülfür uygulamasının kaşıma sayısı üzerindeki etkisi……..……..……29

Şekil 11. A. Lokal; **B.** Sistemik hidrojen sülfür uygulamasının serum sitokinleri üzerindeki etkisi..……..……31

Şekil 12. A. Lokal; **B.** sistemik hidrojen sülfür uygulamasının deri dokusu sitokinleri üzerindeki etkisi……..……..32

Şekil 13. Kulak dokusu H&E boyamaları ……..……33

Şekil 14. A. Lokal; **B.** Sistemik tedavi grupları için doku hasar skoru.....……34

Şekil 15. A. Lokal; **B.** Sistemik tedavi grupları için epidermis + dermis kalınlığı…....35

Şekil 16. A. Kulak dokusu toluidin mavisi boyamaları **B.** Lokal tedavi gruplarında mast hücre sayısı. **C.** Sistemik tedavi gruplarında mast hücre sayısı**……...**36

Şekil 17. A. Lokal tedavi gruplarında kulak örneklerinde $CD4^+$ (a-e) ve $CD8^+$ (f-j) hücrelerinin dağılımı; **B.** $CD4^+$ hücrelerin yüzdesi; **C.** $CD8^+$ hücrelerinin yüzdesi**.…**37

Şekil 18. A. Sistemik tedavi gruplarında kulak örneklerinde $CD4^+$ (a-e) ve $CD8^+$ (f-j) hücrelerin dağılımı; **B.** $CD4^+$ hücre yüzdesi; **C.** $CD8^+$ hücre yüzdesi**……**38

TABLOLAR

Tablo 1. Sistemik tedavi grupları**……**20

Tablo 2. Lokal tedavi grupları**……..**21

ÖZGEÇMİŞ

1996 yılında Konya'nın Ilgın ilçesinde doğdum. İlköğretim ve ortaöğretimimi Konya Ilgın Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Liseyi Akşehir Hacı Sıddıka Baysal Fen Lisesi'nde tamamladım. 2014 yılında Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne başladım, 2019 yılında eczacılık fakültesinden ikincilikle mezun oldum. 2020 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Farmakoloji alanında yüksek lisansa başladım.

Çalışma hayatıma 2019 yılında Edirne'de Balkan Eczanesi'nde ikinci eczacı olarak başladım ve bir yıl sonunda Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde çalışmaya başladım. Halen üniversite hastanesinde çalışmaktayım.

Yayınlar

Gülşah Gedik, Nermin Özlen, Mustafa Ergin, Eczane Stajı Verimliliğinin Araştırılması, İVEK 2017 (Nisan 2017)

Gülşah Gedik, Kübra Kesmez, Büşra Koç, Yankı Nida Ziya, Nermin Özlen, Mustafa Ergin, Önder Sarp, Edirne İli Serbest Eczanelerinde Majistral İlaç Araştırması, İVEK 2017 (Nisan 2017)

EKLER

EK-1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2021/05 **Karar Tarihi**: 28.05.2021
Karar No: 2021.05.02
Hayvan Sayısı ve Cinsi: Fare 85 adet

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'ün yaptığı, TÜHADYEK-2021/15 protokol no'lu, yüksek lisans öğrencisi Nermin ÖZLEN'in yüksek lisans tezi olarak planlanan "**Deneysel Alerjik Kontakt Dermatit Fare Modelinde Hidrojen Sülfür Donörü Sodyum Sülfürün Antipruritik ve Antiinflamatuvar Etkileri**'' başlıklı çalışma isteği görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Necdet SÜT
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Filiz SANAL
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Vet. Hek. Kenan SELVİ
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Tarık AYKIZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır