

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PSÖRİASİS, KUTANÖZ LUPUS ERİTEMATOZUS VE LİKEN
SKLEROZ HİSTOPATOLOJİLERİNDE KANNABİNOİD 1
RESEPTÖRÜ (CB1) VE
N-ARACHİDONOYLETHANOLAMİNE (AEA)'NİN YAPIM VE
YIKIM ENZİMLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Serkan TÜRELİ

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

**ANKARA
2023**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PSÖRİASİS, KUTANÖZ LUPUS ERİTEMATOZUS VE LİKEN
SKLEROZ HİSTOPATOLOJİLERİNDE KANNABİNOİD 1
RESEPTÖRÜ (CB1) VE
N-ARACHİDONOYLETHANOLAMİNE (AEA)'NİN YAPIM VE
YIKIM ENZİMLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Serkan TÜRELİ

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Pergin ATİLLA**

**ANKARA
2023**

TEŞEKKÜR

Tez çalışması ve uzmanlık eğitimim sürecinde bana yol gösteren, bilgisini ve yardımlarını asla esirgemeyen ve değerli olduğumu daima hissettiren çok kıymetli tez danışmanım Prof. Dr. Pergin Atilla'ya,

Tez projesi kapsamında kendi deneyimlerini ve yardımlarını benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Elif Karakoç, Dr. Öğr. Üyesi Özay Gököz, Prof.Dr. Alp Usubütün ve Dr. Öğr. Üyesi Sevilay Karahan'a, Prof. Dr. Gonca Elçin'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca beni destekleyen Hacettepe Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Bu süreçte desteklerini asla esirgemedi her daim yardım eden, sanki kendi çalışmalarımı gibi özverili bir şekilde uğraşan, ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan Dr. Merve Ayan ve Dr. İlker L. Erdem'e,

Tıp fakültesinde tanıştığım, o zamandan beri yanımda olan ve sonraki zamanlarda da yanımda olacağına emin olduğum Dr. Kübra Korkmaz'a,

Hacettepe Üniversitesindeki eğitimim boyunca yanımda olan, destek olan ve yol gösteren, başta kıdemlilerim Dr. Sefa Burak Çam, Dr. Deniz Ekin Erbaş, Dr. Kübra Simay Aydın Akkurt ve Dr. Bengisu Kaya olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Eğitimim ve tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen Emrah Tosun, Hava Duygu, Hüseyin Konukcu ve Meltem Avcı'ya,

Çalışmamıza Hızlı Destek Araştırma Projesi (THD-2022-19666) çerçevesinde finansal destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Burada adını yazamadığım, bu süreçte yanımda olan ve iyi dileklerini esirgemeyen herkese,

Bugünlere kadar beni yetiştiren, benim mutluluklarımla mutlu olan, üzüntülerimle üzülen, üniversite ve uzmanlık eğitimi sürecinde her sınavda benimle birlikte sınav stresini yaşayan, desteklerini her daim arkamda hissettiğim annem Serpil Türel ve babam Erol Türel'e, beraber büyüdüğüm, okuduğum, eğlendiğim, stres yaşadığım, saçmaladığım ablam Dr. Dilruba Türel'e, bir senedir hayatımda olan ve ne kadar kötü olsam da beni yataktan çıkarmayı başaran sevgi arsız Eevee'ye

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Serkan Türel, Psöriasis, Kutanöz Lupus Eritematozus ve Liken Skleroz Histopatolojilerinde Kannabinoid 1 Reseptörü (CB1) ve N-Arachidonoylethanolamine (AEA)'nın Yapım ve Yıkım Enzimlerinin Varlığının Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2023. Enzimleri, ligandları ve reseptörleri ile birçok görevi olan endokannabinoid sistemine ait ilk keşfedilen reseptör CB1r, en çok çalışılan ligand ise N- arakidonoiletanolamin (AEA)'dir. N-açil-fosfatidiletanolamin-hidrolize fosfolipaz D (PLD) AEA'nın yapımında, yağ asidi amid hidrolaz (FAAH) ise yıkımında görev alan enzimlerden birisidir. Endokannabinoid sistemi deride inflamatuvar süreçleri yönetir; epidermiste keratinosit farklanmasını, apoptozunu, proliferasyonunu düzenler. Bu görevlerinden dolayı hiperkeratoz ile giden inflamatuvar deri hastalıklarında potansiyel bir hedef olduğu düşünülerek çalışmamızda; psöriasis, kutanöz lupus eritematozus (KLE) ve liken sklerozda (LS) endokannabinoid sisteminin etkisinin araştırılması ve endokannabinoid sistemi reseptörü CB1 ve ligandı AEA'nın yapım ve yıkım enzimleri olan fosfolipaz D ve FAAH'ın sağlıklı deri ile karşılaştırılması amaçlandı. Prospektif, basit randomize, kontrol grubu içeren gözlemsel bir çalışma gerçekleştirildi. CB1r, FAAH ve PLD reaktiviteleri ve epidermisteki lokalizasyonları immünohistokimyasal olarak incelenerek kontrol grubu ile karşılaştırıldı. İnflamasyon belirteci olarak TNF- α düzeyleri ELISA ile ölçüldü. Hastalık gruplarındaki CB1r, FAAH ve PLD dağılımının ve immün reaktivitesinin kontrol grubuna göre farklılık gösterdiği saptandı. Bu çalışma ile psöriasisin tipik bulgusu olan rete kenarlarının uzamasında CB1r'nin kaybının etkisi olduğu ve KLE ile LS patofizyolojilerinde endokannabinoid sistemi bozukluğu olduğu ilk defa gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Endokannabinoid Sistemi, Psöriasis, Kutanöz Lupus Eritematozus, Liken Skleroz, Hiperkeratoz

Destekleyen Kurum: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Hızlı Destek Araştırma Projesi (THD-2022-19666)

ABSTRACT

Tureli S, Investigation of the Presence of Cannabinoid 1 Receptor (CB1) and Synthesis and Degradation Enzymes of N-Arachidonoyl ethanolamine (AEA) in Histopathologies of Psoriasis, Cutaneous Lupus Erythematosus and Lichen Sclerosis, Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology Residency Thesis, Ankara, 2023. The endocannabinoid system, has many functions with its enzymes, ligands and receptors. It's first discovered receptor is CB1r and the most researched ligand is N-arachidonoyl ethanolamine (AEA). One of the enzymes involved in the synthesis of AEA is N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzed phospholipase D (PLD), and fatty acid amide hydrolase (FAAH) is one of the enzymes involved in its degradation. The endocannabinoid system regulates the inflammatory processes in the skin and the differentiation, apoptosis and proliferation of keratinocytes in the epidermis. Because of these functions this system is a potential target in inflammatory skin diseases with hyperkeratosis. So we aimed to investigate the effect of the endocannabinoid system in psoriasis, cutaneous lupus erythematosus (CLE) and lichen sclerosis (LS) and compare the synthesis and degradation enzymes of AEA, phospholipase D and FAAH, and CB1r with healthy skin. A prospective, simple randomized, observational study with control group was made. CB1r, FAAH and PLD reactivity and localization in the epidermis were analyzed immunohistochemically and compared with the control group. TNF- α levels as an inflammation marker were measured by ELISA. Immunoreactivity and distribution of CB1r, FAAH ve PLD were different in disease and control groups. In this study, for the first time it is shown that that the loss of CB1r has an effect on the elongation of the rete ridges, which is a typical finding of psoriasis, and in the pathophysiology of CLE and LS, endocannabinoid system defect is present.

Key words: Endocannabinoid System, Psoriasis, Cutaneous Lupus Erythematosus, Lichen Sclerosis, Hyperkeratosis

Financial Support: Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit, Research Fund (THD-2022-19666)

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Deri Histolojisi	4
2.1.1. Derinin Tabakaları	5
2.1.2 Epidermal Deri Ekleri.....	12
2.2 Deri Embriyolojisi	14
2.2.1. Epidermis	14
2.2.2. Dermis.....	15
2.3 Endokannabinoid Sistemi	16
2.3.1. Endokannabinoid Sistemi	16
2.3.2. Deri Endokannabinoid Sistemi	18
2.3.3. Anandamide	20
2.3.4. Anandamide'in Yapım ve Yıkımı.....	22
2.4 Hastalıklar	24
2.4.1 Psöriasis	24
2.4.2 Liken Skleroz.....	25
2.4.3 Kutanöz Lupus Eritematozus.....	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Dokuların Elde Edilmesi:	30
3.2. Gerekli Solüsyonların Hazırlanması.....	31
3.3. Dokuların Hazırlanması:	32
3.4. Dokularda immün histokimya Uygulaması.....	33
3.5. Imagej Görüntü Analiz Programı ile immün reaktivitenin Olduğu Alan Oranının Bulunması	34
3.6. İmmün reaktivitenin Değerlendirilmesi	37

3.7. TNF- α Miktarının Ölçülmesi	37
3.7.1 Formalin ile Fikse Edilip Parafine Gömülmüş Dokulardan Homojenat Hazırlanması	37
3.7.2 ELİSA	38
3.7.3 Dokudaki TNF- α Konsantrasyonunun Hesaplanması	38
3.8. İstatistiksel Değerlendirme	41
4. BULGULAR.....	42
4.1 Demografik Bulgular	42
4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular	42
4.2.1 CB1 Reseptör immün histokimyası	42
4.2.2 FAAH Enzimi immün histokimyası	53
4.2.3 PLD Enzimi immün histokimyası.....	61
4.3. TNF- α Konsantrasyonu	69
4.4 Örneklerde Hiperkeratoz Değerlendirilmesi	69
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	77
7. KAYNAKLAR	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

2-AG	: 2- arakidonoilgliserol
AA	: Araşidonik asit
AEA	: N- arakidonoiletanolamin, Anandamide
CB	: Kannabinoid reseptörü
CB1	: Kannabinoid 1 reseptörü
CB2	: Kannabinoid 2 reseptörü
DC	: Dendritik hücre
DOPA	: 3,4- dihidroksifenilalanin
eCB	: Endokannabinoidler
ECS	: Endokannabinoid sistemi
FAAH-1	: Yağ asidi amid hidrolaz 1
GPCR	: G proteini kenetli reseptör
HaCaT	: İnsan keratinosit hücre hattı
HLA	: İnsan lökosit antijeni
hNAPE-PLD	: İnsan N-asil-fosfatidiletanolamin-hidrolize fosfolipaz D
KAP	: Keratin associated protein
KLE	: Kutanöz Lupus Eritematozus
LEKTI	: Lenfoepitelyal Kazal-tipi inhibitör
LS	: Liken Skleroz
MITF	: Mikroftalmi transkripsiyon faktörü
MSH	: Melanosit uyarıcı hormon
NAPE	: N-açil fosfatidiletanolamin
NArPE	: N-arakadonoil fosfatidiletanolamin
NETs	: Nötrofil ekstraselüler tuzaklar
PIK3	: Fosfoinositid-3 Kinaz
PMD	: Post-mitotik farklılık
PPAR	: Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptörler
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
Treg	: Regülatuvar T lenfosit
TRP	: Potansiyel katyon kanalları ailesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Çalışma hipotezi.....	2
Şekil 2.1. Epidermisin tabakaları.....	5
Şekil 2.2. Endocannabinoid sistemi şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.3. Deride bulunan endokannabinoid reseptörleri ve etkileri.....	19
Şekil 2.4. Anandamide yapım yolları.....	22
Şekil 2.5. Anandamide yıkım yolları.....	23
Şekil 2.6. Psöriasisin immün patogenezi.....	24
Şekil 2.7. Işık mikroskopisinde Liken Skleroz bulguları.....	26
Şekil 2.8. Kutanöz lupus Eritematozus'ın immünopatogenezi.....	27
Şekil 3.1. Çalışmanın gereç ve yöntemleri şeması.....	29
Şekil 3.2. ImageJ görünümü.....	35
Şekil 3.3. Fotoğrafın renklere ayrılması ve kahverengi resmin seçimi.....	35
Şekil 3.4. Fotoğrafın dış bölgesinin silinmesi.....	36
Şekil 3.5. Threshold kullanımı.....	36
Şekil 3.6. İmmünohistokimyasal işaretleme şiddeti skorlaması.....	37
Şekil 4.1. Kontrol grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer CB1r immün reaktivitesi.....	43
Şekil 4.2. Kontrol grubu CB1r immün reaktivitesi.....	43
Şekil 4.3. Psöriasis grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer CB1r immün reaktivitesi.....	45
Şekil 4.4. Psöriasis grubu CB1r immün reaktivitesi.....	46
Şekil 4.5. Psöriasis grubu CB1r immün reaktivitesi.....	47
Şekil 4.6. KLE grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer CB1r immün reaktivitesi.....	48
Şekil 4.7. KLE grubu CB1r immün reaktivitesi.....	49
Şekil 4.8. KLE grubu CB1r immün reaktivitesi.....	49
Şekil 4.9. LS grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer CB1r immün reaktivitesi.....	50
Şekil 4.10. LS grubu CB1r immün reaktivitesi.....	51
Şekil 4.11. Epidermiste CB1r immün reaktivite gösteren alan yüzdeleri.....	51
Şekil 4.12. Epidermiste CB1r immün reaktivite şiddeti grafiği.....	52
Şekil 4.13. Kontrol grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer FAAH immün reaktivitesi.....	53
Şekil 4.14. Kontrol grubu FAAH immün reaktivitesi.....	54
Şekil 4.15. Psöriasis grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer FAAH immün reaktivitesi.....	55
Şekil 4.16. Psöriasis grubu FAAH immün reaktivitesi.....	55
Şekil 4.17. KLE grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer FAAH immün reaktivitesi.....	56
Şekil 4.18. KLE grubu FAAH immün reaktivitesi.....	57
Şekil 4.19. KLE grubu FAAH immün reaktivitesi.....	57
Şekil 4.20. LS grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer FAAH immün reaktivitesi.....	58

Şekil 4.21. LS grubu FAAH immün reaktivitesi.	59
Şekil 4.22. Epidermiste FAAH enzimi immün reaktivite gösteren alan yüzdeleri.	60
Şekil 4.23. Epidermiste FAAH enzimi immün reaktivite şiddeti grafiği.	60
Şekil 4.24. Kontrol grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer PLD immün reaktivitesi.	61
Şekil 4.25. Kontrol grubu PLD immün reaktivitesi.	62
Şekil 4.26. Psöriasis grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer PLD immün reaktivitesi.	63
Şekil 4.27. Psöriasis grubu PLD immün reaktivitesi.	63
Şekil 4.28. KLE grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer PLD immün reaktivitesi.	64
Şekil 4.29. KLE grubu PLD immün reaktivitesi.	65
Şekil 4.30. KLE grubu PLD immün reaktivitesi.	65
Şekil 4.31. LS grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer PLD immün reaktivitesi.	66
Şekil 4.32. LS grubu PLD immün reaktivitesi.	67
Şekil 4.33. Epidermiste PLD enzimi immün reaktivite gösteren alan yüzdeleri.	67
Şekil 4.34. Epidermiste PLD immün reaktivite şiddeti grafiği.	68
Şekil 4.35. Örneklerin TNF- α konsantrasyonları.	69
Şekil 6.1. Tez çalışması kapsamında sorulan araştırma sorularının yanıtları ve ulaşılan sonuçlar.	77

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Endokannabinoid sistemi şematik gösterimi	18
Tablo 2.2. Liken Sklerozda histolojik olarak görünen patolojiler.	26
Tablo 3.1. Kullanılan primer antikörler.	33

1. GİRİŞ

Endokannabinoid sistemi vücudun neredeyse tamamında kendisine ait reseptörleri bulunan ve birçok görevi olan bir sistemdir. Bu görevleri kendisine ait reseptörler, ligandlar ve bu ligandları üreten ve yıkan enzimleri ile yapmaktadır (1). Endokannabinoid sisteminin derideki görevleri ise keratinositlerin farklanması, apoptozu ve bölünmesi, derideki inflamatuvar süreçlerin yönetilmesidir (2-4). Bu görevleri derideki kan damarları, immün sistem hücreleri, sinir sonlanmaları ve keratinositlerde ortak olan bulunan **Kannabinoid 1/2 (CB1/2) reseptörleri** ile yapmaktadır (2). Bu sistemin en çok çalışılmış ve yukarıda bahsedilen görevlerde en fazla yer alan ligandları ise **N- arakidonoiletanolamin (AEA)** ve 2- arakidonoilgliserol (2-AG)dur (3). AEA'nın yapım enzimlerinden birisi **N-asil-fosfatidiletanolamin-hidrolize fosfolipaz D (PLD)** yıkım enzimlerinden en önemlisi ise **Yağ asidi amid hidrolaz (FAAH)**'dir (5). Epidermisteki etkileri apoptozu arttırmak ve proliferasyonu azaltmaktır. AEA'nın ise keratinosit farklanmasında asıl ligand olduğu bilinmektedir (6). İnflamatuvar etkileri, hücre bölünmesi ve hücre farklanmasını düzenlediği için endokannabinoid sistemi inflamatuvar deri hastalıkları için potansiyel bir hedeftir.

Psöriasis oldukça sık görülen patogenezi klinik olarak hiperkeratotik plaklarla ortaya çıkan inflamatuvar kronik bir deri hastalığıdır (7). İnflamatuvar infiltrasyonlar, epidermal hiperplazi, düzenlenimi bozulmuş keratinosit farklanması ve damarlanma artışı ile karakterizedir (3). Bunun yanında, sebep olan moleküler mekanizmaların tamamı ve patogenezi hala belli değildir (8). Endokannabinoid sistemine ait CB1 reseptörünün deride azaldığı (9) ve topikal olarak uygulanan kannabinoidlerin semptomları azalttığı (10) gösterilmiş olmasına karşın CB1 reseptör ligandlarının yapım ve yıkım enzimlerine ait çalışma bulunmamaktadır. Kullanılan tedaviler ise semptomlar baskılanabilse de ilaç kullanımı bırakıldıktan sonra semptomlar geri dönmektedir. Bilinen kesin bir tedavisi ise yoktur (8).

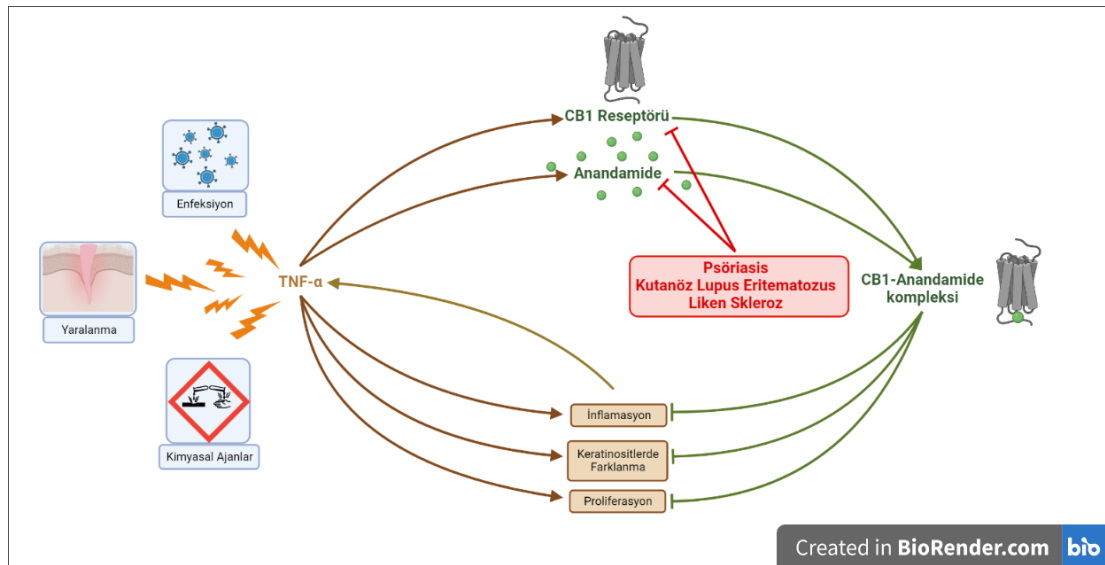
Kutanöz lupus eritematozus (KLE) dermal ödem, hiperkeratoz ve inflamatuvar infiltratlarla kendisini gösteren bir hastalıktır. Etiyolojisi ve bu semptomlara sebep olan moleküler mekanizmaları halen bilinmemektedir (11). Kullanılan ilaçların çok azının etkinliği randomize kontrollü çalışmalardan gelen kanıtlarla desteklenmektedir (12). Alternatif tedaviler hala aranmaktadır (11).

Liken skleroz (LS) inflamatuvar, hiperkeratoz gösteren kronik bir hastalıktır (13). Nedeni tam olarak bilinmeyen, etyolojisinde genetik, çevresel, hormonal ve otoimmün faktörlerin rol oynadığı kabul edilen bir hastalıktır (14). Hastalık şu anda tedavi edilebilir değil, kontrol edilebilir bir hastalıktır (14, 15).

Çalışmamızda yukarıda anlatılan hiperkeratinizasyon ile klinik veren otoinflamatuvar hastalıklar olan psöriasis, kutanöz lupus eritematozus ve liken skleroz'un endokannabinoid sistemine ait olan CB1 reseptör miktarları ile bir endocannabinoid olan N- arakidonoiletanolamin'in yapım ve yıkım enzimleri PLD ve FAAH sağlıklı deri ile karşılaştırıldı. Normal deriyle olan farklılıkları gösterilerek etiyolojisi bilinmeyen ve kesin tedavisi olmayan bu üç hastalıkta yeni tedavi seçeneklerine yol açılacak zemin hazırlandı.

Çalışmanın hipotezi;

“Hiperkeratozla ilerleyen, otoinflamatuvar hastalıklardan psöriasis, kutanöz lupus eritematozus ve liken sklerozda epidermiste kannabinoid 1 (CB1) reseptörü ve ligandı N- arakidonoiletanolamin (AEA)'nın yapım enzimi fosfolipaz D azalmış, yıkım enzimi olan FAAH artmıştır.”



Şekil 1.1. Çalışma hipotezi. (Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.)

Bu projenin amacı; psöriasis, kutanöz lupus eritematozus ve liken sklerozda endokannabinoid sisteminin etkisini araştırmak ve endokannabinoid sistemi reseptörü CB1 ve ligandı AEA'nın yapım ve yıkım enzimleri olan fosfolipaz D ve FAAH'ı sağlıklı deri ile karşılaştırmaktır.

Araştırmanın hedefleri;

Hiperkeratoz görülen otoinflamatuvar hastalıklara ait olan biyopsi dokularında;

- **CB1 reseptörlerinin** seviyesinin ve epidermiste hangi tabakalarda bulunduğu belirlenmesi ve sağlıklı deri ile karşılaştırılması
- **Anandamide** miktarını indirekt olarak belirlemek için yapım enzimi **fosfolipaz D** ve yıkım enzimi **FAAH enzim** seviyelerinin ve epidermiste hangi tabakalarda bulunduğu belirlenmesi ve sağlıklı deri ile karşılaştırılması
- **TNF- α düzeyleri** ölçülerek inflamasyon düzeylerinin değerlendirilmesi ve sağlıklı deri ile karşılaştırılması

Bu hedeflere ulaşmak için gereç ve yöntem bölümünde detayları verilen iş paketleri düzenlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri Histolojisi

Deri, vücudu dıştan saran, vücuttaki en büyük organdır (16). Dışardan gelen hasarlara karşı koruyucu olmasının yanı sıra, enfeksiyonlara karşı, tümörlere karşı immün yanıtta, otoinflamatuvar olaylarda ve alerji gibi birçok inflamatuvar olayda görevlidir (17). Derinin tabakaları; epidermis, dermis ve subkutan yağ dokusu olan hipodermistir (18).

Epidermis: Keratinize çok katlı yassı epitelden oluşur. Devamlı çoğalır(19). Ektoderm kökenlidir (16). Dermis: Sıkı bağ dokusundan oluşur(19). Vücudun çoğunluğunda mezoderm kökenlidir (16). Derinin epidermis kısmından oluşan yapıları ise; kıl follikülleri, ter bezleri, yağ bezleri, tırnaklar ve meme bezleridir (16, 20).

Deri ve deriden köken alan yapılar birçok hücre tipini içerir. Bu hücrelerin farklılığı derinin bariyer, immünolojik bilgilendirme, homeostaz, duyuşsal algı, endokrin salgı, ekzokrin salgı (16, 18) gibi birçok görevi yerine getirmesini sağlamaktadır.

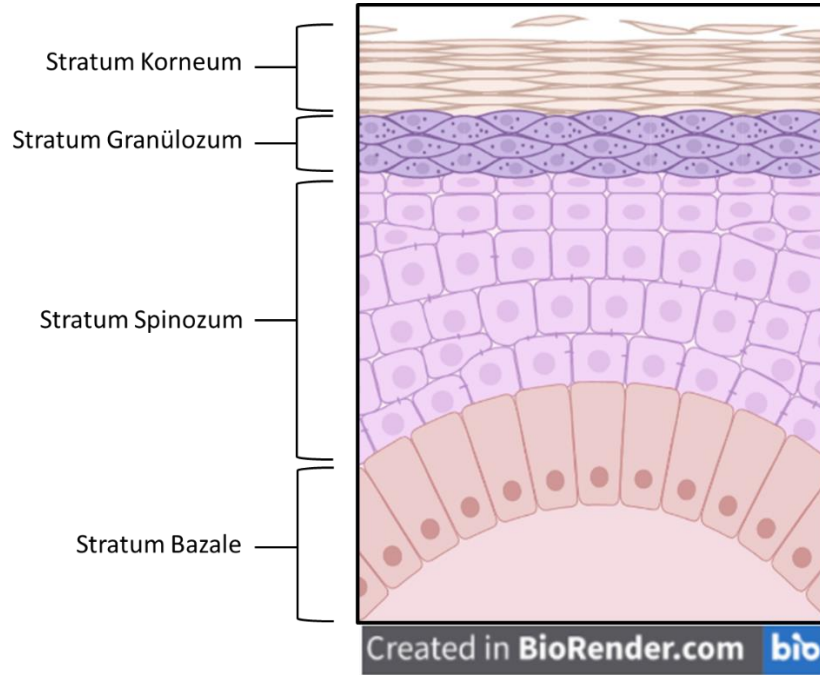
Deri, bulunduğu yere ve kalınlığına göre kalın deri ve ince deri olarak ikiye ayrılır (21). Kıl follikülü bulundurmayan deri *kalın deri*, diğerleri ise *ince deri* olarak isimlendirilir. Kalın deri avuç içi ve ayak tabanında bulunur (16).

2.1.1. Derinin Tabakaları

Epidermis

Epidermis, derinin en dış tabakasıdır (22). Beş tabakada incelenen, keratinize çok katlı yassı epitelden oluşur (21). En çok bulunan hücre olan keratinositler birbirlerine sıkıca bağlıdır, bu da bu tabakada bulunan hücrelerin hareket etmesini engellemektedir. Bu sebeple hem stromal hem kemik iliği kökenli hücreler genellikle belli bir pozisyonda sabittir (17). Derinin tabakaları en alttan yukarıya doğru aşağıdaki şekilde sıralanır (16).

- *Stratum bazale*;
- *Stratum spinozum*;
- *Stratum granülozum*;
- *Stratum lucidum*;
- *Stratum korneum*;



Şekil 2.1. Epidermisin tabakaları. (Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.)

Stratum bazale; mitotik aktif hücrelerden oluşur. *Stratum germinativum* olarak da isimlendirilir. Stratum bazaleyi oluşturan hücreler, bazal laminaya temas eden, en

alttaki hücrelerdir. Keratinositleri oluşturan kök hücreleri içerir (22). Kübik veya alçak prizmatik hücrelerden oluşur. Üstündeki hücelere göre daha büyük çekirdekleri vardır, sitoplazmaları daha azdır (21).

Stratum spinosum; mikroskobik olarak hücrelerden ince çıkıntıların görüldüğü hücrelerden oluşur, beş - altı hücre tabakası kalınlığındadır (22). Bu tabakadaki keratinositler bazal tabakadan daha büyüktür (16). Bu bölgedeki hücreler birçok sitoplazmik uzantı içerir, tabaka ismini buradan alır. Bu uzantılar birbirlerine desmozomlar ile bağlıdır (21). Desmozomlar ışık mikroskobunda Bizzozero'nun nodları olarak isimlendirilen kalınlaşmalar olarak görülür. Bu tabakadaki hücreler şekillerinden kaynaklı "diken hücresi" olarak da isimlendirilir (16).

Stratum granulosum; çok sayıda granüller içeren hücrelerden oluşur. Hücreler keratohyalin granülleri içerir. Bir – beş hücre kalınlığındadır (21). İçerisindeki granüller korneum tabakasındaki keratin filamentlerini birbirine bağlayan filaggrin proteinini içerir (16). Diğer keratinositlere göre daha bazofilik boyanırlar (21).

Stratum lucidum; sadece kalın deride görülür (1). Işık mikroskobunda zayıf boyanır. Eozinofilik hücreler içerir. Nadiren hücre çekirdeği görülür (21).

Stratum korneum; büyük miktarda keratin filamentleri içeren hücre çekirdeğini kaybetmiş yassı keratinize hücrelerden oluşur (16). Çekirdeğin yanında organellerini de kaybederler (21). Bu tabakanın derinlerdeki kısmı hücre dışında lipidlerin birikmesi ile epidermin su bariyerini oluşturur (16).

Epitel hücrelerinin tabakalar arası farklanması özelleşmiş bir tür apoptozdur. Epidermis hücrelerinin terminal farklanması bazal tabakadaki hücrelerin bölünmesi ile başlar. *Stratum granulosum*daki hücreler tipik apoptotik çekirdek morfolojisi gösterir. Ancak hücresel fragmentasyon gerçekleşmez, onun yerine hücrenin içi keratin filamentleri ile dolar (16).

Epidermisteki Hücreler

Keratinosit

Keratinositler epidermiste en çok bulunan hücredir (22). *Stratum bazale*deki hücrelerden köken alırlar. İki ana görevleri vardır: epidermin yapısal proteini olan keratini üretmek ve epidermal su bariyerinin yapısına katılmak (16). İnflamasyona

insan lökosit antijeni (HLA) II reseptörleri ve sitokin salgılamaları ile katılabilirler (17).

Bazal tabakada bulunan keratinositler birçok sayıda ribozom, keratin filamentleri, küçük golgi aparatı, mitokondriyonlar ve granüllü endoplazmik retikulum içerir (23). İçinde bulunan ribozomlardan kaynaklı sitoplazması bazofiliktir. Bu ribozomlar çoğunlukla keratin filamentlerini yapmakla görevlidir (16).

Epiteldeki keratinler ara filamanlardır, moleküler ağırlık ve isoelektrik noktalarına göre ikiye ayrılırlar; Asidik ve düşük molekül ağırlıklı tip 1 keratinler, ve nötral tip 2 keratinler. Tip 1 keratinler K10-K20 arasında, Tip 2 keratinler ise K1-K9 arasında tekrar ayrılır (5).

Stratum spinozumdaki keratinositlerde ise bu filamentler kalınlaşır ve ışık mikroskopunda görünebilir hale gelir. Bu filamentlere tonofibril ismi verilir (24). Hücre içi tonofibrillerle dolmaya başladığı için sitoplazma daha eozinofilik görülür (16).

Deskuamasyon yüzeydeki keratinositlerin proteolitik yıkım ile desmozomlarını kaybederek dökülmesine verilen isimdir. İnsan kallekrein-ilişkili serin peptidazlar (KLK5, KLK7, KLK14 vb.) desmozomların pH'a bağlı bir şekilde yıkılmasını sağlar. Lenfoepitelyal Kazal-tipi inhibitor (LEKTI), nötral pH'da insan kallekrein-ilişkili serin peptidazlar'lar ile ilişkiye girer ve desmozomların yıkılmasını engeller. Ancak yüzeye gidildikçe pH düşer, LEKTI, insan kallekrein-ilişkili serin peptidazları serbest bırakır ve desmozomların yıkımı başlar (16).

Epidermis dökülen keratinositlerin bazalden farklı hücrelerle sürekli olarak yenilediği bir dinamik denge içerisinde. Bu dengenin devamı için epidermisteki her hücrenin var olan görevi yapması için belirlenmiş bir süresi vardır. Yapılan çalışmalar keratinosit döngüsünün yaklaşık 31 gün olduğunu göstermektedir. Bunun sonrasında yaklaşık 14 günlük stratum korneumda bulunma süreleri vardır. Stratum korneumdaki bir sıra keratinositin tamamen dökülmesi yaklaşık 22 saat almaktadır (16).

Keratinizasyon

Keratinizasyon, keratinositlerde meydana gelen sitoplazmik olaylar sonucu keratinositin epiderminin tabakaları arasında ilerlemesi ve korneositlere farklılaşması ile sonuçlanan olaylar dizisidir (22). İki tip keratinosit popülasyonu bulunmaktadır:

progenitörler ve olgunlaşanlar. Olgunlaşan hücreler farklanma yoluna giderek biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere uğrarlar. Farklanma sonunda, sıkıca paketlenmiş proteinlerle dolu ölü hücreler oluşur (25). Bu farklanma, keratin polipeptitlerinin formasyonunu ve tonofilamentlere polimerize olmalarını içerir. Her tonofilamentin 20000-30000 keratin polipeptidini içerdiği tahmin edilmektedir (26).

Keratinosit farklanması stratum bazaledeki kök hücrelerin oluşturduğu yavru hücrelerden bazılarının kök hücre ve farklanmış hücre arası hücreler olan transit amplifying hücrelere farklanması ile başlar. Transit amplifying hücreler hücre bölünmesi görevini bırakarak farklanma yönünde ilerlerler ve post-mitotik farklanan (PMD) hücrelere dönüşürler. PMD hücreleri bazal membrandan ayrılır ve suprabazal tabakaya doğru ilerlerler ve farklanmaya devam ederler. Bu ilerleme sırasında kalsiyum gradientinin artması gibi faktörler ile farklanma desteklenir (27).

Keratohyalin granülleri ara filament ile ilişkili proteinler içerir ve keratin filamentlerinin oluşmasında görevlidir. Bu granüller stratum spinosumun üst kısımlarında üretilmeye başlanır ve stratum granulozumun karakteristik özelliğidir. Filaggrin ve trichohyalin adı verilen iki ana proteini içerir. Bu granüllerin varlığının gösterilmesi klinikte keratinositlerde apoptozun son aşamalarını göstermek için kullanılır. Bu granüllerin sayısının artması ile sitoplazmaya dağılırlar ve keratin filamentlerini tonofibrillere dönüştürürler. Bu işlem ile granüllü hücreler boynuzlaşmış hücrelere dönüşür. Bu süre içerisinde hücreler stratum granulozundan stratum korneuma geçer. Bu şekilde oluşan keratine yumuşak keratin adı verilir. Sert keratin saçta ve tırnakta bulunur (1).

Melanosit

Melanositler nöral krista kökenlidir ve stratum bazalede yerleşmektedir (22). Gelişim sırasında epidermal-melanin üniti oluştururlar. Bu ünit bir melanositin kendisine verilen miktarda keratinosit ile ilişki kurmasıdır. İnsanlarda bu sayı bir melanosite yaklaşık 36 keratinosit şeklindedir. Vücut bölgesine göre bu sayı değişkenlik gösterebilir (16). Melanositler HLA II eksprese edebilirler ve vitiligo hastalığında otoimmünite için bir hedeftirler (17).

Yetişkinlerde melanosite farklanma yeteneğine sahip olan kök hücreler kıl follüküllerindeki follüküler çıkıntıda bulunmaktadır (16). Bu farklanma Pax3 geninin ekspresyonu ile düzenlenmektedir (28). Pax3 aktivasyonu mikroftalmi transkripsiyon

faktörü (MITF)'ün eksprese edilmesini, bu da melanositlerin gelişimini ve farklanmasını sağlar (29). Melanositler insan yaşamı boyunca farklanma ve çoğalma yeteneğine sahiptir, ancak çoğalma hızı keratinositlere göre oldukça yavaştır (16).

Melanositler stratum spinosumdaki keratinositlere uzattığı uzantılar ve yuvarlak hücre gövdeleri nedeniyle dendritik hücreler olarak da isimlendirilir. Keratinositler ile arasında desmozomlar bulunmamaktadır. Ancak bazal lamina tarafında hemidesmozomu andıran yapıları vardır (16).

Melanositler melanin adı verilen pigmentin üretimi ve keratinositlere iletiminden sorumludur. Melaninin en önemli görevi organizmayı noniyonize edici ultraviyole radyasyondan korumaktır. Melanin tirozin ve 3,4- dihidroksifenilalanin (DOPA)'dan tirozinaz enzimi ile üretilir. Bu reaksiyon premelanozom adı verilen lizozom-ilişkili organellerde gerçekleşir. Bu sentez melanosit uyarıcı hormon (MSH) ile uyarılır. Bu hormon melanositlerdeki melanokortin-1 reseptörüne bağlanır ve G protein aracılığı ile sinyal iletilir (16). İnsanlarda iki farklı melanin bulunmaktadır; eumelanin, siyah veya koyu kahverengi, ve pheomelanin, sarı veya turuncu renktedir (22).

Langerhans Hücresi

Langerhans hücresi dendritik görünümde antijen sunan hücrelerdir (22). Ortak lenfoid progenitör hücreden köken alırlar. Kemik iliğinde farklanarak kan yolu ile deriye geldikten sonra epidermise yerleşip immünkompetan hücrelere farklanırlar. Mononükleer fagositik sistem üyesidirler, deriye dışardan giren antijenleri karşılarlar ve epiderminin immün devamlılığını sağlarlar. Langerhans hücresi antijen hücre zarına yerleştirdikten sonra lenf düğümüne göç eder ve T lenfositler ile iletişime geçer. Birçok çalışma Langerhans hücresinin epidermisteki diğer hücrelere oranının 1/53 olduğunu göstermektedir (16).

Langerhans hücreleri hematoksilin-eozin ile boyamada ayırt edilemezler. İmmünohistokimyasal olarak CD1a işaretlemesi ile stratum spinosumda yer aldıkları görülür. Langerhans hücreleri sitoplazmasında karakteristik tenis raketi görünümünde Birbeck granülleri bulunur (16). Keratinositlerle uzattığı dendritik uzantılarla bağlıdır ve bu uzantılar tüm epidermisi kontrol etmelerini sağlar (17).

Makrofajlar gibi Langerhans hücreleri de MHC I ve MHC II moleküllerini eksprese eder. Bunun yanında IgG için Fc reseptörleri bulunmaktadır. C3b kompleman

reseptörü de eksprese etmektedir (16). Görevleri kesin olarak bilinmese de immün toleransta görevli olduğu ve T lenfositlerinin uyarılmasında rol aldığı bilinmektedir (17).

Merkel Hücresi

Merkel hücresi stratum bazalede bulunan dendritik hücrelerdir. Nöral krista kökenlidir (28), hem epidermal hem nöral antijenler içermektedir. En çok parmak ucu gibi duyuşsal algıların fazla olduğu yerlerde bulunmaktadır. Keratinositlerle desmozomlar ile bağıdır. En karakteristik özellikleri 80 nm boyutunda yoğun merkezli nörosekretuar granüllerinin varlığıdır. Miyelinli sinir liflerinin terminal çıkıntıları ile ilişkilidir. Sinir lifi bazal laminaya yaklaşırken miyelinini kaybeder ve Merkel hücresinin tabanına doğru disk reseptör adı verilen plaka benzeri bir yapıya dönüşür. Bu iki yapıya birlikte Merkel korpüskülü ismi verilir (16) (22). Merkel hücresinin kutanöz immüniteye katkısı daha bulunmamıştır (17).

Dermis

Dermis tabakası epidermisi besler, destekler ve hipodermise bağlar. Destekleyici tip I, tip III kollagen fibriller ve elastik fibriller içeren fibroelastik bir bağ dokusudur (21). Epidermis ile dermis arasındaki bağlantı ışık mikroskopunda eşit olmayan bir sınır olarak görülür. Yüzeğe dik olan kesitlerde dermisin epidermisin içine doğru dermal papilla adı verilen parmaksı çıkıntılar yaptığı görülür. Bu papillalara epidermisten epidermal çıkıntı veya rete kenarları adı verilen çıkıntılar eşlik eder. Mekanik stresin daha fazla olduğu yerlerde bu epidermal çıkıntılar çok daha derinlere iner. Kalın deride dermal papillaya epidermal çıkıntılar da eşlik eder (16). Epidermal çıkıntılar birbirlerine paralel olma eğilimi gösterirler, dermal papillalar bu çıkıntılarının arasında seyrederek. Bu çıkıntılar kişiye özgü epidermal girinti ve çıkıntılarının (parmak izi vb.) oluşmasını sağlar (21).

Geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ile incelendiğinde bazaldeki epidermis hücrelerinin irregüler sitoplazmik çıkıntılar yaptığı görülmüştür. Bu çıkıntılar hücrenin ve altındaki bazal laminanın arasındaki yüzey alanını arttırmaktadır. Birçok hemidesmozom ve fokal adezyon bu hücreleri altındaki bazal laminaya bağlar (16).

Dermis üç farklı yerden köken alır. Yüz ve boyunda dermis nöral krista kökenlidir, ekstremiteler ve gövde duvarı dermisi lateral plak mezodermi kökenlidir

ve sırt bölgesi ise paraksiyel mezoderm kökenlidir (21). Dermis iki tabakada incelenir; papiller tabaka ve retiküler tabaka (16).

Papiller tabaka, yüzeye en yakın olan tabakadır, epidermisin hemen altındadır. Gevşek bağ dokusundan oluşur. Bu tabakada bulunan kollagen fibriller retiküler tabakadaki kadar kalın değildir. En çok tip I ve tip III kollagen içerir. Aynı şekilde elastik fibriller de retiküler tabakaya göre daha incedir ve düzensiz dağılmaktadır. Bazal laminayı delen veya burada sonlanan sinir sonlanmalarına sahiptir (16).

Retiküler tabaka, dermisin derinde olan tabakasıdır. Kalınlığı vücudun bölgelerine göre değişse de her zaman için papiller tabakadan daha kalındır. Kalın, düzensiz tip I kollagen fibriller ve yine kalın elastik fibriller ile karakterizedir. Bu fibriller rastgele değil, Langer'in çizgileri adı verilen çizgiler şeklinde yerleşmektedir. Bu çizgilere paralel kesiler daha az iz bırakarak iyileşir (16).

Areola, penis, skrotum ve perineumda retiküler dermisin derin kısmında düz kas hücreleri gevşek bir pleksus oluşturur. Retiküler tabakanın derinlerinde panniculus adipozus adı verilen bir yağ dokusu tabakası bulunmaktadır. Kalınlığı değişkendir. Bu tabaka ve bu tabaka ile bağlantılı bağ dokusu hipodermisi diğer adıyla subkutanöz fasyayı oluşturur (16).

Dermiste tek başına veya grup halinde kas hücreleri olan erektör pili kasları görülebilir. Bu kaslar kıl folliküllerini yüzeysel dermise bağlar ve kılların dikleşmesinde görevlidir (16).

İnce bir çizgili kas tabakası olan panniculus carnosus, subkutanöz fasyanın derinlerinde birçok hayvanda bulunur. Çoğu yerde işlevini yitirmiş olsa da, boyun ve yüzde mimik kaslarına katılırlar (16).

Dermisteki Hücreler

Fibroblast

Yapı proteinlerinin üretilmesinden sorumludur. Bu yapı proteinleri dermiste bir iskelet oluşturmanın yanında, aynı zamanda immün hücreler için bir yol olarak kullanılmaktadır. Fibroblastlar da keratinositler gibi sitokin salgılaya yeteneği bulundurmaktadır (17).

Endotel hücresi

Damarların en iç tabakasını oluşturur. Damar içerisindeki immün hücrelerinin geçişini sitokinler, geçirgenlik miktarı ve kemokinler ile düzenlerler (17).

Sinir Lifleri

Deride duyu algılamasında görevlidirler. Yapılan çalışmalarda bellek T hücrelerinin nöronlarda iletişime geçip immünitede görev alabildiği gösterilmiştir. Ancak bu görevler daha tam anlaşılamamıştır (17).

Makrofajlar

Deriden ayrılmayan hareket yeteneği olan ve fagositoz yapabilen hücrelerdir. Sitokin salgılaması ile inflamasyonu tetikleyebilirler ancak antijen sunarak bunu yapma ihtimalleri sayılarının azlığından kaynaklı düşüktür. Aynı zamanda ölü hücreleri ve atıkları fagosite ederek dermisi temizlerler (17).

Granülositler

Dermisteki hücrelerin kemoatraktanlar salgılayarak çağırması ile gelirler. Proteaz, vazoaktif peptit ve antimikrobiyal peptit içerirler. İmmünitede görevlidir ve inflamasyon ile dermise çağırılırlar (17).

T Lenfositler

Deride bulunan adaptif hücrelerin çoğu T lenfositler ve onların alt gruplarıdır. Deride bulunan T lenfosit sayısı kanda bulunanın yaklaşık 2 katıdır. CD8+ sitotoksik T hücreler HLA I ile sunulan antijeni tanır ve o hücreyi öldürür. CD4+ yardımcı T hücresi B lenfositler gibi hücrelere yardım eder, sitokinler ve maturasyon sinyalleri ile dendritik hücreleri uyarır ve inflamasyonda görev alır. Regülatuar T lenfosit (Treg) hücreleri immün cevabı baskılar ve otoimmüniteyi engeller (17).

2.1.2 Epidermal Deri Ekleri

Kıl Follikülü

Saç follikülü 4 bölge olarak incelenir; infundibulum, istmus, folliküler çıkıntı ve inferior segment (22)

Saç matriks hücreleri dermal papillaya en yakın kısımda bulunur, hızla çoğalma yeteneğine sahiptir. Folliküler çıkıntındaki kök hücrelerden köken alırlar. Kılın uzamasını sağlarlar. Matriks hücreleri kılın keratin üreten hücrelerine farklı olarak internal kıl kılıfını oluştururlar (16).

Kıl gövdesi 3 tabaka olarak incelenir; medulla, korteks ve kıl gövdesi kütikülü (16). Medulla, gevşek bir şekilde birbirine bağlanmış keratinize epitel hücrelerinden oluşur ve sadece kalın kıllarda bulunur (22). Korteks, saçın %80'lik hacmini oluşturur. İçerisindeki keratin filamentlerinin hepsi keratin associated protein (KAP) ile çevrelenmiştir (16).

Saçın dokusu, elastisitesi ve rengi korteks ile belirlenir. Kıl gövdesinin kütikülü saç gövdesinin en dış tabakasıdır. Birkaç tabaka, yarı saydam, keratinize yassı hücreler içerir. Saçı kimyasal ve fiziksel etkilerden koruyan tabakadır (16).

İnternal kıl kılıfının üç tabakası vardır, dıştan içe; *Henle'nin tabakası*, *Huxley'in tabakası* ve *İnternal kıl kılıfı* kütiküldür (16).

Camsı membran denilen kalın bir bazal lamina, saç follikülünü dermisten ayırır. İnternal kök kılıfı kütikülü, kılıfın iç kısmında bulunan yassı hücrelerdir. Huxley'in tabakası, ortada yer alır, bir veya iki katlı yassılaştırmış hücre içerir. Henle'nin tabakası ise tek katlı kübik hücreler içeren en dış tabakadır (16).

Yağ bezleri

Yağ bezleri kıl follikülünün dış kök kılıfından gelişir. Sebum adı verilen salgısı holokrin salgı ile oluşur. Sebum, kılı ve deri yüzeyini kaplar. Yağ bezlerinin bazal laminası epidermis ve kıl follikülü ile devamlıdır. Bazaldeki hücrelerin mitozu yaklaşık sekiz gün sürer (16).

Ter Bezleri

Deride ekrin ter bezleri ve apokrin ter bezleri olmak üzere iki çeşit ter bezi bulunur. Ekrin ter bezleri, dudaklar ve dış genital organlar dışında tüm vücutta bulunmaktadır. Apokrin ter bezleri, aksilla, areola, anüs etrafındaki deri ve dış genital bölge ile sınırlıdır (16).

Ekrin Ter Bezleri

Basit tübüler bezlerdir ve vücudun ısı regülasyonunda görevlidir. Fetal epidermisen dermise doğru büyümesi ile gelişir. Salgı yapan segment ve kanal

segmentinden oluşur. Salgının vücut yüzeyinden buharlaşması ile soğumayı sağlar. Bu salgı başta ultrafiltrata benzemektedir. Vücut yüzeyine salınmadan önce içindeki sodyum ve suyun emilmesi ile hipotonik bir çözelti haline gelir. Bu çözelti sodyum klorid, üre, ürik asit ve amonyak içeren proteinden zayıf bir çözeltilidir (16).

Apokrin Ter Bezleri

Geniş lümenli tübüler bezlerdir ve kıl follikülleri ile ilişki içindedir. Sekrete edilecek olan sıvı lümende depolanır ve oradan kıl follikülünün olduğu bölgeden salınır. Salgı türü merokrinidir. Salgısı protein, karbonhidrat, amonyak, lipid ve sekresyona renk verebilecek organik bileşiklere sahiptir. İlk salgılandığında kokusuzdur, ancak bakterilerin bunu işleme ile koku oluşur (16).

2.2 Deri Embriyolojisi

Deri, vücudu dıştan saran, vücuttaki en büyük organdır. İki tabakada incelenir; epidermis ve dermis. Epidermis, yüzeyel epitel dokusudur ve yüzey ektoderminden köken alır (30). Dermis ise epidermisin altında, düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşan ve mezenşimden köken alan bir dokudur. Epidermis ile dermisin etkileşimleri WNT, FGF, TGF- β , SHH gibi birçok sinyal molekülü ile birbirlerini indüklemeye mekanizmalarını içerir (31).

2.2.1. Epidermis

Epidermisin büyümesi aşama aşama gerçekleşir ve epidermal kalınlığı artırır. Epidermisin primordiumu tek katlı yüzey ektoderm hücreleridir (31). Epidermisin tabakalanması p63'ün aktivasyonu ve transkripsiyonu ile gerçekleşir. Ancak farklılaşmanın tamamlanması ve tabakalanmanın durması için miR-203 ile p63'ün kapatılması gerekmektedir (32, 33). İlk tabakalanma periderm adı verilen ikinci bir tabakanın oluşmasıdır. Periderm, tek katlı yassı hücrelerden oluşur ve gelişen epiteli tek bir tabaka halinde kaplar (32, 34). Periderm, ileride keratinizasyona uğrar ve deskuamasyon ile dökülür. Bu dökülen hücreler bazal tabakadaki hücrelerin bölünmesi ile yenilenir (31).

Epidermisin bazal tabakası bölünerek stratum spinosum oluşturur ve birlikte stratum germinativum adını alır (31, 33). Onbirinci haftada ara tabakalar oluşur. (31) Epidermisin farklılaşmasının göstergesi olan keratohyalin granülleri stratum spinosumdaki hücrelerin sitoplazmasında görülmeye başlar. Keratin içeriği yüksek

olduğu için epidermisdeki hücelere keratinosit adı verilir (33). Periderm hücrelerinin yenilenmesi 21.haftaya kadar sürer, ardından periderm kaybolur ve stratum korneum ve stratum lusidum oluşur (31). Bu hücrelerde terminal farklanmanın belirtileri olan daha yassı görünüm, çekirdek kromatininde yoğunlaşma ve çekirdek zarında bozulmalar görülür. İçerisindeki keratin miktarı daha da artmıştır. Epiderminin farklanmasında farklı keratin proteinleri, spesifik evrelere göre eksprese edilmektedir. Örneğin keratin K5, K14 ve K15 bazal tabakada üretilirken, stratum spinosumda K1 ve K10 üretilmektedir (32, 33).

Stratum germinativumun bölünmesi aynı zamanda epiderminin kıvrımlı bir yapı oluşturmasını sağlar. Bu kıvrımlar embriyo 10 haftalıkken görülmeye başlar, 19 haftalıkken ise tamamen oluşmuşlardır (31).

Daha sonra nöral krista hücreleri gelişmekte olan dermise göç eder ve melanoblastlara farklanır. Ardından bu hücreler dermoepidermal bileşkeye göç eder ve melanositlere farklanır. Bu farklanma WNT molekülleri ile kontrol edilir (31).

Birinci trimesterin sonlarında kemik iliğinden köken alan Langerhans hücreleri epidermise gelir. Bu hücreler immün sistemde görevli antijen sunucu hücrelerdir. T lenfositler ile birlikte deride hücre aracılı cevapta görev alır. İlk iki trimesterde sayıları az iken son trimesterde sayıları birkaç kat artar (33).

Merkel hücreleri el ve ayak bölgesindeki epidermiste görülür. İntraembriyonik dönemin 8 ila 12. haftaları arasında ortaya çıkar ve serbest sinir sonlanmaları ile ilişkilidir. Nöral krista kökenlidir (33).

2.2.2. Dermis

Dermis, yüzey ektoderminin altında bulunan mezodermden oluşan mezenşimden farklanır (31). Gövdede dorsal dermis somitlerdeki dermatomdan oluşur, ventral ve lateral dermis ve ekstremitelerdeki dermis ise lateral mezodermden gelişir. Baş ve boyun dermisi ise kranial nöral krista ektoderminden oluşur (33).

Ektodermin WNT sinyalizasyonu, β -katenin yolağını aktive ederek ektoderme en yakın hücrelerin Dermo1 adı verilen dermal işaretleyiciyi üretmesini sağlar ve o hücrelerin dermal hücelere farklanmasında görev alır (33, 35). Onbirinci haftada mezenşim hücreleri fibroblastlara farklanarak kollagen ve elastik fibrilleri üretmeye başlarlar (31, 33). Epiderminin kıvrımları derminin içerisine doğru uzadıkça bu kıvrımlar ile etkileşen dermal papillalar oluşur. Bu papillalarda kapiller damarlar

gelişir ve epidermisin beslenmesini sağlar. Aynı şekilde duyuşal sinir sonlanmaları da dermal papillalarda oluşur. Afferent sinir liflerinin gelişimi dermal kıvrımların gelişiminde uzaysal ve zamansal olarak önemli bir yere sahiptir (31).

Dermisteki kan damarlarının gelişimi mezenşim hücrelerinin endotele farklanması, yani vaskülogenez ile gerçekleşir. Deri büyürken bu damarlardan anjiogenez ile yeni damarlar oluşur. Kapiller benzeri damarlar dermiste embriyonik hayatın 5.haftasında görölmeye başlanır. İlk trimesterin sonunda fetal dermisin damarlarının çoğu oluşmuştur (31).

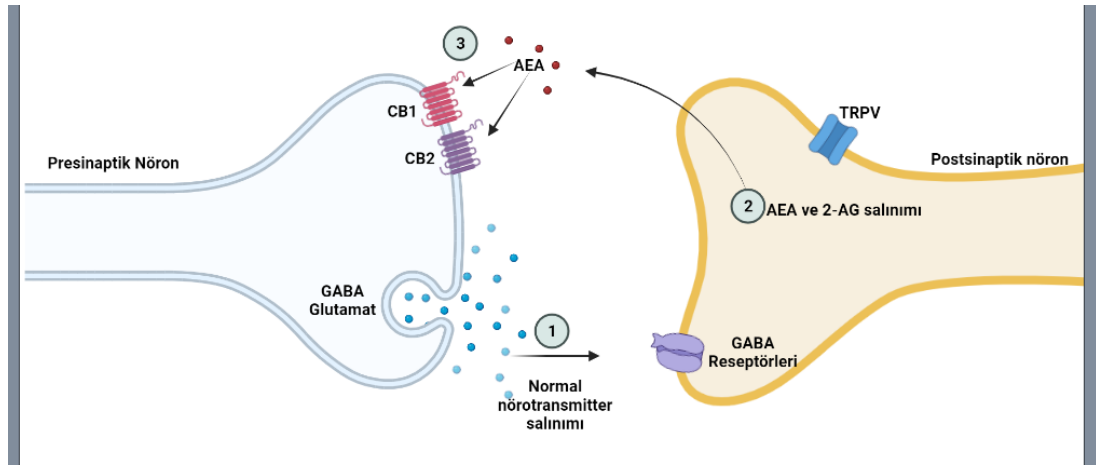
Ter bezleri, yağ bezleri ve meme bezleri ise epidermisin dermisin içersine büyümesi ile gelişir (30, 31).

2.3 Endokannabinoid Sistemi

2.3.1. Endokannabinoid Sistemi

Kannabinoidler, hücrelerdeki cannabinoid reseptörleri üzerinde etkili olan çeşitli kimyasal bileşikler kapsayan bir sınıftır. Bu reseptör proteinleri için ligandlar, endokannabinoidleri (vücutta doğal olarak üretilen), fitokannabinoidleri (kenevir ve bazı bitkilerde bulunan) ve sentetik cannabinoidleri içerir (1). Kannabinoidler ile ilgili çalışmalar 1988 yılında CB1 reseptörünün bulunması ile artmıştır (36). Bu araştırmalar sonucu organizma tarafında üretilen cannabinoidler olan endokannabinoidlerin, cannabinoid reseptörleri ile birlikte birçok psikolojik, metabolik ve immünolojik olaylarda görev aldığı gösterilmiştir. Çalışmalar öncelikle santral sinir sistemi ve immün sistem üzerinde yoğunlaşsa da periferel sistemlerdeki çalışmalar da artmış durumdadır (1).

Endokannabinoid sistemi (ECS) aynı zamanda ekzojen olarak Cannabis sativa bitkisi ile uyarılabilen cannabinoid reseptörleri, endokannabinoidler (organizma tarafından üretilen cannabinoidler) ve bu endokannabinoidleri sentezleyen ve yıkan enzimlerden meydana gelmektedir (2, 37). GABAerjik ve Glutamaterjik sinapslarda retrograd etkili olup inhibitör görevi vardır. Postsinaptik nörondan salınan endokannabinoid ligandları presinaptik nöron üzerindeki cannabinoid reseptörlerine bağlanıp parakrin etki gösterebileceği gibi, otokrin etki ile kendisini de inhibe edebilir (36).



Şekil 2.2. Endocannabinoid sistemi şematik gösterimi. (36) (Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.)

Endokannabinoid sisteminde etkili olan ligandlar üç ayrı grupta incelenebilir:

İlk grup olan **endokannabinoidler (eCB)** kendi içerisinde üç farklı grupta incelenir; klasik ligandlar, peptid ligandlar ve ECS ile ilgili ligandlar (38). Klasik ligandlar anandamide ve 2-AG'dir. Bu iki ligand ECS'de en çok çalışılmış olan ligandlardır (39). Peptid ligand pepcan, ECS ile ilgili ligandlar ise Palmitoylethanolamine ve Oleoylethanolamide'tir. (38)

İkinci ligand grubu ise bitkilerde bulunan **fitokannabinoidler**dir. Klasik olan fitokannabinoidler Cannabis sativa bitkisinde bulunan ve ECS'nin reseptörlerini uyarabilen THC, THCV, CBD, CBN, CBG, CBGV, CBC, CBDV'dir. Non-klasik fitokannabinoidler ise diğer bitkilerde de bulunabilen ve ECS'nin reseptörlerini uyarabilen ligandlardır. (38)

Son ligand grubu ise bu iki gruba girmeyen ancak **ECS'yi etkileyebilen diğer molekülleri** içermektedir. Bunlar N-arachidonoyl amino acids, Pregnenolon ve Lipoxin A4'tür. (38)

Endokannabinoidlerin kullandığı reseptörler **klasik reseptörler, iyonotropik reseptörler, nükleer reseptörler** ve **non-kannabinoid hedefler** olarak dört grupta incelenebilir. (38)

Klasik reseptörler; **kannabinoid reseptörü** olarak isimlendirilen iki reseptördür. Hücrelerin plazma membranlarının yanı sıra endoplazma retikulumunda, endozomlarda, lizozomlarda ve mitokondriyonlarda bulunmaktadır (40). G-protein

bağlı reseptörlerdir. **CB1 reseptörleri** çoğunlukla merkezi sinir sisteminde bulunurken, **CB2 reseptörleri** ise immün düzenleyici ve anti-inflamatuvar etkiler ile ilişkilidir (38).

İyonotropik reseptörler; **geçici reseptör potansiyel katyon kanalları ailesinden** (*transient receptor potential cation channel family*, **TRP**) oluşmaktadır. İçerisinde alt ailelerden TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1, TRPM8 bulunmaktadır (38).

Nükleer reseptörler; **peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptörler** (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)dir (40). PPAR α , PPAR γ , PPAR δ ECS’de görev alan peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptörlerdir (38).

Bunların yanında ECS’ye ait olmayan ancak **endokannabinoid sistemine ait ligandlar ile uyandırılabilen reseptörler** bulunmaktadır. Bunlar ise 5-HT_{1A}, GlyR, A_{2a}, α 2R, 5-HT₃, μ R, δ R, A₃’tür. (38).

Endokannabinoid sistemine ait olan enzimler ise ligandların yapım ve yıkım enzimleridir. Yapım enzimleri DAGL α , DAGL β , NAPE-PLD, PTPN22, yıkım enzimleri ise MAGL, FAAH, ABHD6, ABHD12, NAAA, COX2, LOX’dır (38).

Tablo 2.1. Endokannabinoid sistemi şematik gösterimi. (38)

Ligandlar	eCB ve bağlantılı moleküller			Diğer modülörler	Fitokannabinoidler	
	Klasik Ligandlar	Peptid Ligandlar	ECS-bağlantılı moleküller		Klasik	Non-klasik
	Anandamide, 2-arachidonoylglycerol	Peptans	Palmitoylethanolamine Oleoylethanolamide	N-arachidonoyl amino acids, Pregnenolon, Lipoxin A4	THC, THCV, CBD, CBN, CBG, CBGV, CBC, CBDV	β -carvophyllene, (-)-cis- PET
Reseptörler	Klasik CB1, CB2			İyonotropik TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1, TRPM8	Nükleer PPAR α , PPAR γ , PPAR δ	Non-kannabinoid hedefler 5-HT _{1A} , GlyR, A _{2a} , α 2R, 5-HT ₃ , μ R, δ R, A ₃
Enzimler	Sentez DAGL α , DAGL β , NAPE-PLD, PTPN22			Yıkım MAGL, FAAH, ABHD6, ABHD12, NAAA, COX2, LOX		

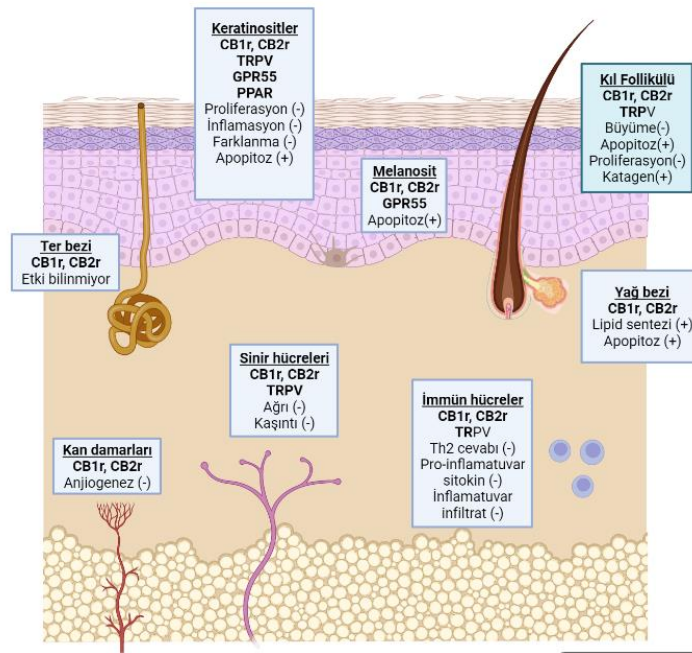
2.3.2. Deri Endokannabinoid Sistemi

Yapılan çalışmalar endokannabinoid sisteminin periferik dokularda da etkili olduğunu göstermiştir. Kannabinoid reseptörleri CB1 ve CB2 ile iki ana endokannabinoid olan AEA ve 2-AG’nin deri metabolizmasında etkili olduğu gösterilmiştir (3). Endokannabinoid sisteminin hücre büyümesi, farklanması, çoğalması ve apoptozda etkisi olduğu gösterilmiştir (2-4). Derideki anti-inflamatuvar etkisinin gösterilmiş olması, bu sistemin ileride inflamatuvar hastalıklar için bir hedef olabileceğini düşündürmektedir (2, 40).

Hem CB1 hem de CB2 reseptörleri sağlıklı insan derisinde çoğunlukla epidermisin suprabazal tabakalarında, kıl folliküllerinde ve bazal tabakanın sporadik

bölgelerinde gösterilmiştir (3). Bunun yanında yağ bezlerinde ve kıl folliküllerindeki keratinositlerde bulunmaktadır. CB1 reseptörü daha çok epidermiste stratum spinosum ve granülozunda, farklanmasını tamamlamış yağ bezlerinde bulunurken, CB2 reseptörü bazal keratinositlerde ve kıl folliküllerindeki farklanmamış hücrelerde daha fazla bulunmaktadır (3). Bu reseptörler aynı zamanda sinirlerde, makrofajlarda, epidermal keratinositlerde, kıl folliküllerinde, yağ bezlerinde, ter bezlerinde, melanositlerde, mast hücrelerinde ve fibroblastlarda bulunmaktadır (40). Bunun yanında keratinositlerin, melanositlerin ve fibroblastların AEA sentezlediği gösterilmiştir (3).

Deri büyük bir yoğunlukta sinir ve damar ağına sahiptir. CB1 ve CB2 reseptörleri, retiküler dermisteki büyük miyelinli sinirlerde, papiller dermisteki küçük miyelinsiz sinirlerde, epidermisteki sinirlerde ve damarların endotelinde gösterilmiştir. Aynı şekilde hipodermisteki matür adipositler ve pre-adipositlerde de bu reseptörler gösterilmiştir. (3).



Şekil 2.3. Deride bulunan endokannabinoid reseptörleri ve etkileri. (2, 6) “BioRender.com sitesinde hazırlanmıştır.”

İnflamatuvar deri hastalıkları immün hücrelerin anormal yanıtlarına ve immün sistem hücrelerinin birbirleri ile etkileşimine bağlıdır. Epidermal keratinositler, lenfositler ve dendritik hücreler derinin immün yanıtında anahtar rol oynamaktadır (2).

Bunun yanında derideki makrofajlarda ve mast hücrelerinde ve T ve B lenfositlerde de CB1 ve CB2 ekspresyonu gösterilmiştir. CB1 ve CB2 reseptörlerinin ikisinin de bulunmasına rağmen immün işlevlerin çoğunun CB2 ile ilgili olduğu gösterilmiştir. (3). Anti-inflamatuvar etkileri ve hücre bölünmesi ile farklanmasını düzenlediği için endokannabinoid sistemi inflamatuvar deri hastalıkları için potansiyel bir hedefdir (2). AEA'nın keratinosit farklanmasında CB1 reseptörü için asıl ligand olduğu gösterilmiştir (41). Keratinosit farklanması arttıkça hücre içinde AEA yıkım enzimi FAAH artar ve AEA'nin etkileri azalır (42). Endokannabinoid sisteminin atopik dermatit, skleroderma, egzema gibi hastalıklarda bozulduğu gösterilmiştir (3), (43).

Kannabinoidlerin aşırı kullanılmasının akneye yol açtığı gösterildikten sonra yapılan çalışmalar yağ bezi hücrelerinde bulunan CB1 ve CB2 reseptörlerinin yağ bezlerinin düzenli çalışmasını sağladığını göstermiştir. CB1 merkezdeki farklanmış hücrelerde, CB2 ise bazaldeki farklanmamış hücrelerde daha çok bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar endokannabinoidlerin CB2 - ERK1/2 MAPK - PPAR yoluyla ile lipogenez ile ilişkisini göstermiştir (9).

ECS'de TRPV1 ve PPARgama gibi reseptör sistemleri de görev almaktadır (36). TRPV1 reseptörü özellikle bazal keratinositlerde olmak üzere, tüm keratinositlerde eksprese edilmektedir. Buna ek olarak Langerhans hücreleri, damarların endoteli ve düz kas hücreleri, yağ bezleri ve ter bezlerinde de TRPV1 ekspresyonu gösterilmiştir. Dermal fibroblastlarda ve melanositlerde ise TRPV1 ekspresyonu bulunmamaktadır (3). Fizyolojik koşullarda TRP reseptörleri deri bariyerinin korunması, hücre büyümesi ve farklanması ile immünolojik ve inflamatuvar olaylarda görevlidir. Örneğin, TRPV1 aktivasyonu, keratinositlerdeki lipid sentezini inhibe eder, epitel bariyerini değiştirirken, antagonistler ise bariyerin iyileşmesini hızlandırır. TRPV4 ise bu konuda TRPV1'e göre ters şekilde görev alır ve hücre-hücre bağlantılarının maturasyonunu sağlar. TRPA1 ve TRPM8 ise epidermal geçirgenliği ve proliferasyonu artırır. TRPV3 ise transglutaminaz aktivitesini düzenleyerek kornifikasyonu düzenler. TRP reseptörleri bunların yanında ağrı hissi ve kaşınma ile de ilgilidir (3).

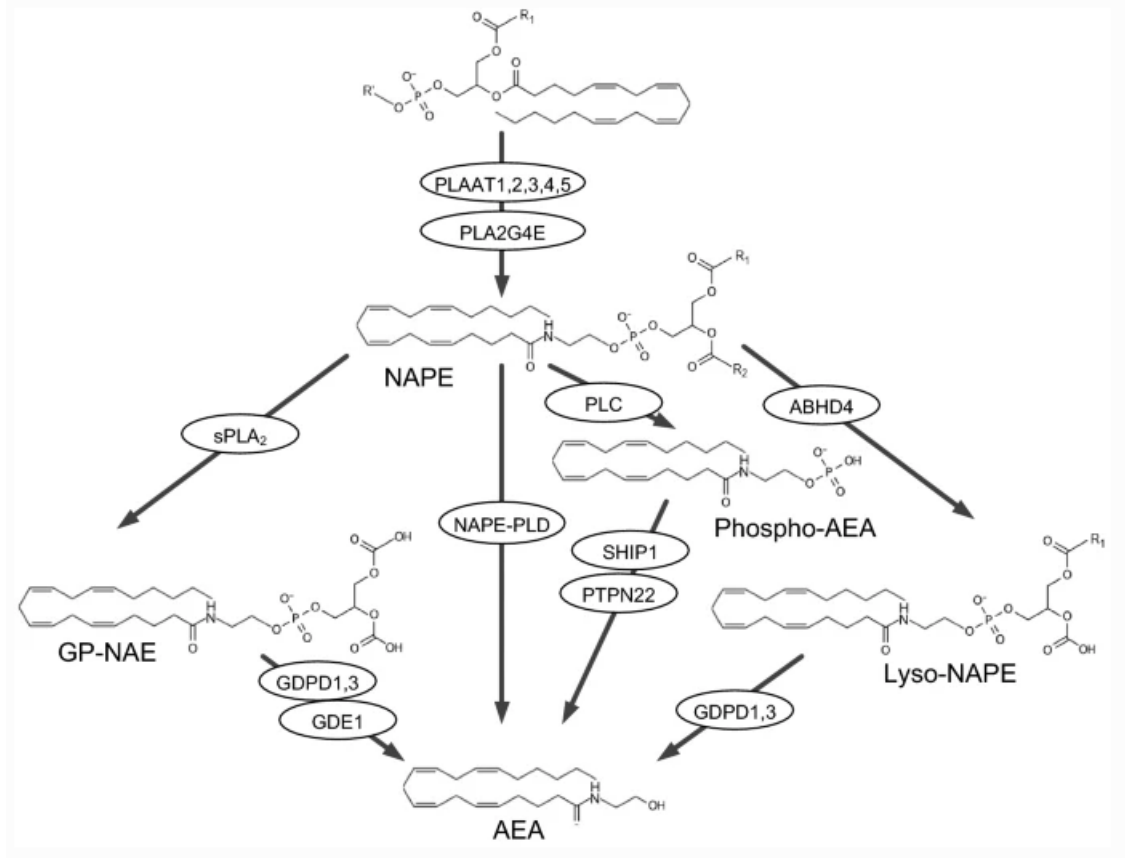
2.3.3. Anandamide

Anandamide yağ asidi yapısında bir nörotransmitterdir ve endokannabinoid sisteminin ilk keşfedilen nörotransmitteridir (44). Anandamide ismi, Sanskrit dilinde

mutluluk anlamına gelen “ananda” ile amid kelimesinin birleşmesinden gelmektedir. Keşfi ve isimlendirmesi 1992 yılında Raphael Mechoulam ve laboratuvar arkadaşları tarafından yapılmıştır (45). Esansiyel omage-6 yağ asidi araşidonik asitten birçok yolak aracılığı ile sentezlenir. FAAH enzimi ile yıkılır (46).

En çok çalışılan endokannabinoid ligandı olmasına rağmen, anandamide kannabinoid reseptörler için yalnızca parsiyel agonisttir. Full agonist rolü ise TRPV1 için tanımlanmaya başlanmıştır. Bunun yanında vanilloid reseptörlerde yavaş retrograd veya retrograd dışı sinyal görevi de full agonist olarak olabilir (40).

2.3.4. Anandamide'in Yapım ve Yıkımı



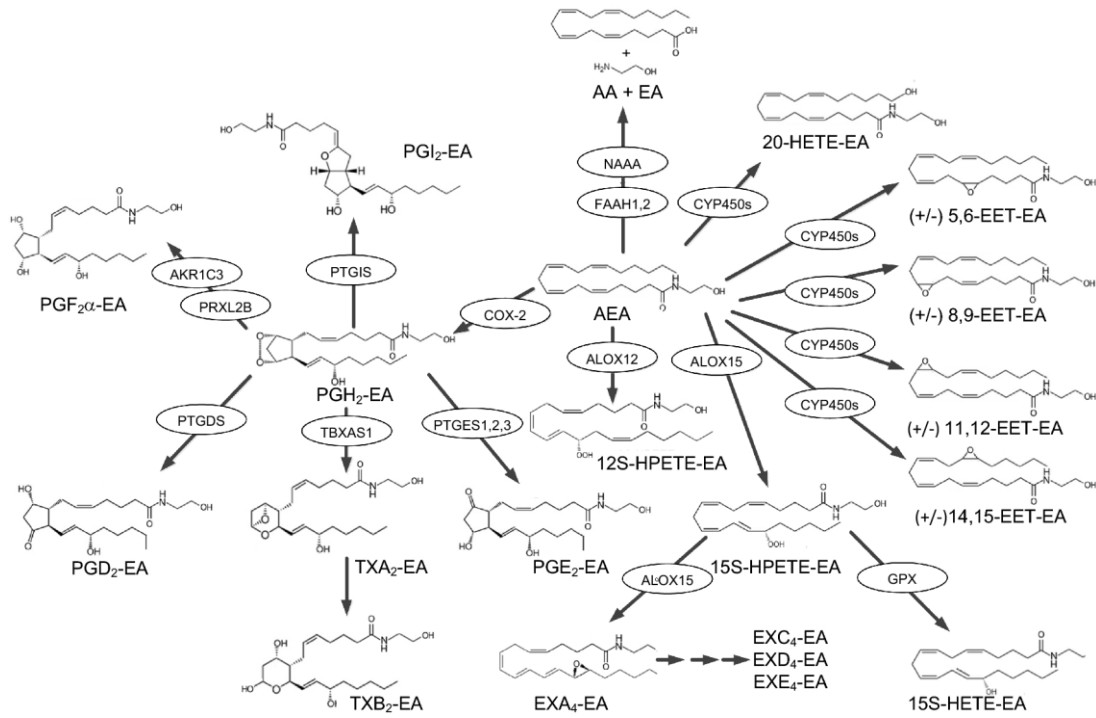
Şekil 2.4. Anandamide yapım yolları. (47)

AEA sentezi membran üzerinde bulunan araşidonik asit ve yine membranda bulunan fosfatidiletanolamin'in ligasyonu ile N-arakadonoil fosfatidiletanolamin (NArPE) oluşması ile başlar. AEA'nın bu molekülden salınması bir seri fosfolipaz üzerinden gerçekleşir(47).

NArPE dahil olmak üzere N-açıl fosfatidiletanolaminlerin (NAPE'lerin) sentezi gliserofosfolipidlerden yağ asidi grubunu fosfatidiletanolaminin primer aminine kalsiyum bağımlı veya bağımsız N-açıltransferaz'lar aracılığı ile taşınması ile gerçekleşir (47).

İnsan N-asıl-fosfatidiletanolamin-hidrolize fosfolipaz D (hNAPE-PLD) tek bir izoform olarak bulunur ve metallo- β -laktamaz ailesinin bir üyesidir (47). hNAPE-PLD, özellikle beyin, gastrointestinal sistem, böbrek ve mesanede yüksek ekspresyonu

olmakla birlikte çoğu dokuda eksprese edilen sitozolik, çinko bağımlı bir proteindir (48).



Şekil 2.5. Anandamide yıkım yolları. (47)

AEA konsantrasyonu üç ana yolak ile azaltılır; Araşidonik asit (AA) ve etanolamin'e yıkım, diğer moleküllere dönüşüm, ve intraselüler lipid mikroveziküllere transportu ile sekestrasyon (5).

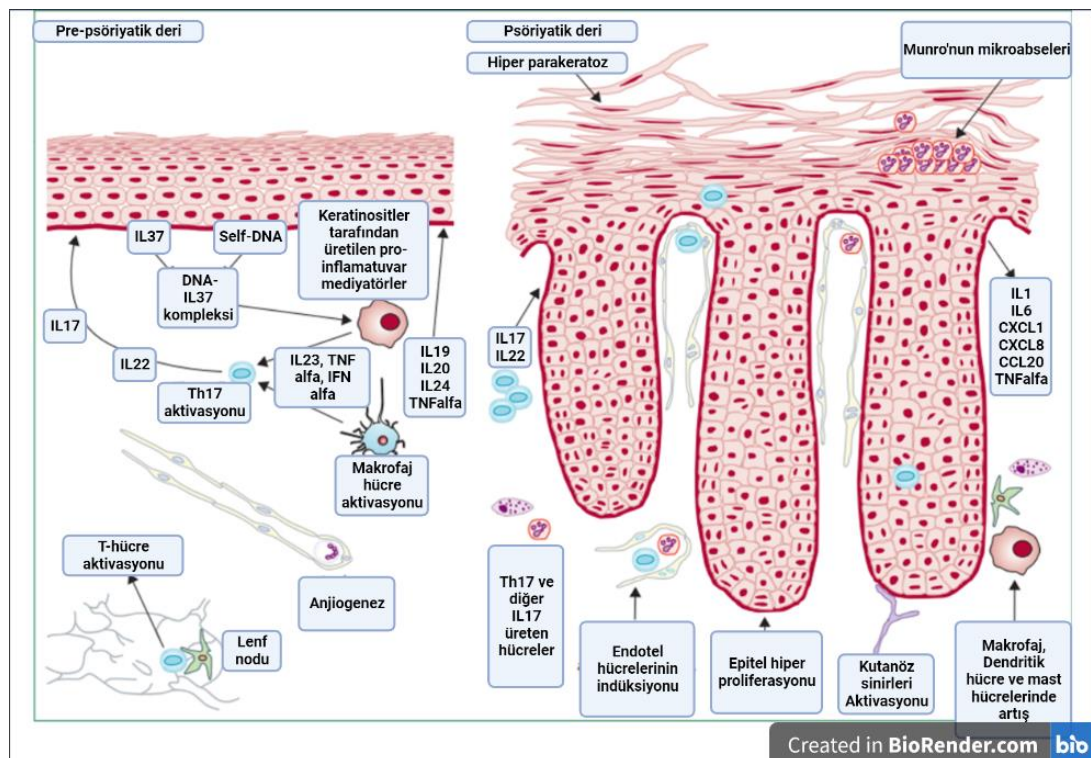
Anandamide'in yıkım enzimi ise FAAH'dır. FAAH-1 ve FAAH-2 olarak iki türü vardır. Yağ asidi amidlerinin kendilerini oluşturan yağ asidi ve aminlerine hidrolizi FAAH enzimi ile gerçekleşmektedir. hFAAH-1 tek izoform halinde eksprese edilmektedir. FAAH-1 ve FAAH-2 enzimleri hücre içinde özellikle endoplazma retikulumunun membranında bulunmaktadır (5). Ekspresyonu en çok beyinde, ardından endokrin organlardadır (48). FAAH-2 ekspresyonu en çok karaciğer, böbrek ve deride bulunur. FAAH-2, FAAH-1'e göre AEA yıkımında sadece %1 oranında görev yapmaktadır(5).

2.4 Hastalıklar

2.4.1 Psöriasis

Psöriasis oldukça sık görülen hiperkeratotik plaklarla karakterize, inflamatuvar kronik bir deri hastalığıdır (7). İnflamatuvar infiltrasyonlar, epidermal hiperplazi, düzenlenimi bozulmuş keratinosit farklanması ve damarlanma artışı ile karakterizedir (3). Kliniğinde deride acı, kaşıntı, yanma hissi, kanama ve bunların yanında psikolojik etkiler görülmektedir (7). Sebep olan moleküler mekanizmalar ve patogenezi hala tam olarak bilinmemektedir (8).

Psöriasteste Th1/Th17 farklanmasında bozukluk olması sebebiyle Th17 sayısının azalması önemli bir rol oynamaktadır (3). IL-17 etkisi ile epitel hiperproliferasyonu olması, endotel hücrelerinin indüksiyonu ile anjiogenezin artması gözlenmektedir. Bunlar yanında Munro'nun mikroabseleri ve parakeratoz izlenmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Psöriasisin immün patogenezi. (7) (Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.)

Tedavilerde öncelikle topikal ajanlar kullanılmaktadır. Bunun yanında fototerapi, sistemik ajanlar ve kombine tedaviler kullanılabilir (3). Topikal tedaviler glukokortikosteroidler, vitamin D türevleri iken tedaviye yanıt vermeyen hastalarda kalsineurin inhibitörleri, metotreksat atenercept gibi ilaçlar kullanılmaktadır (7). Ancak kılavuzlar semptomlar geçtikten sonra topikal ilacı bırakmayı önermektedir ve ilaç bırakıldıktan sonra semptomlar sıklıkla geri dönmektedir (8).

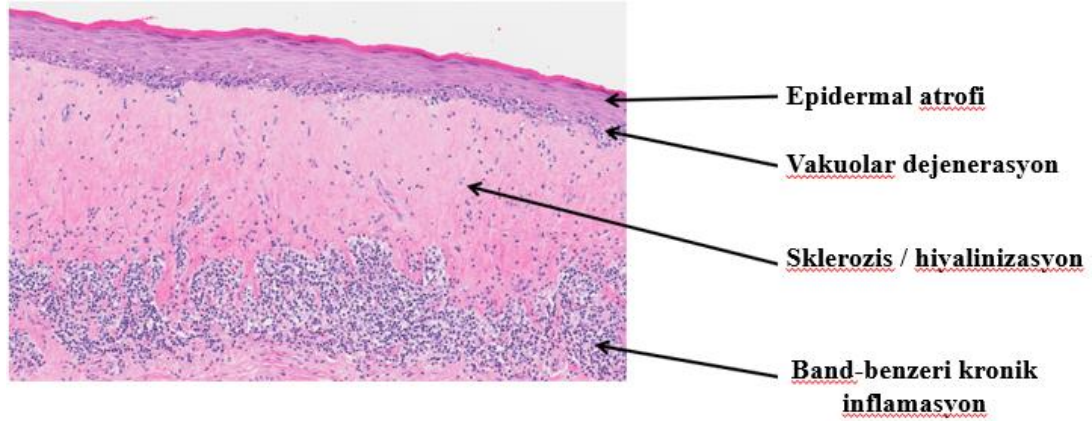
Kannabinoidlerin anti-inflamatuvar ve anti-anjiogenik etkilerinin olması psöriasisin tedavisinde kullanılabilmesini sağlamıştır (3). Psöriasisli hastaların kanlarında CB1 ligandları AEA ve 2-AG seviyeleri yüksek bulunmuştur, granüositlerinde ise AEA yıkım enzimi FAAH artmıştır. Deri biyopsilerinde ise CB1 seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (9). Yapılan çalışmalarda psöriasis tedavisinde topikal kannabinoidlerin semptomları baskılamakta etkili olduğu gösterilmiştir (10).

2.4.2 Liken Skleroz

Liken skleroz inflamatuvar, hiperkeratoz gösteren kronik bir hastalıktır (13). Dermatoloji kliniğine başvuran hastaların 1/300-1/1000'ini Liken skleroz olguları oluşturmaktadır. İngiltere'de çocukluk çağında vulvada görülen liken sklerozun prevalansı 1/900 olarak bildirilmiştir (49).

Etiyolojisinde üç farklı teori bulunmaktadır. Bunlar; enfeksiyöz, otoimmün ve kronik iritasyon şeklindedir. Primer enfeksiyöz olarak suçlanan ve araştırılan etkenler *Borrelia burgdorferi*, Epstein Barr Virus, Hepatitis C Virus ve Human Papilloma Virus'tür (50).

Histolojik olarak incelendiğinde karakteristik özellikleri bulunmaktadır, bu sebeple alınan biyopsi hem malignansiyi dışlar hem de tanının konulmasını sağlar (51). Ayırıcı tanıda yardımcı karakteristik özellikleri, likenoid interfaz dermatit, epidermal atrofi, hiperkeratoz olarak sıralanabilir (Şekil 2.7) (50). Elektron mikroskopisi ve ışık mikroskopisi ile görülebilen bulguları Tablo 2.2'de tanımlanmıştır.



Şekil 2.7. Işık mikroskopisinde Liken Skleroz bulguları. (50)

Tablo 2.2. Liken Sklerozda histolojik olarak görünen patolojiler.

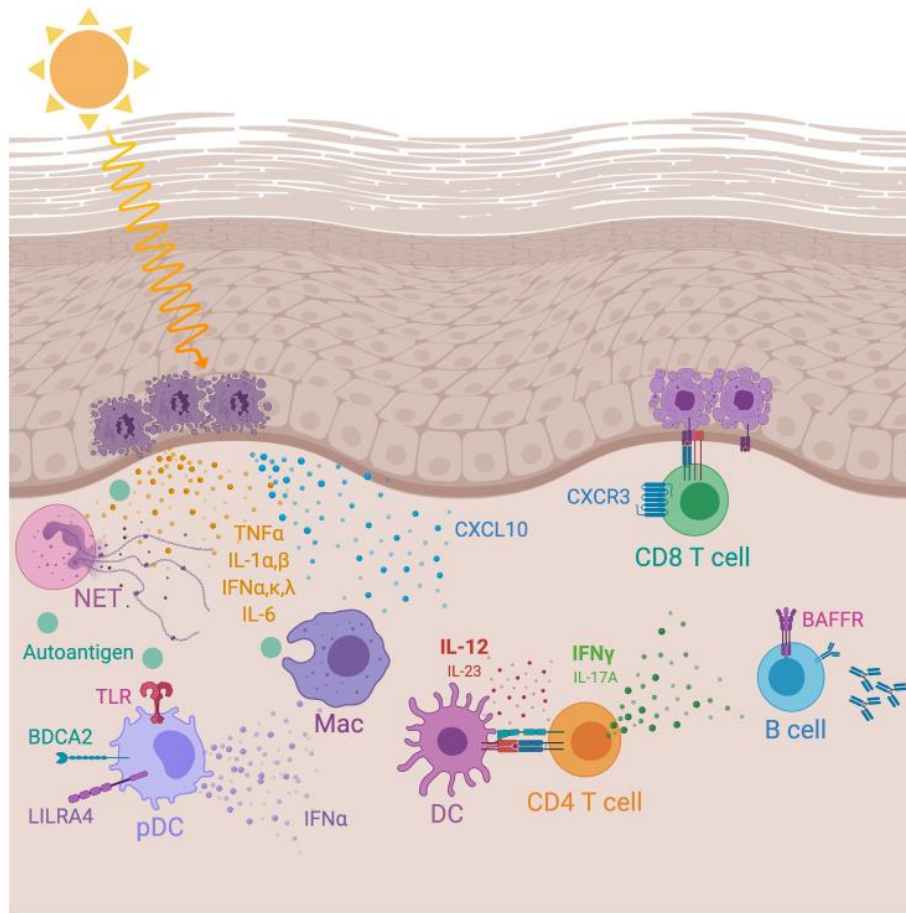
Sık görülenler	Daha az görülenler	Elektron mikroskopisi ile görülenler
Likenoid interfaz dermatit (50)	Hipertrofik epidermis (52)	Bazal laminada delikler (50)
Epidermal atrofi (52)	Epidermal yarıklar (52)	İntraselüler alanda kollagen fibrilleri (50)
Hiperkeratoz (52)	Bazal membranda kollagen IV ve VII artışı ile kalınlaşma (50)	Kapiller looplarda kayıp (50)
Band benzeri mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu (50)		Damarlarda dilatasyon ve lenfosit infiltrasyonu (50)
Foliküler tıkaçlar (40)		Dermiste disorganize kollagenler (50)
		Mast ve eosinophil görünmesi(50)

2.4.3 Kutanöz Lupus Eritematozus

Avrupa'da yaklaşık 2.500 kişide bir oranında sistemik lupus eritematozus (SLE) hastası bulunmaktadır. (53). Kutanöz lupus eritematozus ise dermal ödem, hiperkeratoz ve inflamatuvar infiltratlarla karakterize otoimmün bir hastalıktır (11). Histolojik olarak incelendiğinde bazal membranda kalınlaşma, dermo-epidermal

bileşkede vakuolar dejenerasyon, lenfositik infiltrasyon ve follüküler keratozis görülebilir (54).

Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte genetik yatkınlık, otoimmün indüksiyon ve immün sistem hasarı gibi birçok sebebi olduğu düşünülmektedir (11). İmmün patogenezinde, Şekil 2.8’de şematize edildiği gibi UV radyasyonun keratinosit nekrozu veya apoptozunu tetiklemesi ile birlikte TNF alfa, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınması ile başladığı bilinmektedir. Bu sitokinler nötrofil ekstraselüler tuzaklar (NETs) ile birleştiğinde dendritik hücrelerin (DC) INF- γ salgılamasına neden olur. Bunun üzerine CD8⁺ T hücreler dermaepidermal bileşkeye çağrılır ve keratinositlere saldırırlar ve keratinositlerin apoptozuna neden olurlar (55). Bu apoptoz ve apoptotik hücre parçalarının temizlenememesi hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (56).



Şekil 2.8. Kutanöz lupus Eritematozus'un immünopatogenezi. (55)

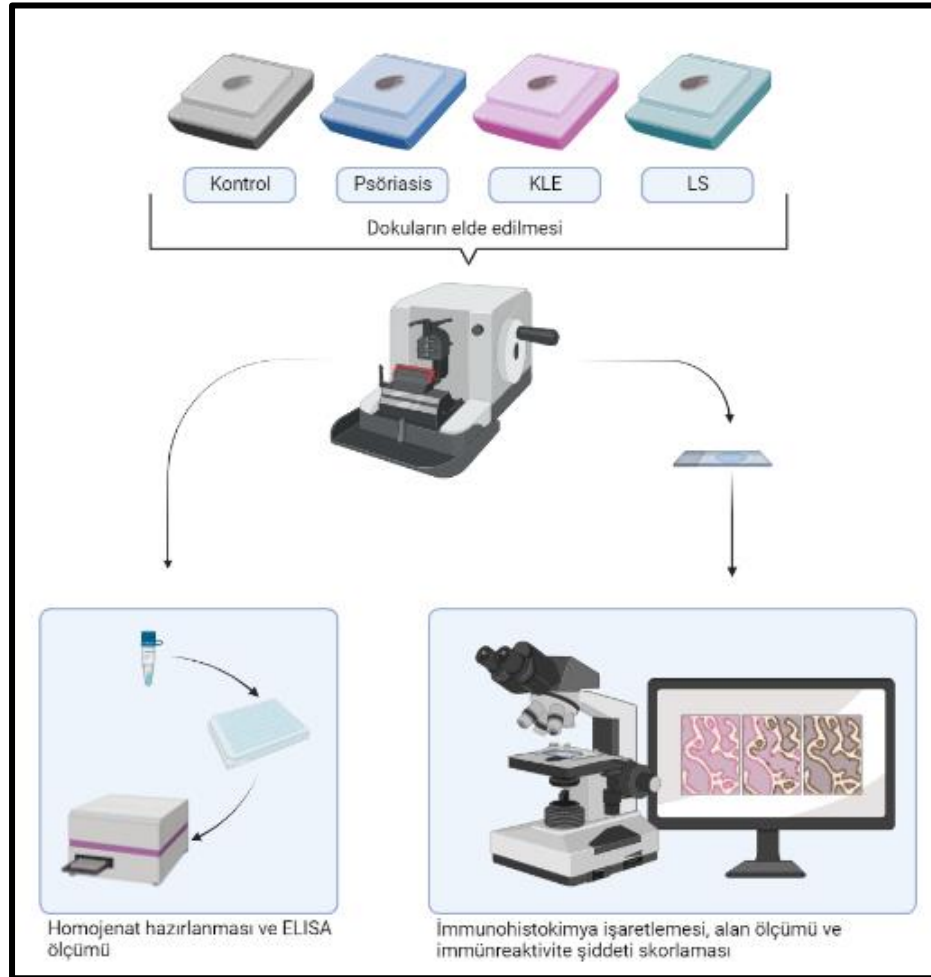
Bu hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere ruhsat almış bir ilaç yoktur, dolayısıyla da tedavisi için verilen topikal ve sistemik ilaçların çok azının etkinliği

randomize kontrollü çalışmalardan gelen kanıtlarla desteklenmektedir (12). Tedavisinde öncelikli olan lezyonların oluşmasını ve ilerlemesini engellemek amacıyla topikal veya sistemik tedaviler uygulanmasıdır. Topikal tedavilerin başında steroidler ve kalsineurin inhibitörleri vardır. Ancak yapılan çalışmalarda yüksek doz steroid kullanılması gerektiği gösterilmişse de yan etkilerinden dolayı kullanımı çok istenmemektedir. Sistemik tedaviler ise topikal ajanlar ile birlikte kullanılmaktadır. Bunlar antimalaryal ilaçlar, sistemik kortikosteroidler ve diğer immün sistem baskılayan ilaçlardır (11). Lokal veya sistemik retinoidler de kullanılmaktadır ancak kutanöz iritasyona neden olmaktadır (57). Alternatif tedaviler hala aranmaktadır (11).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Oluşturulan hipotezi doğrulamak üzere *in vivo* koşullarda; prospektif, basit randomize, kontrol grubu içeren gözlemsel tanımlayıcı bir çalışma planlanmış ve yürütülmüştür. Bu proje Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2021/18-34 karar numarası ile onaylanmıştır. Çalışma, 1964 tarihli Helsinki, Dünya Tıp Bildirgesine uygun olarak yapılmıştır (<http://www.wma.net/en/20activities/10ethics/10helsinki/>).

Bu tez çalışması; Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tıpta uzmanlık eğitimi programı kapsamında Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvar alt yapısı ve teknik donanımı kullanılarak gerçekleştirildi. Giriş bölümünde bahsedilen araştırma hedeflerini yanıtlamak amacıyla tanımlanan iş paketleri bu bölümde açıklanacaktır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışmanın gereç ve yöntemleri şeması. (Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.)

3.1. Dokuların Elde Edilmesi:

Çalışmada kontrol grubu örnekleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'ndan alınan sağlıklı atık derilerden elde edildi. Hastalık grupları ise Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden alınan hasta biyopsi örnekleri ile oluşturuldu. Hastalık grubu örnekleri gelişmiş lezyonu olan hastalardan seçildi. Çalışma grupları aşağıdaki şekildedir;

Grup 1: Kontrol Grubu

Grup 2: Psöriasis

Grup 3: Kutanöz Lupus Eritematozus

Grup 4: Liken Skleroz

Bu 4 grup arasında yüksek büyüklükte bir etki farkı bulunacağı öngörüsü altında (etki büyüklüğü =0,50), %80 güç düzeyinde ve %5 tip-1 hata ile her bir gruba en az 12 örnek olmak üzere toplam 48 örneğe ihtiyaç olduğu hesaplandı. Çalışmanın bağımsız değişkenleri çalışma grupları iken, bağımlı değişkenleri TNF- α konsantrasyonları; CB1 reseptör, FAAH enzimi ve PLD enzimi boyanma yüzdeleri ve immün reaktivite şiddetidir.

Kontrol grubu örneklerde yaş aralığı 24 ila 32 arasında idi. Örneklerden 11'i kadınlardan, 1'i erkekten elde edildi. Psöriasis grubunda yaş aralığı 14 ila 71 arasında olup, 7 örnek kadın, 5 örnek erkek dokusuna aitti. Kutanöz lupus eritematozus grubunda yaş aralığı 28 ila 65 arasında olup, 11 örnek kadın, 1 örnek erkek dokusuna aitti. Liken skleroz grubunda yaş aralığı 33 ila 66 arasında olup, 12 örnek kadın dokusuna aitti.

3.2. Gerekli Solüsyonların Hazırlanması

Fosfat Tampon Hazırlanması

Solüsyon 1:

53,65 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$

1000ml distile suda çözdürüldü

Solüsyon 2:

31,2 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

1000ml distile suda çözdürüldü.

Hazırlanması:

400ml Solüsyon 1 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi)

100 ml Solüsyon 2 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi)

500 ml distile su ile karıştırıldı.

%10 Tamponlu Formaldehit Hazırlanması

6,5 gram Na_2HPO_4 tartıldı.

4,0 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ tartıldı.

Cam mezür ile 900 ml distile su ölçüldü ve kapaklı cam şişe içine koyuldu. Stok %37'lik formalin tespit solüsyonundan 100 ml ölçüldü ve cam şişe içerisindeki distile su üzerine ilave edildi. Tartılan Na_2HPO_4 ve $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ cam şişe içerisine ilave edildi. Hazırlanan solüsyon, balık konarak manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı.

Fosfat Tampon Salin (PBS) Hazırlanması

Solüsyon 1:

109,212 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$

350,64 gram NaCl

4000 ml Distile suda çözdürüldü

Solüsyon 2:

15,6 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

87,66 gram NaCl

1000ml Distile suda çözdürüldü

Hazırlanması:

Solüsyon 1 ve solüsyon 2 karıştırıldı.
Karışım distile su ile 10 kat sulandırıldı.

Hematoksilen hazırlanması:

5,5gr Hematoksilen kristalini etil alkolde çözüldü.
60 gr Potasyum alüminyum sülfat 600 ml distile suda çözüldü.
0,5 gr Sodyum iodatı 10 ml distile suda çözüldü.
Hematoksilen ve potasyum alüminyum sülfat solüsyonlarını birbirine iyice karıştırıldı. Ardından sodyum iodat solüsyonunu eklendi.
Elde edilen karışıma 20 ml asetik asit ekleyip iyice karıştırdıktan sonra bir gece oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak bekletildi..
Ertesi gün 300 ml gliserol ekleyip iyice karıştırıldı.

DAB hazırlanması:

DAB substrat ve DAB kromojen 50/1 oranında alüminyum folyo ile kaplı kaptan 15 saniye vorteks ile karıştırılarak hazırlandı.

0.05 M Tris - 1 mM EDTA- %0.5 Tween 20 solüsyonunun hazırlanması:

1000 ml distile su içerisinde 6.05 gram Tris base ve 0.37 gram EDTA çözüldü.
Ardından pH ölçülerek 7.5 olduğuna emin oldundu. 0,5ml Tween 20 eklenerek karıştırıldı.

3.3. Dokuların Hazırlanması:

Kontrol grubu deri örnekleri 1 cm² büyüklüğünde kesilerek kasetlere yerleştirildi ve %10 fosfat tamponlu formaldehitte tespit edildi. Tespit edilen doku örnekleri doku takip cihazında (Leica TP1020) dehidratasyon (%70, %80, %90, %96, %100'lük etil alkoller), şeffaflandırma (ksilol) ve sıvı parafin ile infiltrasyon işlemleri gerçekleştirilerek gömme yapılmaya hazır hale getirildi. Takip edilen doku örnekleri parafine gömüldü.

Deney grubu hastalarına ait dokular parafin blok olarak Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan alındı.

3.4. Dokularda İmmünohistokimya Uygulaması

Kontrol ve hastalık gruplarına ait deri bloklarından kızaklı mikrotom (Leica SM2000R) ile kesilen 5 µm kalınlığındaki kesitler lamlara (HistoBond®+) alındı.

Elde edilen örneklerde indirekt streptavidin-biotin-peroksidaz immünohistokimya tekniği ile immün işaretleme yapıldı. İmmün işaretleme yapılan örnekler aydınlık alan mikroskopunda (Leica DM6000 B) incelendi ve fotoğraflandı.

Kullanılan Primer Antikorlar

Kullanılan primer antikorlar Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan primer antikorlar.

Primer Antikor	Kodu	Monoklonal/poliklonal	Tür	Dilüsyon
Anti-Cannabinoid Reseptör 1	ab23703	Poliklonal	Tavşan	1/250
Recombinant Anti-FAAH1	ab248219	Monoklonal	Tavşan	1/150
Anti-Phospholipase D1	ab189191	Poliklonal	Tavşan	1/300

Kullanılan Sekonder Antikorlar

Sekonder antikor olarak Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit (ab64264) kullanıldı.

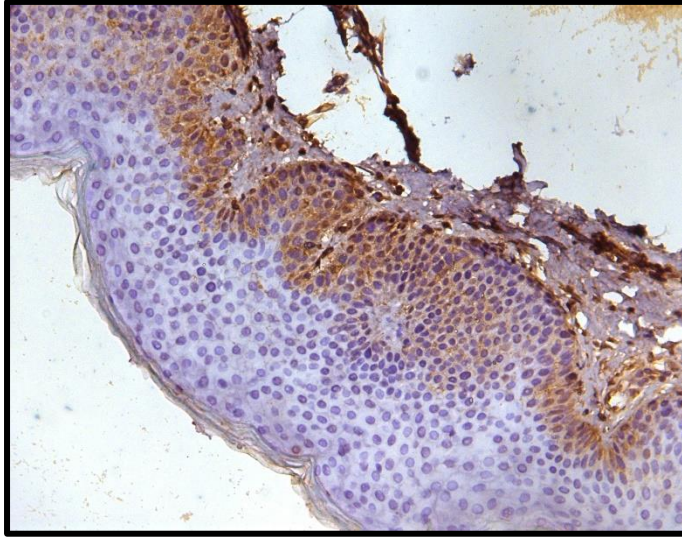
İmmün işaretleme basamakları

- 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınması ve 60 C°de bir gece bekletilerek deparafinizasyon
- Ksilen uygulaması (15x3 dakika)
- Rehidratasyon (%96, %90, %80’lik alkollerde 10’ar dakika)
- Endojen peroksidaz blokajı (Ab64264 Sekonder kitinde bulunan %3’lük hidrojen peroksit, 10 dakika)
- PBS ile yıkama (2 kez)
- Antijen geri çağırma (sitrata tampon, düdüklü tencere)
- Kesitlerin oda sıcaklığına getirilmesi (tampon içerisinde en az 30 dakika soğuma)

- PBS ile yıkama (3 kez)
- Protein blokajı (Ab64264 sekonder kitinde bulunan “Protein blok” solüsyonu, 10 dakika)
 - Primer antikor uygulaması (nemli kutuda bir gece +4C’da)
 - PBS ile yıkama (4 kez)
 - Biyotinlenmiş goat anti polivalant ile inkübasyon (10 dakika)
 - PBS ile yıkama (4 kez)
 - Streptavidin peroksidaz ile inkübasyon (10 dakika)
 - PBS ile yıkama (4 kez)
 - DAB uygulaması (50/1 oranında DAB substrat-DAB kromojen 3 dakika)
 - PBS ile yıkama (4 kez)
 - Hematoksilen (30 saniye)
 - Distile suda yıkama
 - Dehidratasyon (%96, %90, %80’lik alkollerde 5 dakika)
 - Ksilende (30 dakika)
 - Entellan ile kapama

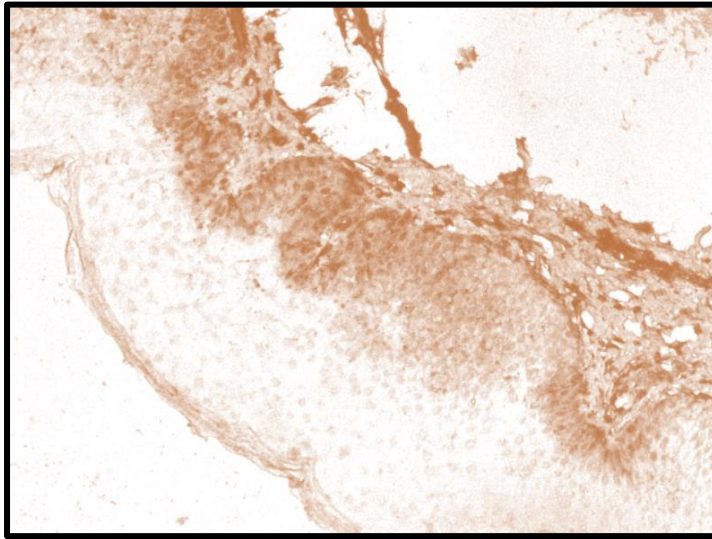
3.5. Imagej Görüntü Analiz Programı ile İmmün Reaktivitenin Olduğu Alan Oranının Bulunması

İndirekt streptavidin-biotin-peroksidaz immünhistokimya tekniği ile işaretlenen preperatların fotoğrafları çekilerek immün reaktivitenin olduğu alan yüzdesinin hesaplanması için Ruifrok AC, Johnston DA’nın “Quantification of histochemical staining by color deconvolution” makalesindeki yöntem kullanıldı (58). Bu yöntem ile ölçümü yapılacak fotoğraf ImageJ (1.53k, 64bit for Windows, ABD) programı ile açıldı (Şekil 3.2).



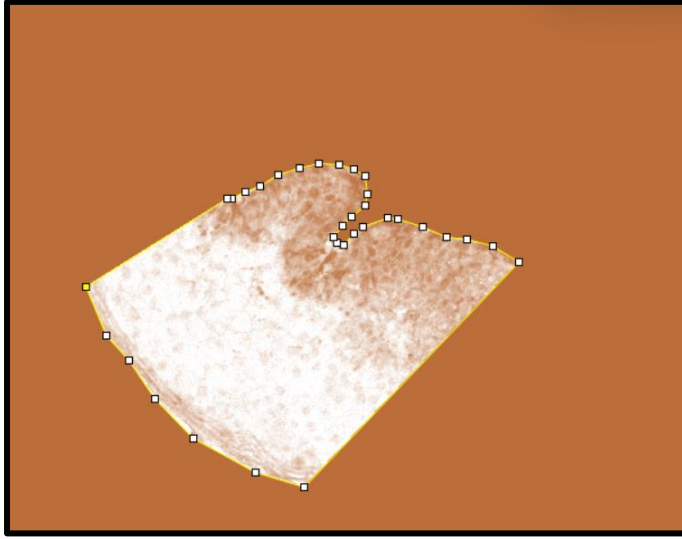
Şekil 3.2. ImageJ görünümü.

Ardından Image – Color – “Color Deconvolution2” eklentisine tıklandı. Açılan ekranda “Vectors” kısmından yapılan immünohistokimyasal boyaları içeren “H DAB” (Hematoksilen – DAB) seçildi. Ardından “OK” tuşuna basılarak seçilen fotoğraf renklerine 8bit olacak şekilde ayrıldı (Şekil 3.3).



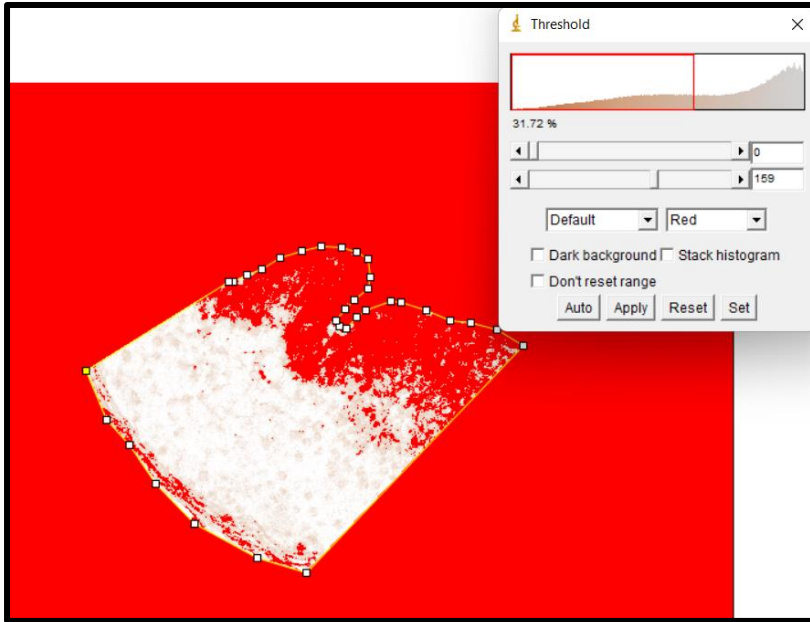
Şekil 3.3. Fotoğrafın renklere ayrılması ve kahverengi resmin seçimi.

Ardından DAB kromojen ile boyanan kısmı gösteren kahverengi resim ile orjinal resim yanyana getirildi. Yüzdesi ölçülecek olan alan kahverengi olan fotoğrafta “polygonal selection” aracı kullanılarak seçildi ve o alanın dışı “Edit – Clear outside” a tıklanarak silindi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Fotoğrafın dış bölgesinin silinmesi.

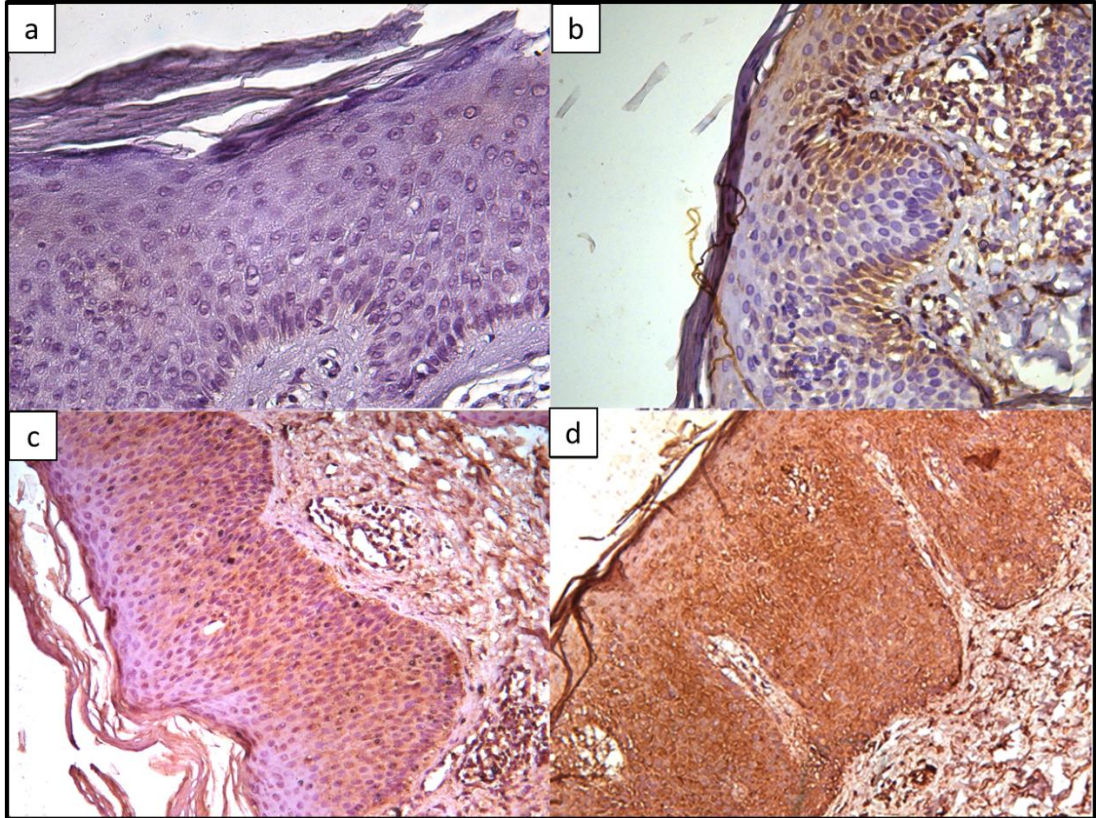
“Image – Adjust – Threshold” aracı açıldı. Kaydırma çubukları 0’a getirildi. Altındaki kaydırma çubuğu boyanan alan tamamen seçilene kadar kaydırıldı. Üst taraftaki yüzde kaydedildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Threshold kullanımı.

3.6. İmmün Reaktivitenin Değerlendirilmesi

İmmün reaktivitenin değerlendirilmesi için dokuların immünohistokimyasal işaretleme sonrası fotoğrafları çekildi. İmmünohistokimyasal işaretleme şiddeti Şekil 3.6'daki örneklere uygun olarak 0 (negatif), 1 (zayıf), 2 (orta), 3 (şiddetli) olarak skorlandı (59).



Şekil 3.6. İmmünohistokimyasal işaretleme şiddeti skorlaması; (a) 0 (negatif); (b) 1 (zayıf); (c) 2 (orta); (d) 3 (şiddetli).

3.7. TNF- α Miktarının Ölçülmesi

3.7.1 Formalin ile Fikse Edilip Parafine Gömülmüş Dokulardan Homojenat Hazırlanması

Formalin ile fikse edilip parafine gömülmüş dokulardan homojenatlar Eric M Nicholson ve arkadaşlarının yöntemi baz alınarak hazırlandı (60). Parafin bloklardan 10 μ m kalınlığında 4 kesit alınıp 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 300 μ l 0.05 M Tris - 1 mM EDTA- %0.5 Tween 20 solüsyonu eklendi. Santrifüj tüpü kaynar suda 10 dakika bekletildi ve hemen ardından donana kadar sıvı azota koyuldu. Bu

kaynatma-dondurma siklusu 1 kez daha tekrar edildi. Sonrasında tekrar 10 dakika kaynatıldıktan sonra santrifüj tüpleri soğumadan 3000 g x 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem dokunun en altta pelet haline gelmesini, parafinin ise aköz kısımdan ayrılarak en üstte yerleşmesini sağladı. Eğer parafin ayrımı tam gerçekleşmediyse kaynatma-dondurma siklusu 1 kez daha tekrar edildi ve tekrar santrifüj yapıldı. Tüpün ortasında bulunan aköz kısımdan 200 µl alınarak ayrı bir tüpe alındı ve ELİSA testi uygulaması için hazır bekletildi.

3.7.2 ELİSA

ELİSA testi için Human TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) ELISA Kit (ELK1190, ELK Biotechnology, P.R.C.) kullanıldı. Kit içerisindeki tüm solüsyonlar ve doku homojenatları oda ısısına gelene kadar beklendi. 7 farklı dilüsyon ile hazırlanmış standart solüsyon, boş solüsyon ve doku homojenatlarından 100 µl alınarak 96 kuyucuklu plağa eklendi ve 37°C’de 80 dakika inkübe edildi. Ardından kuyucukların içindeki sıvılar boşaltılıp kit içerisinde bulunan yıkama solüsyonu ile her kuyucuğa 200 µl eklenerek 3 kere yıkandı. Yıkamadan sonra her kuyucuğa 100 µl Biotinylated Antibody Working Solution eklendi ve 37°C’de 50 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası önceki basamaktaki gibi 3 kere yıkandı ve 100 µl Streptavidin-HRP Working Solution eklendi ve 37°C’de 50 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 5 kere yıkandı ve 90 µl TMB Substrate Solution eklendi ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi. 20 dakikanın sonunda 50 µl Stop Reagent eklendi, plağın kenarına hafifçe vurarak karışmaları sağlandı. 450 nm’de mikropłaka okuyucu (Versamax ,Molecular Devices) kullanılarak konsantrasyonları ölçüldü.

3.7.3 Dokudaki TNF- α Konsantrasyonunun Hesaplanması

Dokulardaki TNF- α konsantrasyonunun ölçülmesi için;

$$\frac{\text{Mikropłak okuyucunun okuduğu konsantrasyon } \left(\frac{\text{pg}}{\text{ml}}\right)}{\text{Homojenatın hazırlandığı doku kesiti alanı } (\mu\text{m}^2)} \times \frac{3 \times 10^7}{4}$$

formülü kullanılarak sonuç “mg/l” birimi ile doku örneğindeki TNF- α konsantrasyonu elde edildi.

TNF- α Konsantrasyonunun Hesaplanması için Kullanılan Formülün Geliştirilmesi

Formül geliştirilmesi için öncelikle her gruptan 6 kişiden ölçümler yapıldı. Dokuda birim hacimde bulunan TNF- α miktarının bulunması için, *homojenat hazırlanırken kullanılan doku hacmi* hesaplandı. Bu amaçla

$$V \mu m^3 = \text{Doku hacmi} = \text{Dokunun kesit alanı } \mu m^2 (A) \times \text{Kesit kalınlığı } \mu m$$

formülü kullanıldı. Dokunun kesit alanının hesaplanması için ImageJ 1.53k programı kullanıldı. Programda açılan resim üzerinde ölçekle aynı uzunlukta bir çizgi çizildi. “set scale” işlemi kullanılarak programda 1 pikselin kaç μm uzunluğunda olduğu belirlendi. Ardından “polygonal selection” aracı kullanılarak dokunun etrafı işaretlendi ve “measure” işlemi kullanılarak doku alanı μm^2 cinsinden ölçüldü.

Homojenatın tüm hacmi

$$\begin{aligned} \text{Homojenatın hacmi} &= \text{Eklenen solüsyon miktarı } \mu l + V \mu m^3 \\ &= 300 \mu l + V \times 10^{-9} \mu l \end{aligned}$$

formülü ile hesaplandı.

Hazırlanan *homojenatta bulunan TNF- α miktarını* ölçmek için

$$\begin{aligned} \text{Homojenattaki TNF}\alpha \text{ miktarı} \\ &= \text{Homojenatın hacmi} \\ &\times \text{Homojenattaki TNF}\alpha \text{ konsantrasyonu } (T) \end{aligned}$$

formülü kullanıldı. Ancak homojenat hazırlanırken kullanılan solüsyonun birimi μl , dokunun hacmi μm^3 , TNF- α konsantrasyonu ise pg/ml birimlerine sahip olduğundan işlemin yapılabilmesi için birimlerin aynı birimlere dönüştürüldü.

Dokuda birim hacimde bulunan TNF- α konsantrasyonu hesabı için

$$\begin{aligned} X &= \text{Birim hacimde bulunan TNF}\alpha \text{ konsantrasyonu} \\ &= \frac{\text{Homojenattaki TNF}\alpha \text{ miktarı}}{\text{Dokunun hacmi}} \end{aligned}$$

formülü kullanıldı.

Birimleri yerlerine koyunca ve birbirlerine dönüştürülünce;

$$X = \frac{\text{Homojenatın hacmi} \times T \left(\frac{pg}{ml} \right)}{V \mu m^3}$$



$$X = \frac{(300 \mu l + V \times 10^{-9} \mu l) \times T \left(\frac{pg}{ml}\right)}{V \mu m^3}$$



$$X = \frac{(300 \mu l + V \times 10^{-9} \mu l) \times T \times 10^{-3} (pg/\mu l)}{V \times 10^{-9} \mu l}$$



$$X = \frac{(300 \mu l + (A \times 40) \times 10^{-9} \mu l) \times T \times 10^{-3} \left(\frac{pg}{\mu l}\right)}{(A \times 40) \times 10^{-9} \mu l}$$



$$X = \frac{(300 \mu l + (A \times 40) \times 10^{-9} \mu l)}{(A \times 40) \times 10^{-9} \mu l} \times T \times 10^{-3} \left(\frac{pg}{\mu l}\right)$$



$$X = \left(\frac{300 \mu l}{(A \times 40) \times 10^{-9} \mu l} + 1 \right) \times T \times 10^{-3} \left(\frac{pg}{\mu l}\right)$$

Formülde yer alan “1” sayısı, yapılan ölçümlerde maksimum %0,2’lik bir fark yarattığı için göz ardı edildi.

$$X = \frac{300 \mu l}{A \times 40 \times 10^{-9} \mu l} \times T \times 10^{-3} \left(\frac{pg}{\mu l}\right)$$



$$X = \frac{300 \mu l \times 10^9}{A \times 40 \mu l} \times T \times 10^{-3} \left(\frac{pg}{\mu l}\right)$$



$$X = \frac{T \times 3 \times 10^7}{A \times 4} \left(\frac{pg}{\mu l} \right) = \frac{T \times 3 \times 10^7}{A \times 4} \left(\frac{mg}{l} \right)$$

olarak formül elde edildi.

3.8. Dokularda Hiperkeratoz değerlendirilmesi

Hiperkeratoz değerlendirilmesi için hastalık gruplarına ait deri bloklarından kızıaklı mikrotom (Leica SM2000R) ile kesilen 5 µm kalınlığındaki kesitler lamlara (HistoBond®+) alındı. Hematoksilen-Eozin yöntemi ile boyanan kesitler aydınlık alan mikroskopunda (Leica DM6000 B) incelendi ve stratum korneum tabakasındaki hücrelerin çekirdeği olup olmamasına göre ortokeratoz ve parakeratoz olarak değerlendirilmiştir.

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistik için IBM SPSS V29.0 kullanıldı. Verilerin parametrik dağılıp dağılmadığını kontrol etmek için Anderson-Darling testi kullanıldı. TNF-α konsantrasyonları ve epidermisteki immün reaktivite gösteren alan yüzdeleri normal dağılım gösterdiğinden istatistiksel anlamlılık için ANOVA testi kullanıldı. İmmün reaktivite şiddeti skorlaması istatistiksel anlamlılık için Ki-kare testi kullanıldı. Korelasyon testleri için Spearman korelasyon testi yapıldı.

4. BULGULAR

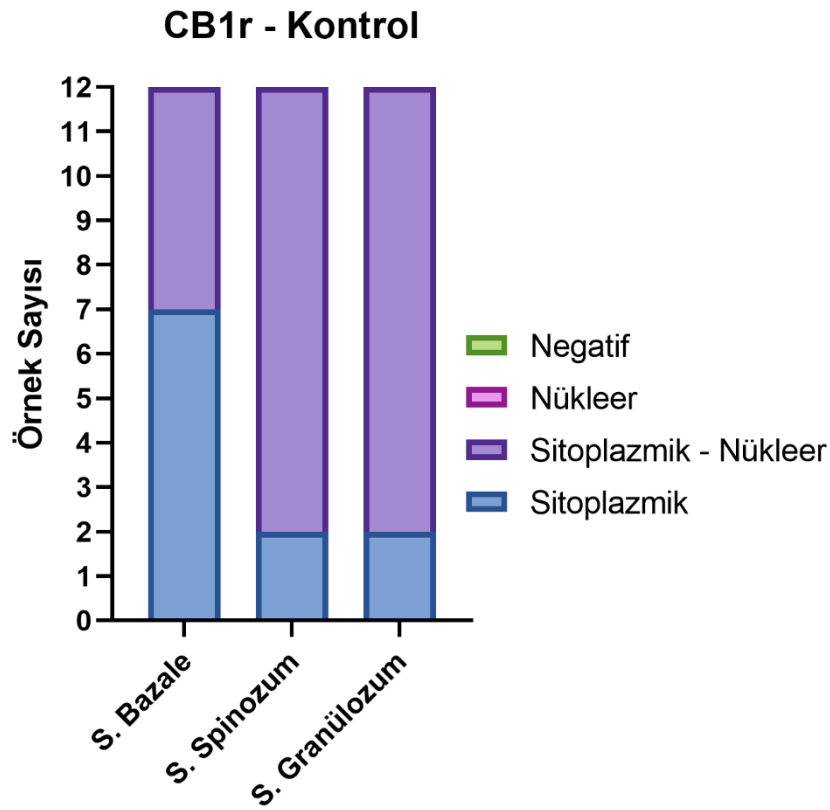
4.1 Demografik Bulgular

Kontrol grubu örneklerde yaş aralığı 24 ila 32 arasında idi. Örneklerden 11'i kadınlardan, 1'i erkekten elde edildi. Psöriasis grubunda yaş aralığı 14 ila 71 arasında olup, 7 örnek kadın, 5 örnek erkek dokusuna aitti. Kutanöz lupus eritematozus grubunda yaş aralığı 28 ila 65 arasında olup, 11 örnek kadın, 1 örnek erkek dokusuna aitti. Liken skleroz grubunda yaş aralığı 33 ila 66 arasında olup, 12 örnek kadın dokusuna aitti.

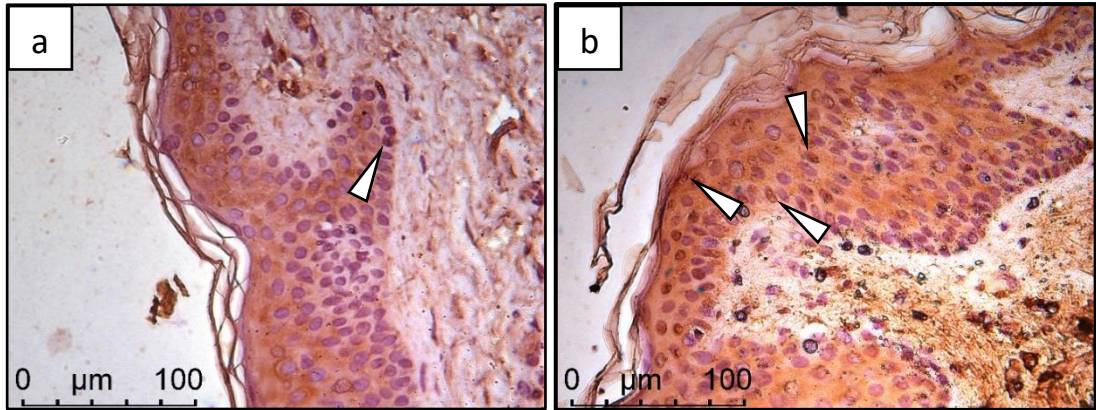
4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1 CB1 Reseptör İmmünohistokimyası

Kontrol grubunda; epidermiste yaygın ve kuvvetli sitoplazmik CB1 reseptör immün reaktivitesi izlendi. Epiderminin tüm tabakalarında kontrol grubunda kuvvetli sitoplazmik immün reaktivite izlendi (Şekil 4.1). Epidermiste kontrol grubunda sitoplazmik immün reaktivitenin yanı sıra 10 örnekte stratum spinosum ve stratum granulozum tabakalarında bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite izlendi. Stratum spinosum ve stratum granulozum tabakalarında nükleer immün reaktivite olan 10 örnekten 5'inde ise bu iki tabakanın yanı sıra stratum bazalede de bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite görüldü. 2 örnekte ise üç tabakada sadece sitoplazmik immün reaktivite vardı, nükleer immün reaktivite izlenmedi (Şekil 4.2). Kontrol grubu örneklerinde CB1 reseptör immün reaktivitesi görülen bölgeler Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Kontrol grubu örneklerinde epiderminis tabakalarında sitoplazmik ve nükleer CB1r immün reaktivitesi.



Şekil 4.2. Kontrol grubu CB1r immün reaktivitesi; Tüm örneklerde tüm tabakalarda sitoplazmik immün reaktivite izlendi. Örneklerin bazılarında sadece stratum bazalede nükleer immün reaktivite varken (a), tüm tabakalarda nükleer immün reaktivite olan örnekler mevcuttu (b). (Δ): Nükleer immün reaktivite. Anti-CB1 x400.

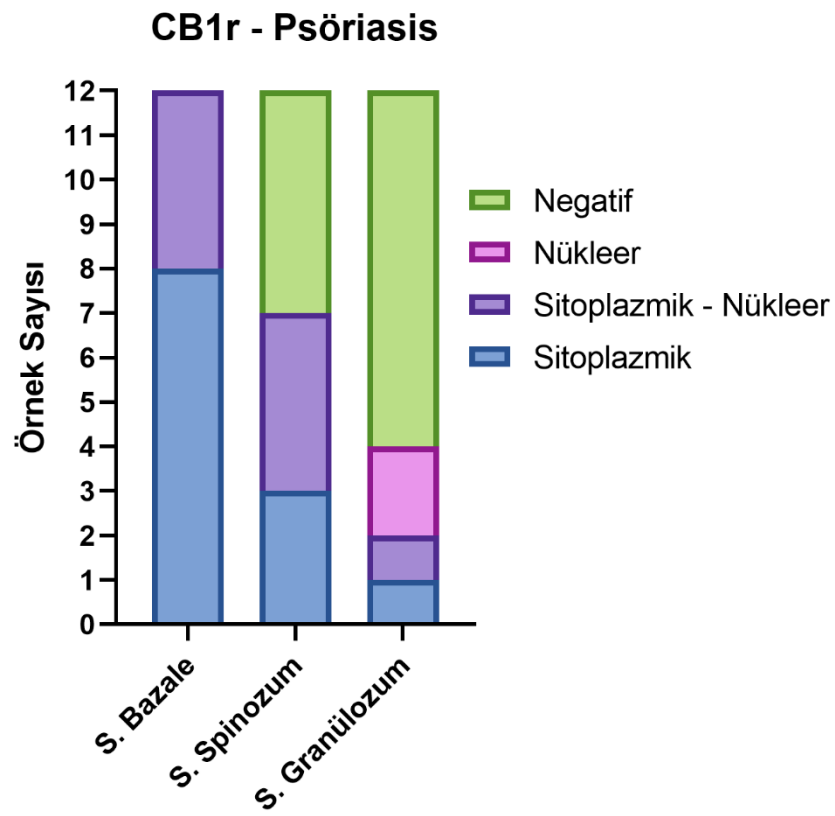
Psöriasis grubunda; stratum bazale tabakasında tüm hasta örneklerinde sitoplazmik immün reaktivite izlendi. Stratum spinozum tabakasında ise 7 hastada sitoplazmik immün reaktivite izlenirken, 5 hastada sitoplazmik işaretleme zayıf olarak

izlendi. Stratum granülozum tabakasında 2 hasta örneğinde sitoplazmik immün reaktivite izlenirken, 2 hasta örneğinde ise çok zayıf olarak işaretlendiği görüldü. 8 hasta örneğinde ise stratum granülozum tabakasında immün reaktivite gözlenmedi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

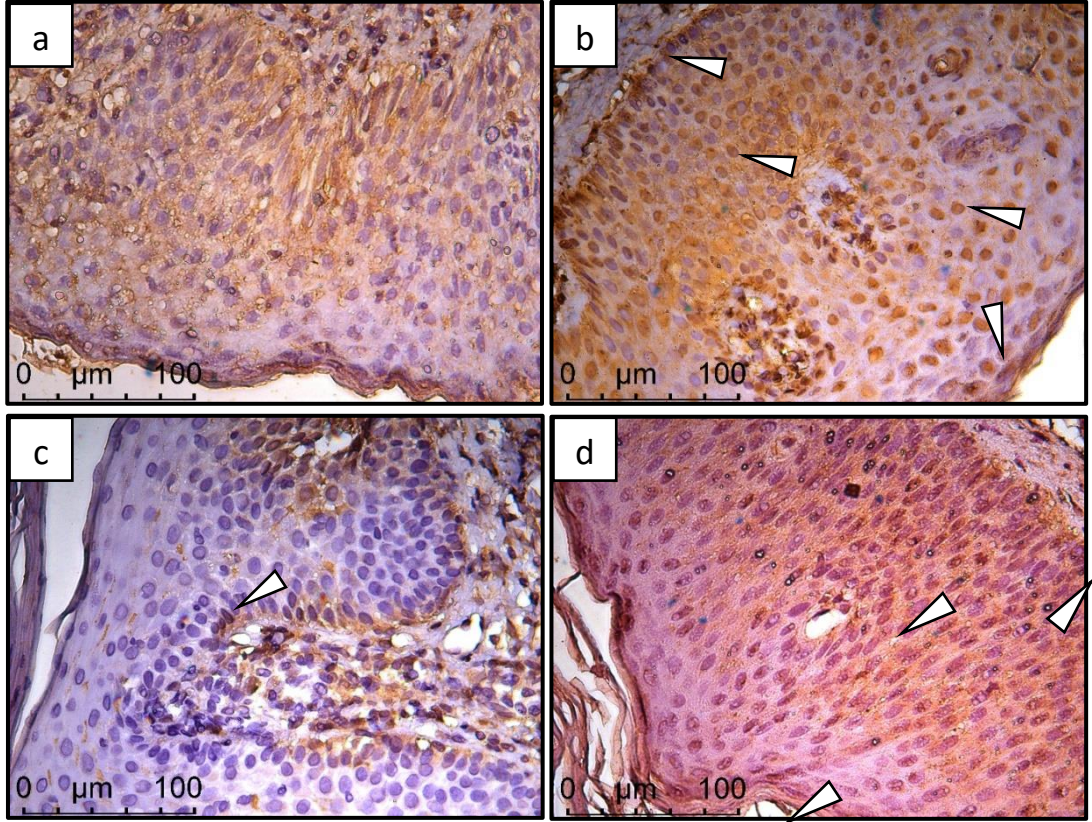
Epidermiste psöriasis grubunda 2 örnekte tüm tabakalarda nükleer immün reaktivite izlendi. 5 hasta örneğinde stratum bazalede bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite, 4 hasta örneğinde stratum spinozumda bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite, 4 hasta örneğinde ise stratum granülozumda bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite görüldü. 6 hasta örneğinde ise hiçbir tabakada nükleer immün reaktivite izlenmedi (Şekil 4.4).

Papiller bölgelerde CB1 immün reaktivitesine bakıldığında, derinleşen bölgelerde stratum bazaledeki immün reaktivitenin kaybolduğu, papiller dermisen epidermise girdiği alanlarda ise stratum bazaledeki immün reaktivitenin arttığı gözlemlendi (Şekil 4.5).

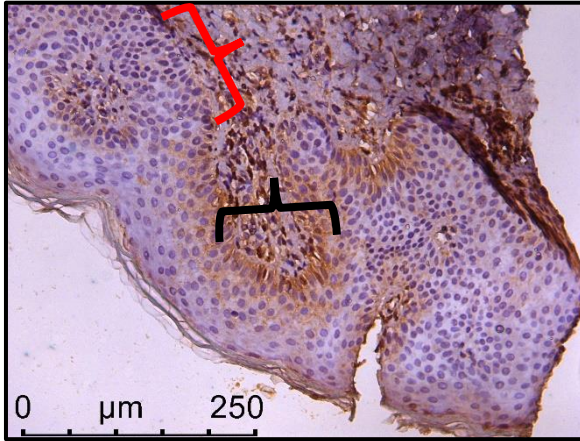
Epidermiste immün reaktivite gösteren alan yüzdesi diğer 3 gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu (Şekil 4.11). İmmün reaktivite şiddeti ise diğer 3 gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,001$).



Şekil 4.3. Psöriasis grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer CB1r immün reaktivitesi.



Şekil 4.4. Psöriasis grubu CB1r immün reaktivitesi; Tüm tabakalarda sitoplazmik immün reaktivite (a), sadece stratum bazale ve stratum spinozumda sitoplazmik immün reaktivite (b, d), ve stratum spinozumda zayıf sitoplazmik immün reaktivite (c) bulunan örnekler. Nükleer immün reaktivite olmayan (a), sadece stratum bazalede nükleer immün reaktivite olan (c) ve tüm tabakalarda nükleer immün reaktivite bulunan örnekler (b,d). (Δ): Nükleer immün reaktivite. Anti-CB1 x400.

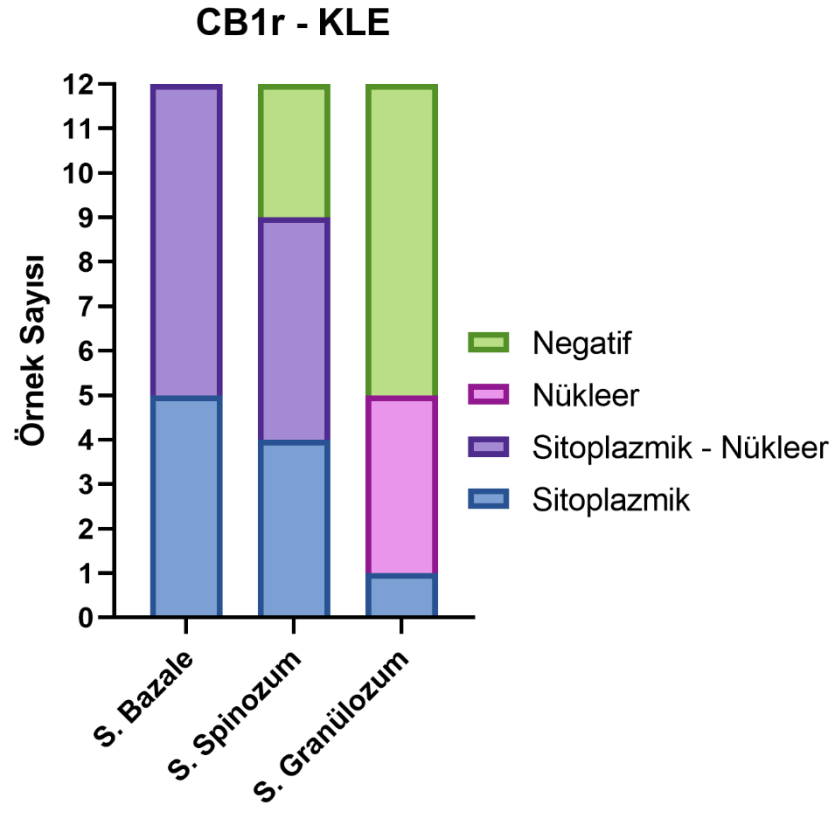


Şekil 4.5. Psöriasis grubu CB1r immün reaktivitesi; papiller bölgelerde CB1 immün reaktivitesi. Anti-CB1 x200. Kırmızı parantez: Uzayan rete kenarları bölgesi, Siyah parantez: Papiller dermisin epidermise doğru uzayan bölgesi.

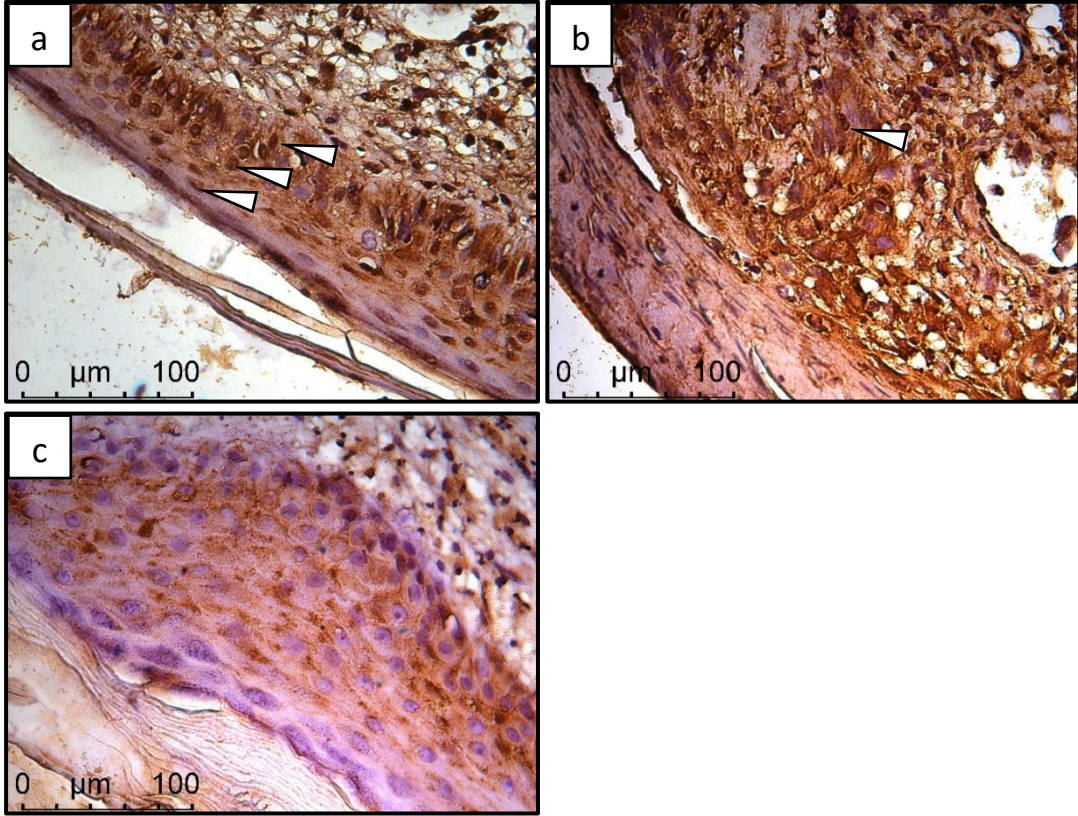
KLE grubunda; stratum bazale tabakasında tüm hasta örneklerinde sitoplazmik immün reaktivite izlendi. Stratum spinozum tabakasında ise 9 hastada sitoplazmik immün reaktivite izlenirken, 3 hastada sitoplazmik immün reaktivite izlenmedi. Stratum granülozum tabakasında 1 hasta örneğinde sitoplazmik immün reaktivite izlenirken, 1 hasta örneğinde ise çok zayıf immün reaktivite görüldü. 10 hasta örneğinde ise stratum granülozum tabakasında immün reaktivite gözlenmedi (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

Epidermiste KLE grubunda 4 örnekte tüm tabakalarda bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite izlendi. Toplamda bakıldığında, stratum bazalede nükleer immün reaktivite 7 hasta örneğinde, stratum spinozum nükleer immün reaktivite 5 hasta örneğinde, stratum granülozum nükleer immün reaktivite ise 5 hasta örneğinde görüldü. 4 hasta örneğinde ise hiçbir tabakada nükleer immün reaktivite izlenmedi (Şekil 4.7). Keratin tıkaç bölgelerinde immün reaktivitenin azaldığı izlendi (Şekil 4.8).

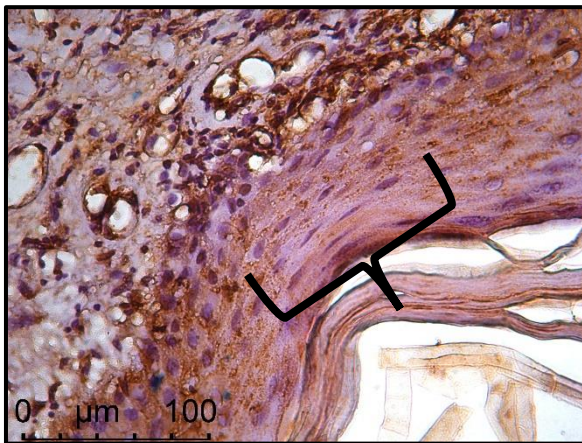
Epidermiste immün reaktivite gösteren alan yüzdesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (Şekil 4.11). İmmün reaktivite şiddeti ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,001$).



Şekil 4.6. KLE grubu örneklerinde epiderminin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer CB1r immün reaktivitesi.



Şekil 4.7. KLE grubu CB1r immün reaktivitesi; stratum bazale ve stratum spinozumda sitoplazmik immün reaktivite (a, c) ve epidermisin tüm tabakalarında sitoplazmik immün reaktivite (b). Nükleer immün reaktivite olmayan örnek (c), sadece stratum bazalede nükleer immün reaktivite olan örnek (b) ve tüm tabakalarda nükleer immün reaktivite olan örnek (a). (Δ): Nükleer immün reaktivite. Anti-CB1r x400.



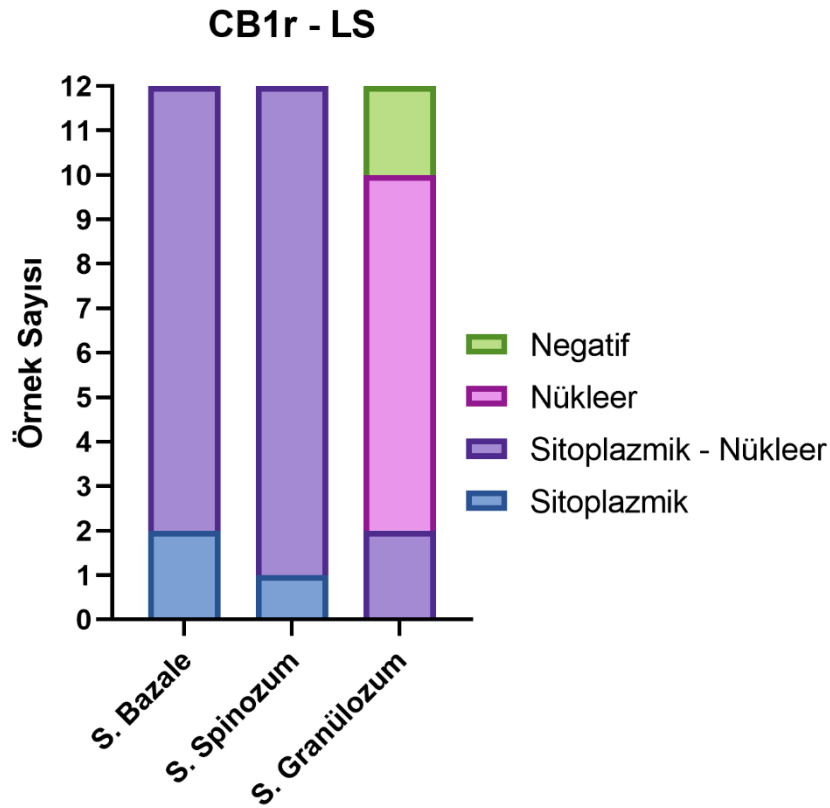
Şekil 4.8. KLE grubu CB1r immün reaktivitesi; keratin tıkaçlarda immün reaktivitenin azaldığı dikkati çektir. Anti-CB1r x400.

LS grubunda; stratum bazale ve stratum spinozum tabakasında tüm hasta örneklerinde sitoplazmik immün reaktivite izlendi. Stratum granülozum tabakasında 2

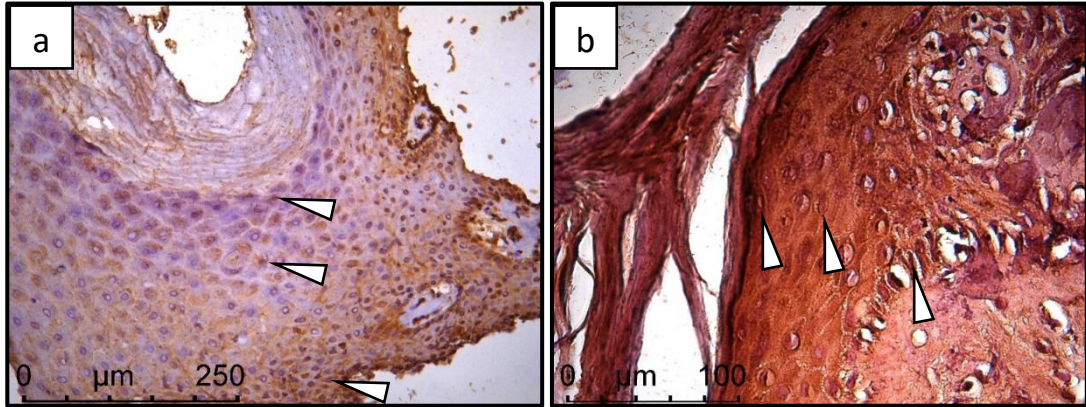
hasta örneğinde sitoplazmik immün reaktivite izlenirken, 10 hasta örneğinde ise stratum granülozum tabakasında immün reaktivite gözlenmedi (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

Epidermiste LS grubunda 9 örnekte tüm tabakalarda bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite izlendi. Stratum bazalede nükleer immün reaktivite 9 hasta örneğinde, stratum spinozumda nükleer immün reaktivite 10 hasta örneğinde, stratum granülozumda nükleer immün reaktivite ise 9 hasta örneğinde görüldü. 1 hasta örneğinde ise hiçbir tabakada nükleer immün reaktivite izlenmedi (Şekil 4.10).

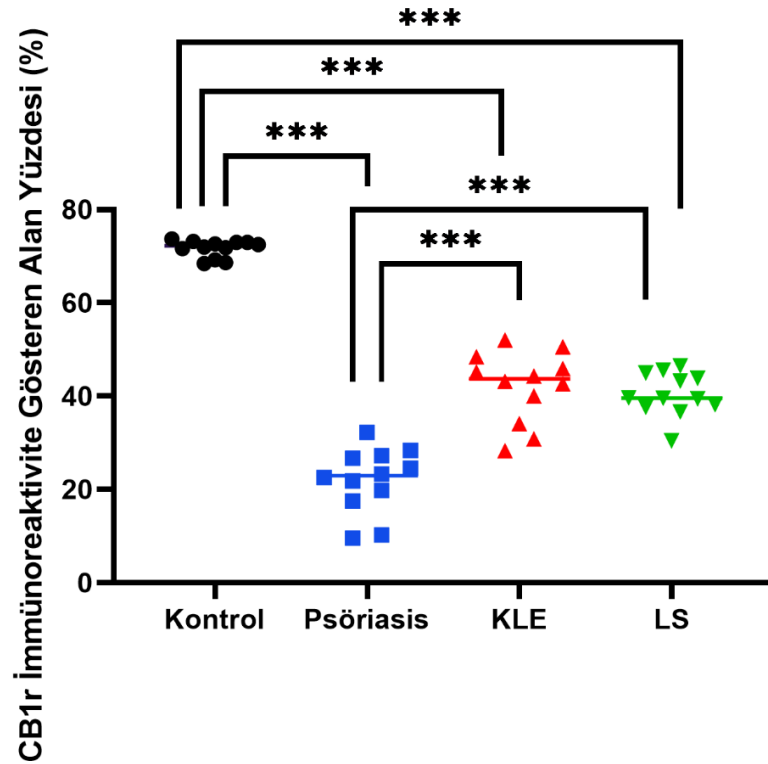
Epidermiste immün reaktivite gösteren alan yüzdesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (Şekil 4.11). İmmün reaktivite şiddeti ise kontrol grubuna göre anlamlı fark göstermedi.



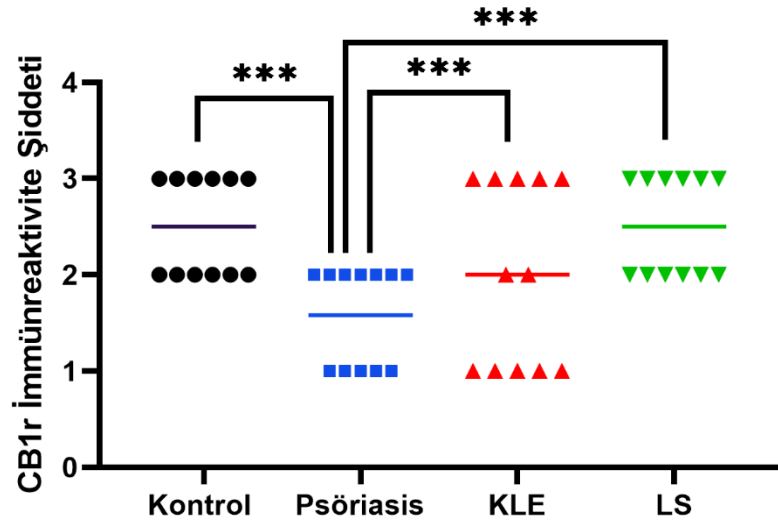
Şekil 4.9. LS grubu örneklerinde epidermiste tabakalarında sitoplazmik ve nükleer CB1r immün reaktivitesi.



Şekil 4.10. LS grubu CB1r immün reaktivitesi; Çoğu örnekte sadece stratum bazale ve stratum spinosumda sitoplazmik immün reaktivite izlenirken (a), 2 örnekte tüm tabakalarda sitoplazmik immün reaktivite mevcuttu (b). Nükleer immün reaktivite olmayan örnekler izlendi. Tüm tabakalarda nükleer immün reaktivite olan örnekler çoğunlukta idi (a,b) . (Δ): Nükleer immün reaktivite. Anti-CB1Rx400.



Şekil 4.11. Epidermiste CB1r immün reaktivite gösteren alan yüzdeleri. Kontrol grubunda immün reaktivite gösteren alan yüzdesi hastalık gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti ($P < 0,001$). Psöriasis grubunda immünreaktivite gösteren alan yüzdesi ise KLE ve LS grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($P < 0,001$).

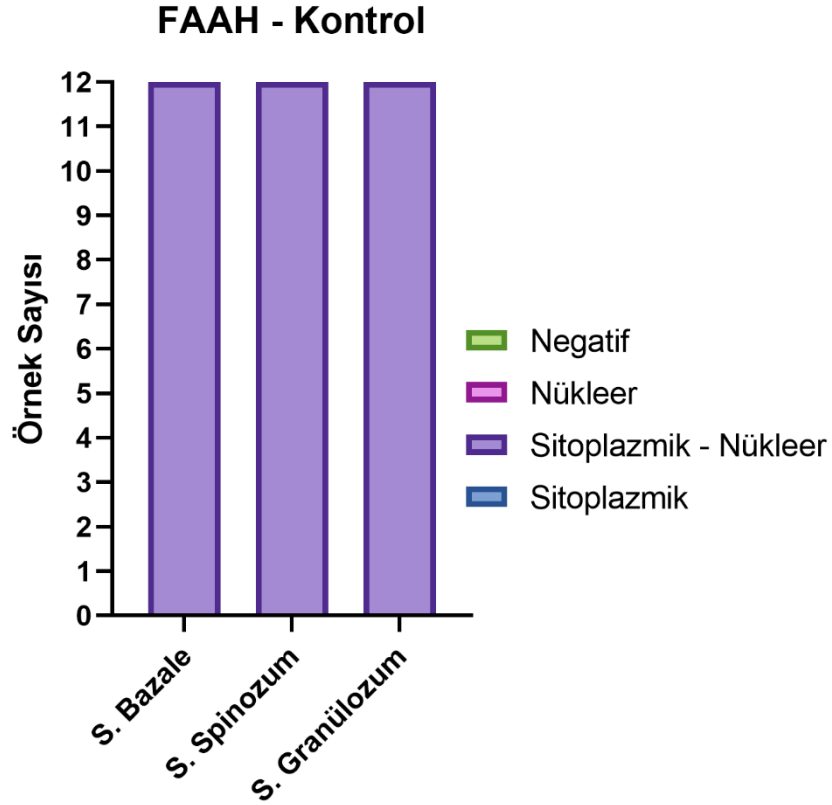


Şekil 4.12. Epidermiste CB1r immün reaktivite şiddeti grafiği. Psöriasis örneklerindeki CB1r immün reaktivite şiddeti diğer gruplara göre anlamlı olarak düşüktü ($P < 0,001$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi.

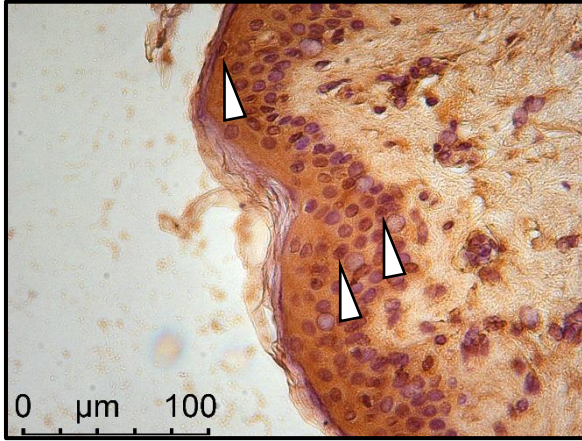
4.2.2 FAAH Enzimi İmmünohistokimyası

Kontrol grubunda; anandamide'in yıkım enzimi olan FAAH tüm epidermiste yaygın ve kuvvetli sitoplazmik immün reaktivite gösterdi.

Epiderminin tüm tabakalarında kuvvetli sitoplazmik ve bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite izlendi (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).



Şekil 4.13. Kontrol grubu örneklerinde epiderminin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer FAAH immün reaktivitesi.

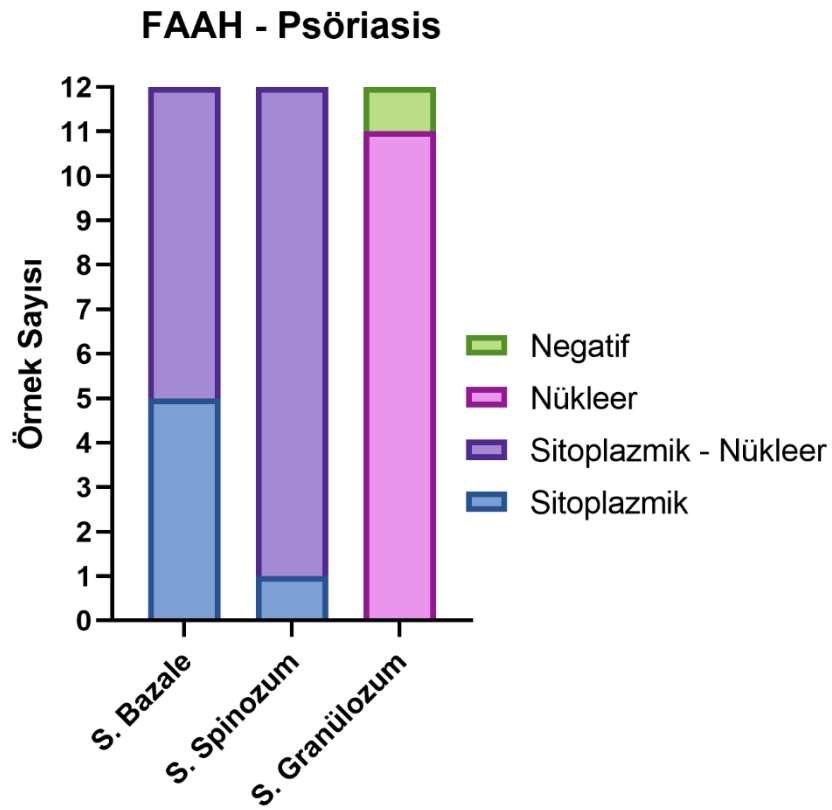


Şekil 4.14. Kontrol grubu FAAH immün reaktivitesi; epiderminin tüm tabakalarında sitoplazmik ve nükleer immün reaktivite izlendi. (Δ): Nükleer immün reaktivite Anti-FAAH x400.

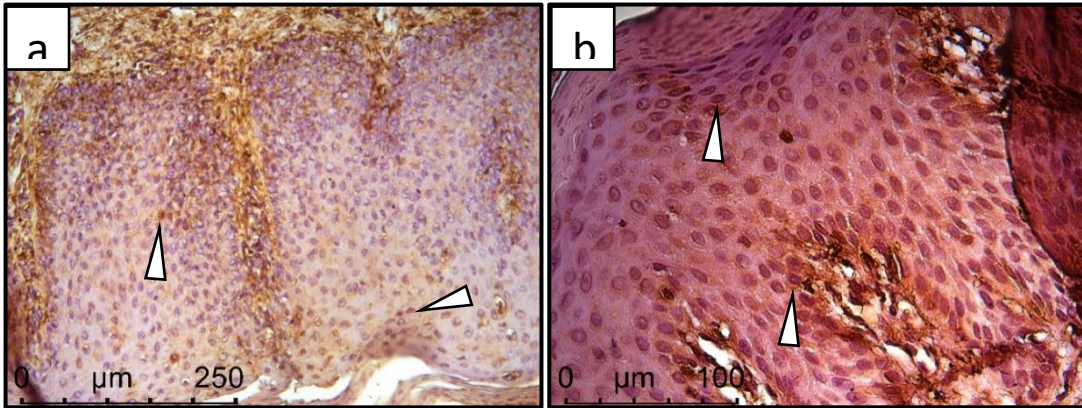
Psöriasis grubunda; stratum bazale ve stratum spinozum tabakasında tüm örneklerde sitoplazmik FAAH immün reaktivitesi izlendi. Stratum granülozum tabakasında örneklerin hiçbirinde sitoplazmik immün reaktivite izlenmedi (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

Epidermiste psöriasis grubunda 6 hasta örneğinde tüm tabakalarda bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite izlendi. Nükleer FAAH immün reaktivitesi stratum bazalede 7 örnekte, stratum spinozumda 11 örnekte, stratum granülozumda 11 örnekte görüldü (Şekil 4.16).

Epidermiste immün reaktivite gösteren alan yüzdesi kontrole göre anlamlı farklılık göstermedi. (Şekil 4.22). İmmün reaktivite şiddeti ise yüzdesi kontrole göre anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.23).



Şekil 4.15. Psöriasis grubu örneklerinde epiderminin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer FAAH immün reaktivitesi.



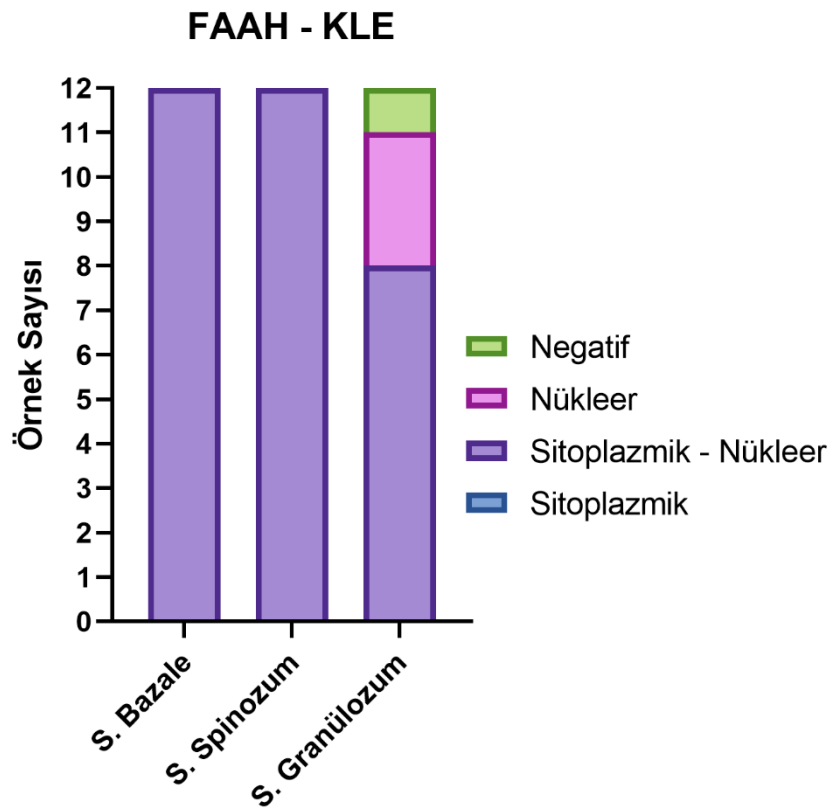
Şekil 4.16. Psöriasis grubu FAAH immün reaktivitesi; stratum bazale ve stratum spinozumda sitoplazmik immün reaktivite izlendi (a,b). Tüm tabakalarda nükleer immün reaktivite, sadece stratum bazale ve stratum spinozumda immün reaktivite (b) ve sadece stratum spinozum ve stratum granülozumda immün reaktivite olan örnekler mevcuttu (a). (Δ): Nükleer immün reaktivite. (a) Anti-FAAH x200, (b) Anti-FAAH x400

KLE grubunda; stratum bazale ve stratum spinozum tabakalarında tüm örneklerde sitoplazmik immün reaktivite izlendi. Stratum granülozum tabakasında 8 örnekte sitoplazmik immün reaktivite izlenirken, 1 örnekte ise çok zayıf olarak

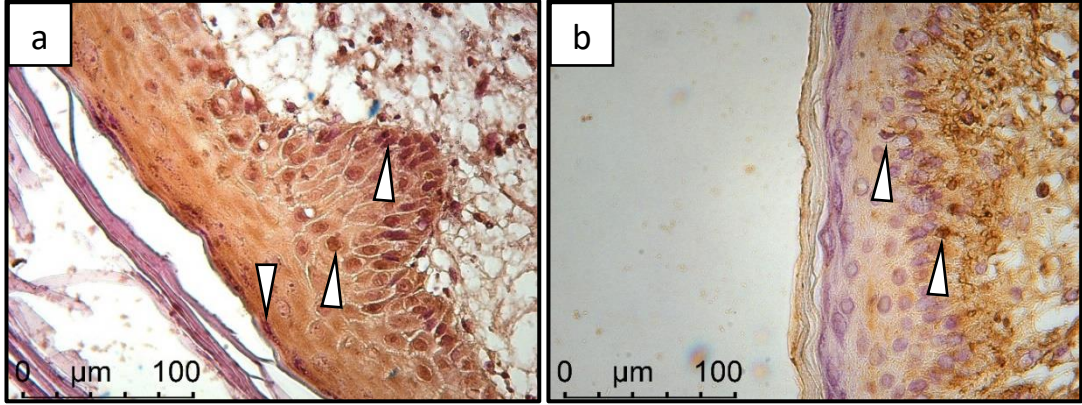
işaretlendiği görüldü. 3 örnekte ise stratum granülozum tabakasında immün reaktivite gözlenmedi (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).

Epiderminin tüm tabakalarında 11 örnekte bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite izlendi, 1 örnekte ise stratum bazale ve stratum spinozumda nükleer immün reaktivite izlendi (Şekil 4.18). Keratin tıkaç bölgelerinde immün reaktivitenin azaldığı dikkati çekti (Şekil 4.17).

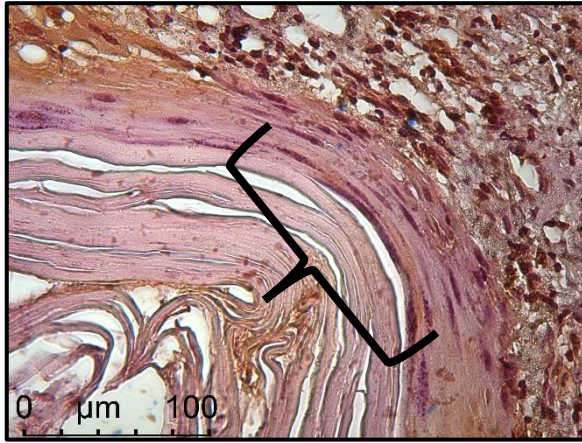
Epidermiste immün reaktivite gösteren alan yüzdesi kontrole göre anlamlı olarak düşük bulundu. (Şekil 4.22). İmmün reaktivite şiddeti ise yüzdesi kontrole göre anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.23).



Şekil 4.17. KLE grubu örneklerinde epiderminin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer FAAH immün reaktivitesi.



Şekil 4.18. KLE grubu FAAH immün reaktivitesi; Örneklerin çoğunda tüm tabakalarda sitoplazmik immün reaktivite varken (a), 3 örnekte sadece stratum bazale ve stratum spinosumda immün reaktivite izlendi (b). 1 örnekte stratum granulozumda nükleer immün reaktivite izlenmezken (b), diğer örneklerde tüm tabakalarda nükleer immün reaktivite mevcuttu(a). (Δ): Nükleer immün reaktivite. Anti-FAAH x400.

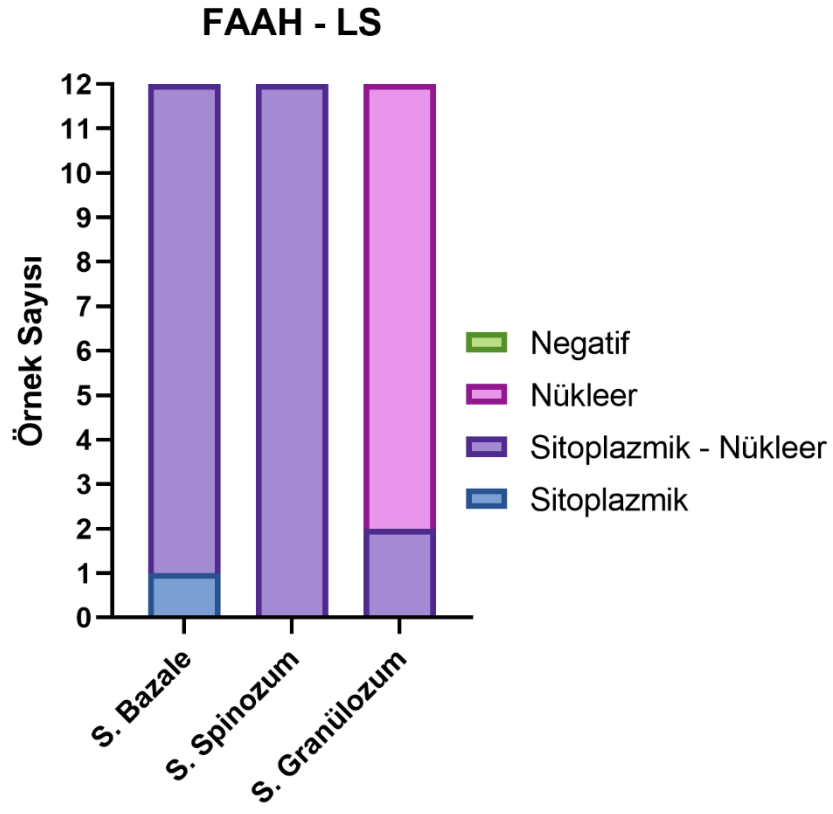


Şekil 4.19. KLE grubu FAAH immün reaktivitesi, keratin tıkaçlarda immün reaktivitenin azaldığı dikkati çekti. Parantez: Keratin tıkaç bölgesi. Anti-FAAH x400.

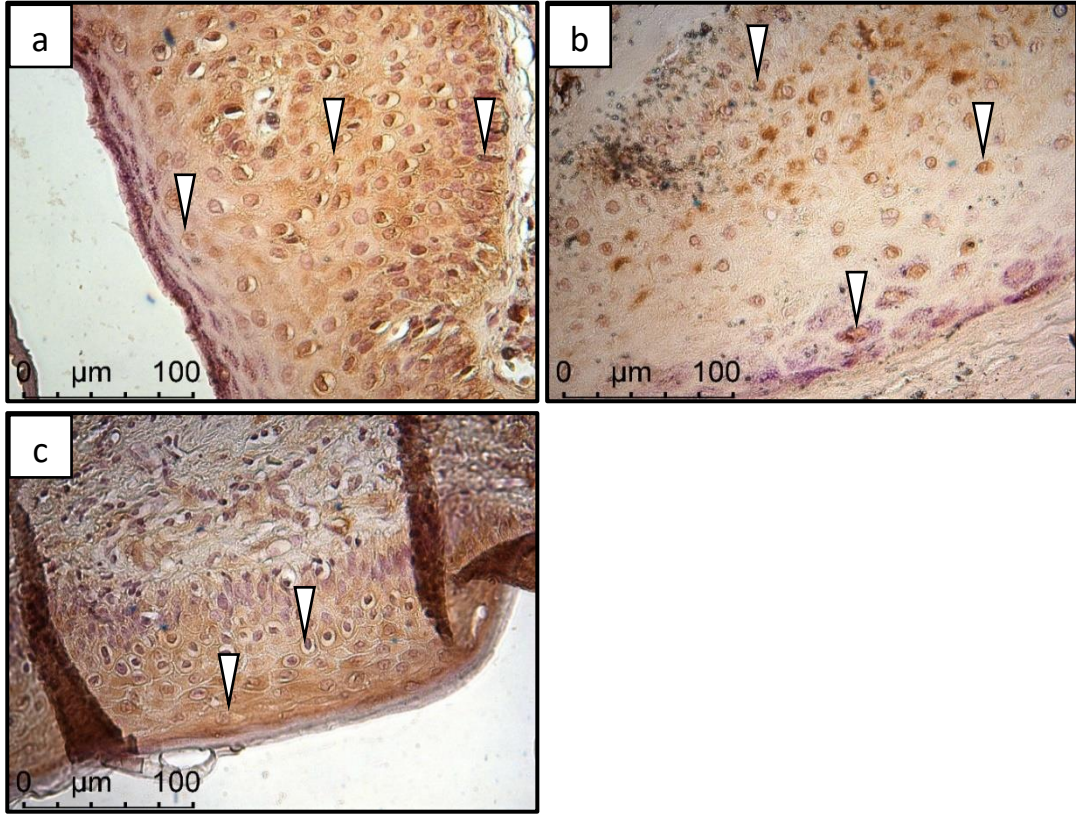
LS grubunda; stratum bazale ve statum spinosum tabakalarında tüm örneklerde sitoplazmik immün reaktivite izlendi. Stratum granulozum tabakasında 2 örnekte sitoplazmik immün reaktivite izlenirken, 2 örnekte çok zayıf imunoreaktivite saptandı. 8 örnekte ise stratum granulozum tabakasında immün reaktivite gözlenmedi (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21).

Epidermiste LS grubunda örneklerde stratum spinosum ve stratum granulozum tabakalarında bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite izlenirken, stratum bazalede nükleer immün reaktivite 11 örnekte görüldü (Şekil 4.21).

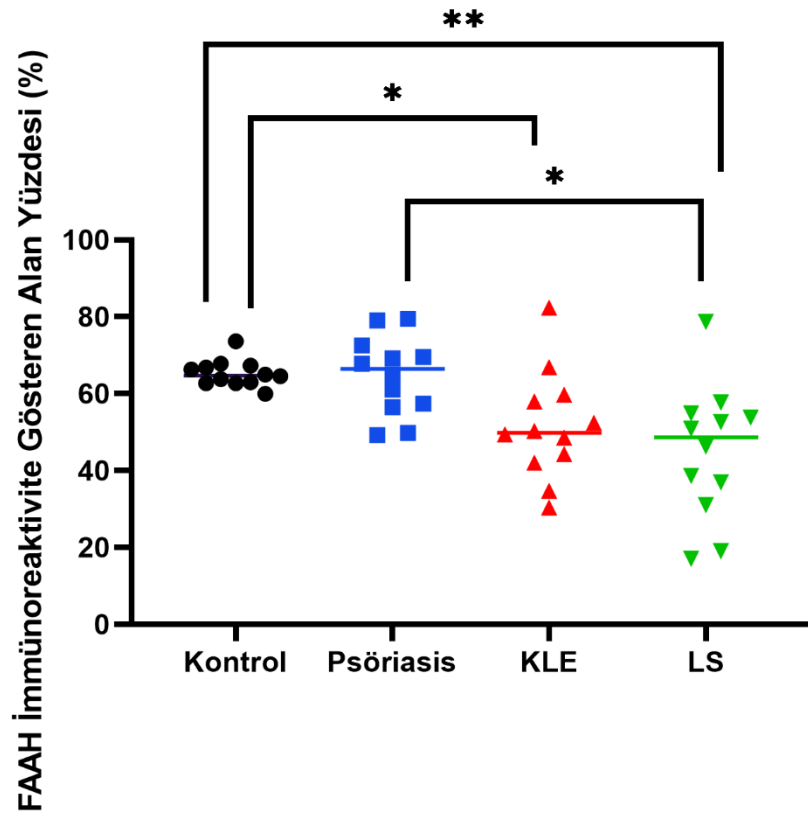
Epidermiste immün reaktivite gösteren alan yüzdesi kontrole göre anlamlı olarak düşük bulundu. (Şekil 4.22). İmmün reaktivite şiddeti ise diğer üç gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,001$) (Şekil 4.23)



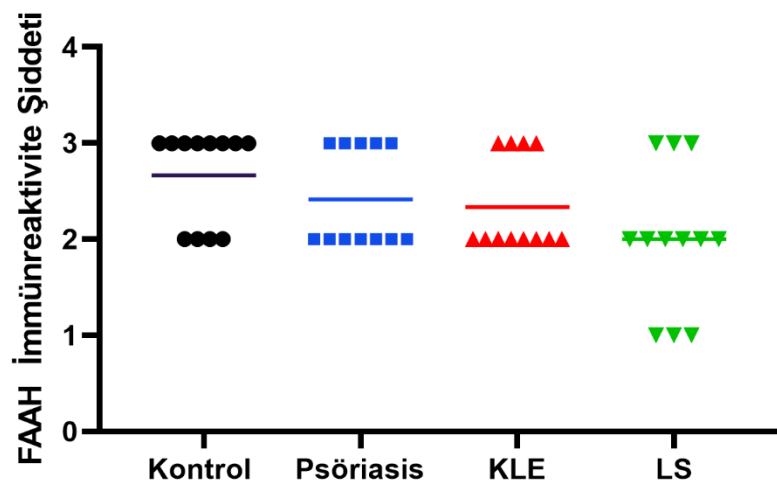
Şekil 4.20. LS grubu örneklerinde epiderminin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer FAAH immün reaktivitesi.



Şekil 4.21. LS grubu FAAH immün reaktivitesi; Örneklerin çoğunda stratum bazale ve stratum spinosumda sitoplazmik immün reaktivite vardı (a,b), 4 örnekte tüm tabakalarda immün reaktivite izlendi (c). 1 örnekte stratum bazalede nükleer immün reaktivite izlenmezken (c), diğer örneklerde tüm tabakalarda nükleer immün reaktivite mevcuttu(a,b). (Δ): Nükleer immün reaktivite. Anti-FAAH x400.



Şekil 4.22. Epidermiste FAAH enzimi immün reaktivite gösteren alan yüzdeleri. Kontrol grubunda immün reaktivite gösteren alan yüzdesi KLE ve LS gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti ($P = 0,026$, $P = 0,009$). Kontrol ve psöriasis grubunda ise anlamlı fark bulunmadı ($P = 0,995$) Psöriasis grubunda immünreaktivite gösteren alan yüzdesi ise LS grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($P < 0,016$).



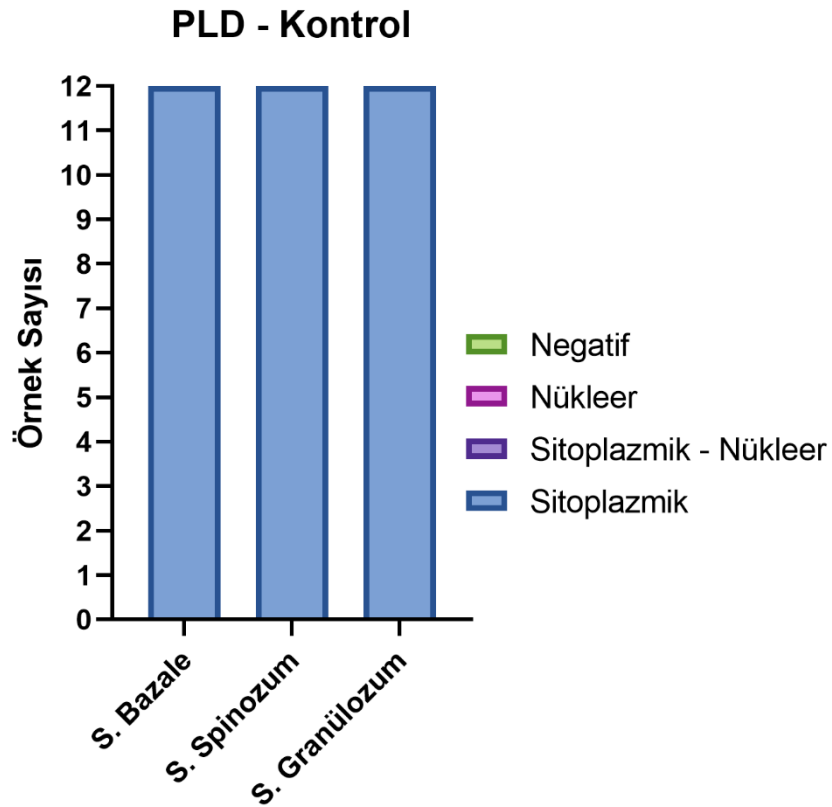
Şekil 4.23. Epidermiste FAAH enzimi immün reaktivite şiddeti grafiği. Gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi.

4.2.3 PLD Enzimi İmmünohistokimyası

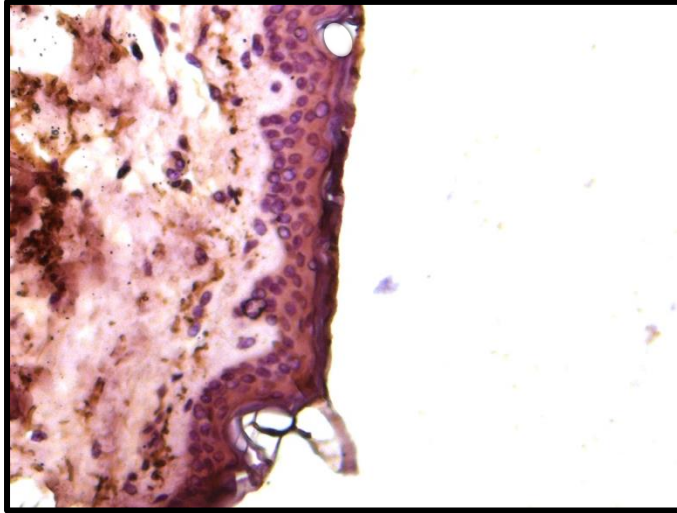
Kontrol grubunda; Anandamide'in yapım enzimi olan PLD enzimi tüm epidermiste yaygın ve zayıf/orta kuvvette sitoplazmik immün reaktivite gösterdi.

Epidermiste kontrol grubunda tüm tabakalarda zayıf/orta kuvvette sitoplazmik immün reaktivite izlendi (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).

Epidermiste kontrol grubunda hiçbir örnekte nükleer immün reaktivite izlenmedi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Kontrol grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer PLD immün reaktivitesi.

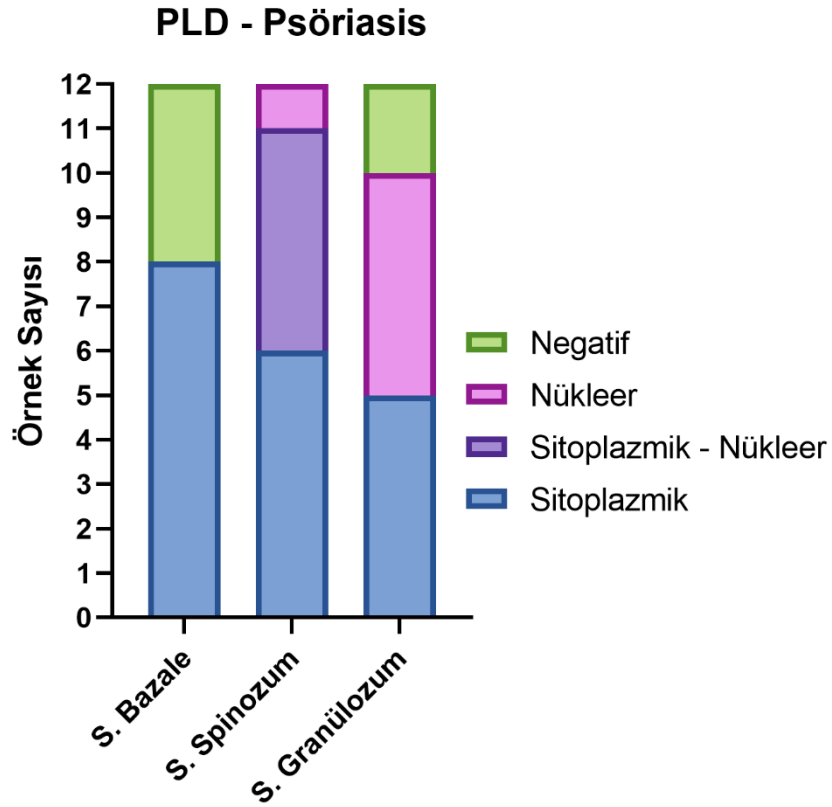


Şekil 4.25. Kontrol grubu PLD immün reaktivitesi; epidermisin tüm tabakalarında sitoplazmik immün reaktivite izlendi. Nükleer immün reaktivite görülmedi. Anti-PLD x400.

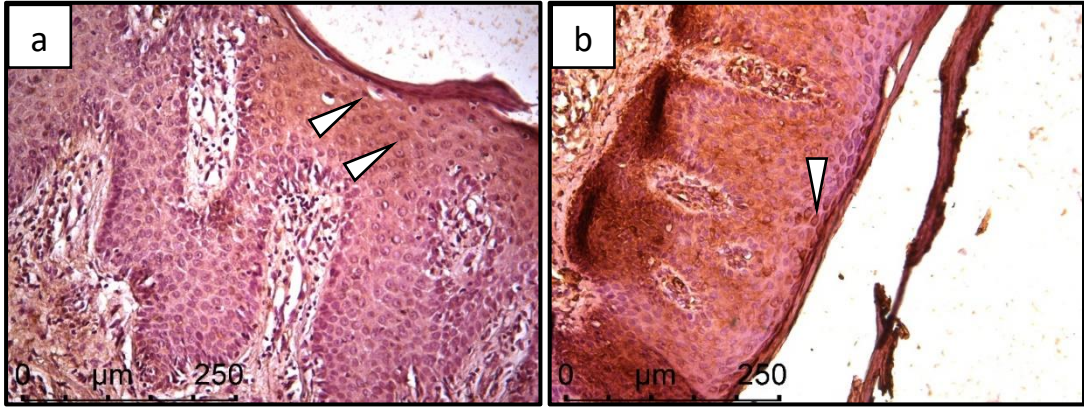
Psöriasis grubunda; stratum bazalede 8 örnekte sitoplazmik immün reaktivite gözlenirken, 4 örnekte sitoplazmik immün reaktivite gözlenmedi. Stratum spinosum tabakasında 1 tanesinde zayıf olmak üzere tüm örneklerde sitoplazmik immün reaktivite izlendi. Stratum granülozum tabakasında 5 örnekte sitoplazmik immün reaktivite izlenirken, 7 örnekte ise stratum granülozum tabakasında immün reaktivite gözlenmedi (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27).

Epidermiste psöriasis grubunda, stratum spinosumda 6 örnekte bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite, stratum granülozumda 4 örnekte nükleer immün reaktivite görüldü. 5 örnekte ise hiçbir tabakada nükleer immün reaktivite izlenmedi (Şekil 4.27).

Epidermiste immün reaktivite gösteren alan yüzdesi kontrole göre anlamlı olarak düşük bulundu. (Şekil 4.33). İmmün reaktivite şiddeti ise yüzdesi kontrole göre anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.34).



Şekil 4.26. Psöriasis grubu örneklerinde epiderminin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer PLD immün reaktivitesi.



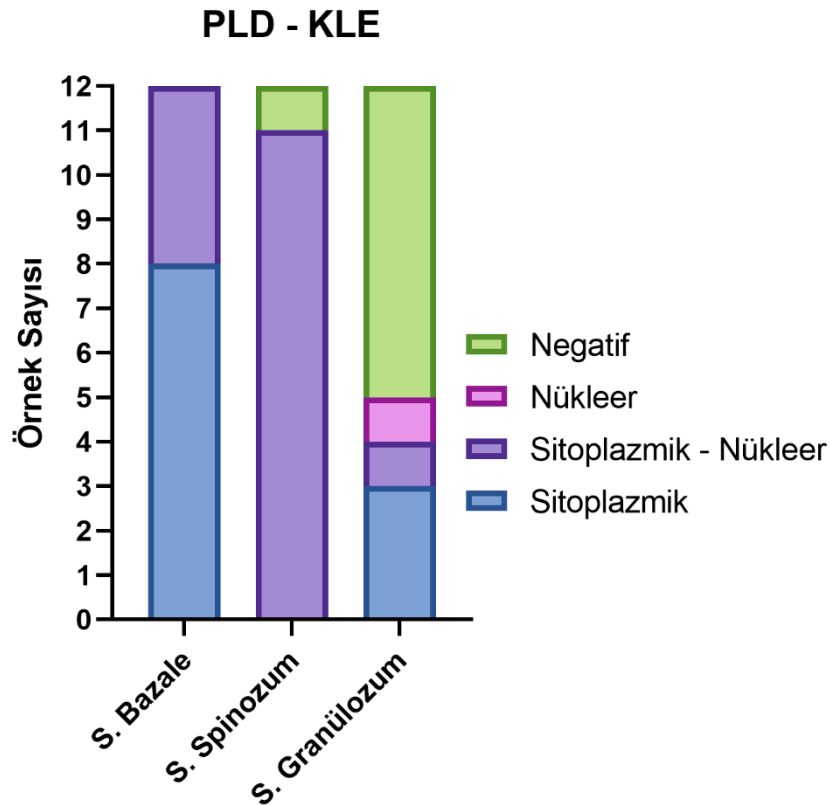
Şekil 4.27. Psöriasis grubu PLD immün reaktivitesi; stratum spinosum ve stratum granülozumda sitoplazmik immün reaktivite (a) ve stratum bazale ile stratum spinosumda sitoplazmik immün reaktivite (b) gösteren örnekler. Stratum bazalede nükleer immün reaktivite hiçbir örnekte yoktu. Sadece stratum granülozumda nükleer immün reaktivite gösteren örneklerin yanında (b) hem stratum spinosum hem de stratum granülozumda immün reaktivite izlenen örnekler vardı (b). (Δ): Nükleer immün reaktivite. Anti-PLD x200.

KLE grubunda; stratum bazalede tüm örneklerde sitoplazmik immün reaktivite izlendi. Stratum spinosum tabakasında 11 örnekte sitoplazmik immün

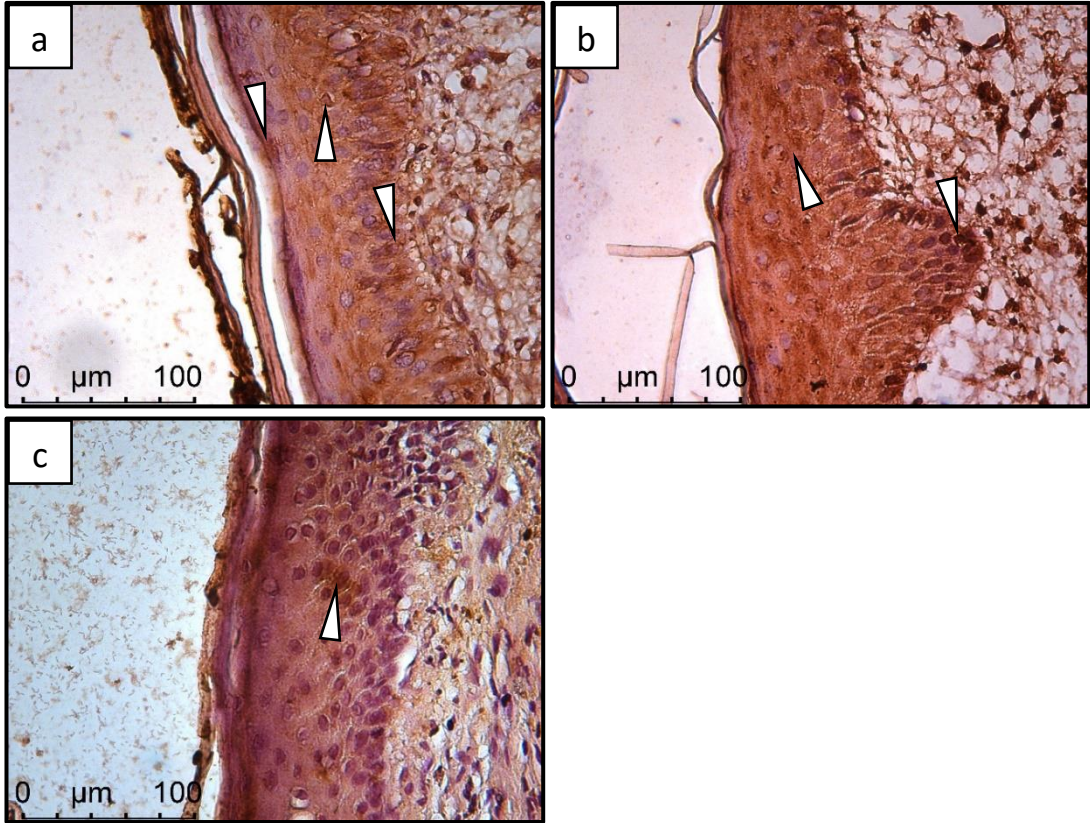
reaktivite izlenirken, 1 örnekte sitoplazmik immün reaktivite izlenmedi. Stratum granülozum tabakasında 4 örnekte sitoplazmik immün reaktivite izlenirken, 8 örnekte stratum granülozum tabakasında immün reaktivite gözlenmedi (Şekil 4.28 ve Şekil 4.29)

Epidermiste KLE grubunda 2 örnekte tüm tabakalarda bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite izlendi. Stratum bazalede nükleer immün reaktivite 4 örnekte, stratum spinozumda nükleer immün reaktivite 11 örnekte, stratum granülozumda nükleer immün reaktivite ise 2 örnekte izlendi. 1 örnekte ise hiçbir tabakada nükleer immün reaktivite izlenmedi (Şekil 4.29). Keratin tıkaç bölgelerinde immün reaktivitenin azaldığı izlendi (Şekil 4.30).

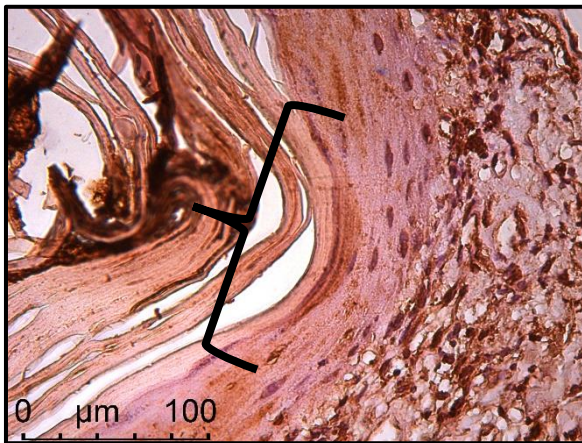
Epidermiste immün reaktivite gösteren alan yüzdesi kontrole göre anlamlı olarak düşük bulundu. (Şekil 4.33). İmmün reaktivite şiddeti ise yüzdesi kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4.34).



Şekil 4.28. KLE grubu örneklerinde epidermisin tabakalarında sitoplazmik ve nükleer PLD immün reaktivitesi.



Şekil 4.29. KLE grubu PLD immün reaktivitesi; Tüm örneklerde stratum spinosum ve stratum bazalede sitoplazmik immün reaktivite izlenen örnekler mevcutken (a,b,c), stratum granülozunda da sitoplazmik immün reaktivite izlenen örnek sayısı 4 idi (b,c).Sadece stratum spinosumda (b), stratum spinosum ve stratum bazalede (a,b) ve tüm tabakalarda nükleer immün reaktivite izlenen örnekler mevcuttu (a). (Δ): Nükleer immün reaktivite. Anti-PLD x400.

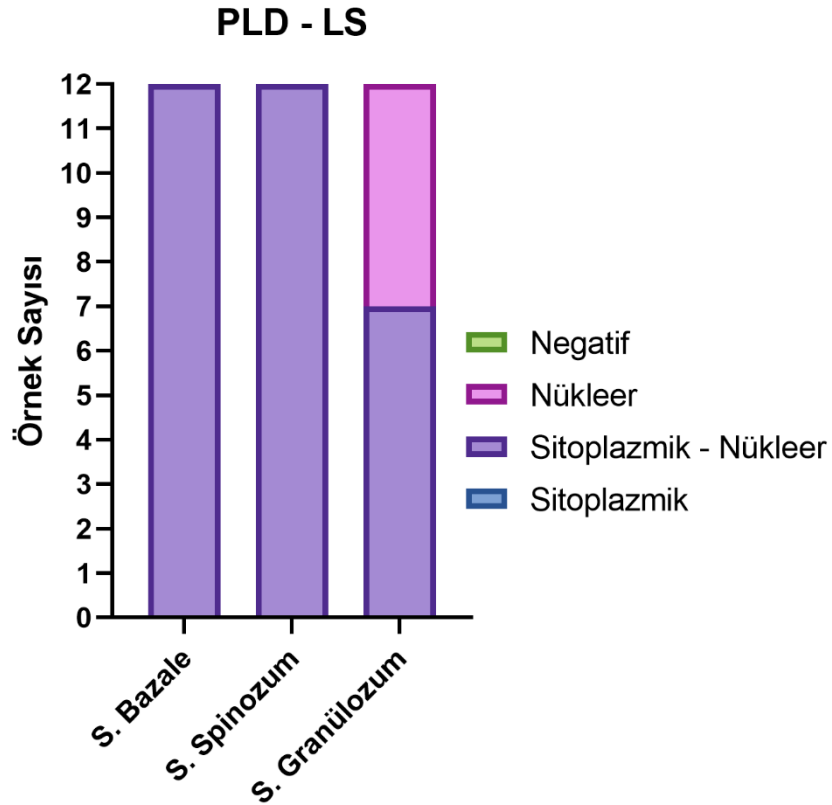


Şekil 4.30. KLE grubu PLD immün reaktivitesi, keratin tıkaçlarda immün reaktivitenin azaldığı izlendi. Anti-PLD x400.

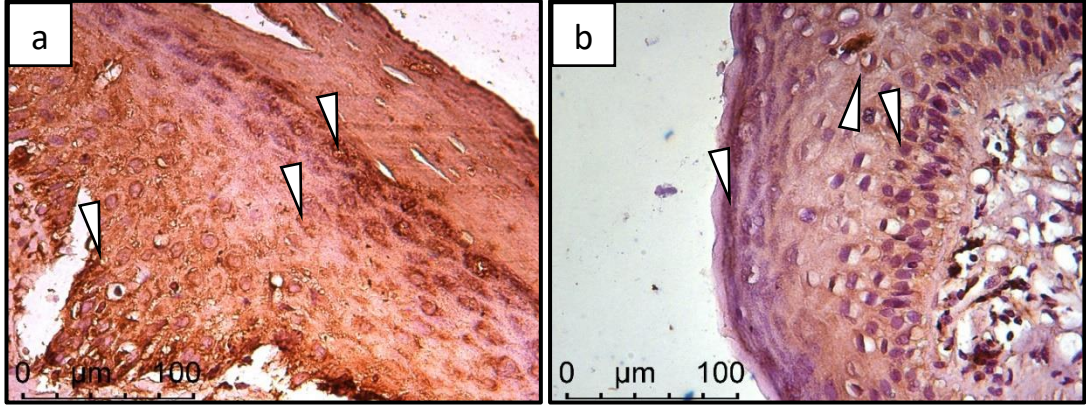
LS grubu; stratum bazale ve statum spinozum tabakalarında tüm örneklerde sitoplazmik immün reaktivite izlendi. Stratum granülozum tabakasında 7 örnekte sitoplazmik immün reaktivite izlenirken, 5 örnekte ise stratum granülozum tabakasında immün reaktivite gözlenmedi (Şekil 4.31 ve 4.32).

Epidermiste LS grubunda tüm örneklerde tüm tabakalarda bazı hücrelerde nükleer immün reaktivite izlendi (Şekil 4.32).

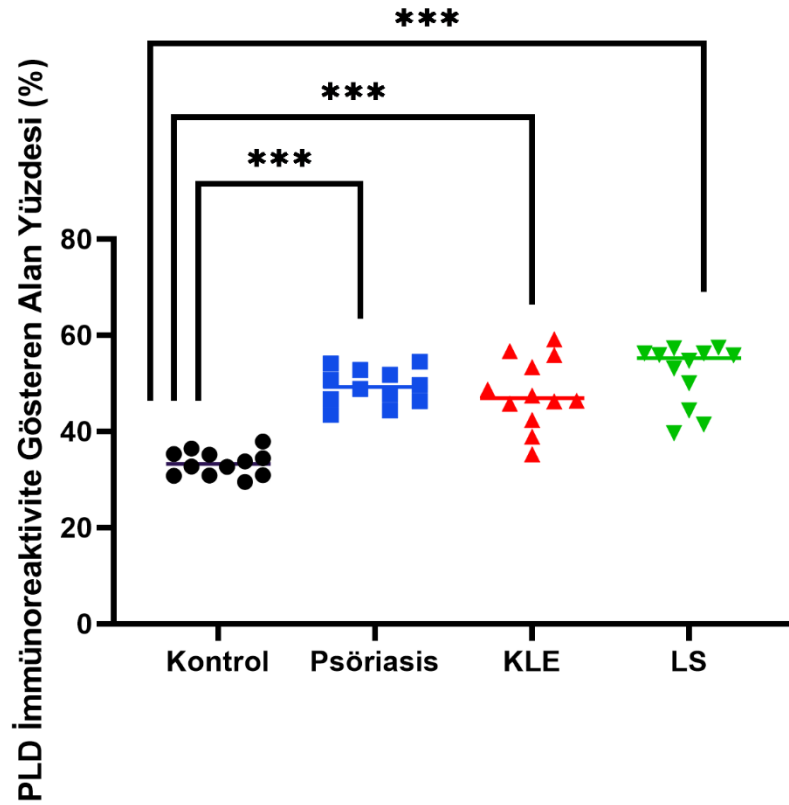
Epidermiste immün reaktivite gösteren alan yüzdesi kontrole göre anlamlı olarak düşük bulundu. (Şekil 4.33). İmmün reaktivite şiddeti ise yüzdesi kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4.34).



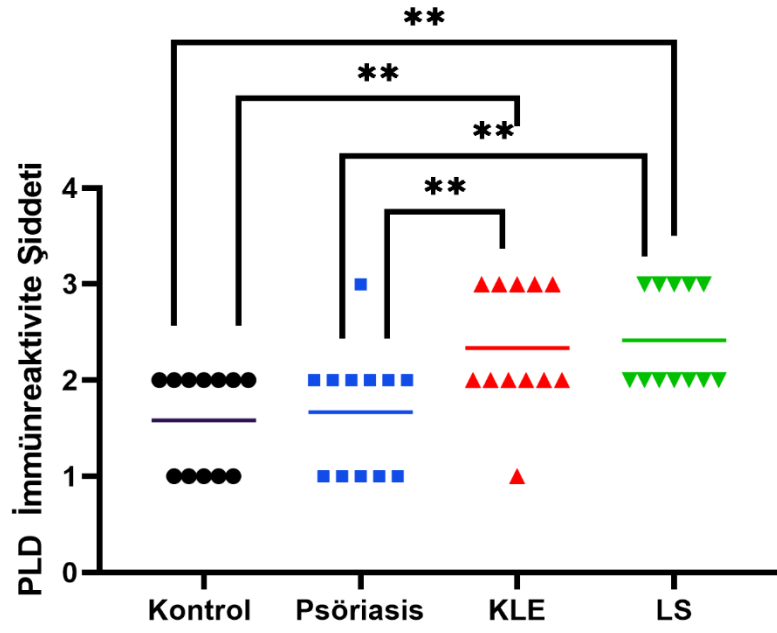
Şekil 4.31. LS grubu örneklerinde epidermiste tabakalarında sitoplazmik ve nükleer PLD immün reaktivitesi.



Şekil 4.32. LS grubu PLD immün reaktivitesi; bazı örneklerde tüm tabakalarda sitoplazmik immün reaktivite izlenirken (a), sadece stratum spinosum ve stratum bazalede sitoplazmik immün reaktivite olan örnekler de vardı (b). Örneklerin hepsinde tüm tabakalarda nükleer immün reaktivite izlendi. (Δ): Nükleer immün reaktivite. Anti-PLD x400.



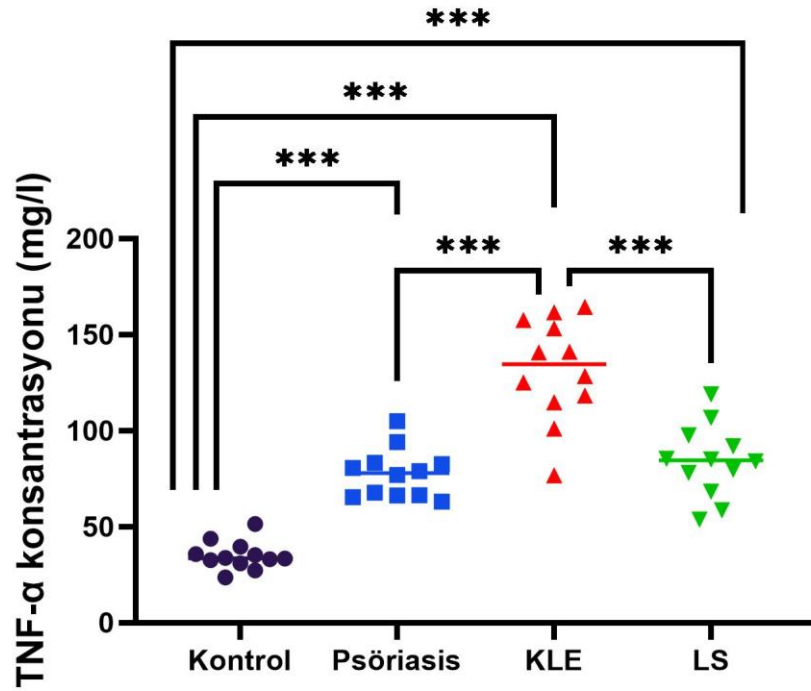
Şekil 4.33. Epidermiste PLD enzimi immün reaktivite gösteren alan yüzdeleri. Kontrol grubunda immün reaktivite gösteren alan yüzdesi diğer üç gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,001$). Diğer üç grup arasında anlamlı fark izlenmedi.



Şekil 4.34. Epidermiste PLD immün reaktivite şiddeti grafiği. İmmün reaktivite şiddeti kontrol grubu ve psöriasis grubu, KLE ve LS gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0,003$).

4.3. TNF- α Konsantrasyonu

TNF- α konsantrasyonu tüm hasta gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek çıktı ($P<0,001$). KLE örneklerinde TNF- α konsantrasyonu, psöriasis ve LS örneklerine göre anlamlı olarak yüksekti ($P<0,001$).



Şekil 4.35. Örneklerin TNF- α konsantrasyonları.

4.4 Örneklerde Hiperkeratoz Değerlendirilmesi

12 psöriasis örneğinin 11 tanesinde parakeratotik, 1 tanesinde ise ortokeratotik hiperkeratoz izlendi. KLE örneklerinde 1 parakeratotik hiperkeratoz izlenirken, diğer 11 örnekte ortokeratotik hiperkeratoz izlendi. LS örneklerinin hepsinde ortokeratotik hiperkeratoz mevcuttu, parakeratoz izlenmedi.

5. TARTIŞMA

Endokannabinoid sistemi, vücutta oldukça yaygın bir şekilde psikolojik, metabolik ve immünolojik etkileri olan bir sistemdir (1). Epidermiste ise keratinosit farklanması, apoptozu, proliferasyonu, derideki inflamatuvar süreçlerin yönetilmesi gibi görevleri bulunmaktadır (2-4). Bu görevlerde en etkili olan endokannabinoid sistemi elemanları ise CB1/2 reseptörleri ve AEA, 2-AG ligandlarıdır (2, 3). AEA'nın yapım enzimlerinden birisi PLD yıkım enzimlerinden en önemlisi ise FAAH'dır (5). Endokannabinoid sistemi inflamatuvar süreçlerin yönettiği, keratinosit farklanması ve proliferasyonunu düzenlediği için hiperkeratoz görülen otoinflamatuvar deri hastalıkları için potansiyel bir hedeftir. Bu sebepler ile bu tez çalışmasında Türkiye'de sık rastlanan hiperkeratoz görülen otoinflamatuvar deri hastalıkları listelenmiş ve içlerinden psöriasis, KLE ve LS seçilmiştir. Bu hastalıkların seçilmesinin sebebi Türkiye'de sık görülmelerinin yanında kesin bir tedavilerinin olmayışı, etiyojilerinin kesin bilinmemesidir. Bunun yanında psöriaside daha önce endokannabinoid sisteminin çalışılmış ve topikal tedavi yöntemlerinin denenmiş olmasına rağmen (9, 10) anandamide'in yapım enzimi olan PLD hiç çalışılmamış, KLE ve LS'de ise endokannabinoid sisteme dair hiç çalışma yapılmamış olması da bu hastalıkların seçilmesi için bir sebep olmuştur.

Bu tez çalışması kapsamında; hiperkeratoz ile giden otoinflamatuvar hastalıklar olan psöriasis, KLE ve LE deri biyopsilerinde, inflamasyonu göstermek amacıyla TNF- α miktarı ölçülmüş, ardından epidermisteki CB1r, anandamide'in yıkım enzimi olan FAAH enzimi ve yapım enzimi olan PLD enziminin immün reaktivitesine bakılmış, immün reaktivite şiddeti ölçülmüş ve sağlıklı deri örnekleri ile karşılaştırılmıştır. İmmün reaktivite saptanan alanların ve immün reaktivite şiddetlerinin sağlıklı dokuya göre anlamlı farklılık gösterilmesi ile endokannabinoid sisteminin bu hastalıkların patofizyolojileri ile ilgili olabileceği ortaya koyulmuştur.

Endokannabinoid sisteminin deride anti-inflamatuvar etkisinin varlığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (2, 45). CB1r'nin AEA veya başka bir ligand ile aktive olması o bölgedeki inflamasyonu baskılamaktadır (61). TNF- α 'nın inflamasyonu tetiklerken aynı zamanda AEA üretimini arttırdığı fareler üzerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (62). TNF- α 'nın CB1r sayısını da arttırdığı multiple skleroz hastalarının periferik kan örneklerinde yapılan çalışmada gösterilmiştir (63). Bir diğer

çalışmada ise nöral kök hücre kültüründe TNF- α reseptörlerinin aktivasyonunun 2-AG sentezini arttırarak, aynı hücre üzerinde CB1r üzerinden otokrin etki gösterdiğini bulmuşlardır (64). Yapılan bu tez çalışmasında kontrol grubunda her tabakada mevcut olan CB1r immün reaktivitesinin psöriasis hasta örneklerinde stratum spinozumda 5 örnekte, stratum granülozumda ise 8 örnekte kaybolduğu gösterilmiştir. İmmün reaktivite şiddeti ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulunmuştur. KLE hasta örneklerinde stratum spinozumda 3, stratum granülozumda 7 örnekte CB1r immün reaktivitesi kaybolmuştur. LS hasta örneklerinde ise stratum granülozumda 2 örnekte CB1r immün reaktivitesi tamamen kaybolurken, 8 örnekte ise sitoplazmik immün reaktivite kaybolmuştur. Bunların yanında immün reaktivite gösteren alan yüzdesinin üç hastalıkta da sağlıklı dokuya göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. CB1r immün reaktivitesindeki azalma KLE ve LS'de ilk defa gösterildi. CB1r immün reaktivitesindeki azalmanın yanı sıra üç hastalık grubunda da inflamasyon göstergesi olan TNF- α 'nın arttığı gösterilmiştir. Sonuç olarak bu hastalıklarda CB1r'nin azalmasıyla endokannabinoid sisteminin anti-inflamatuvar etkisinin azaldığı ve bu üç hastalığın etiolojisinden sorumlu tutulan tetikleyicilerin TNF- α miktarını arttırması ile başlayan inflamasyonun kontrol altına alınamadığı kanaatine varıldı.

Stratum korneum, keratinositlerin farklanarak matürasyonu sırasında çekirdeğini ve organellerini kaybetmiş keratinositlerden oluşmaktadır. Bu tabakanın kalınlaşması hiperkeratoz olarak isimlendirilir. (65). Sağlıklı dokuda CB1r'nin stratum spinozum ve stratum granülozumda arttığı bilinmektedir ve bu sebeple CB1r'nin farklanmada görevli olduğu düşünülmektedir (6). Yapılan iki boyutlu kültür çalışmalarında CB1r'nin az miktardaki ligand ile aktivasyonunun keratinositlerin farklanmasını baskıladığı gösterilmiştir (9, 66). Bunun yanı sıra insan keratinosit hücre hattında (HaCaT), insan primer keratinosit kültüründe ve insan deri organ kültüründe yapılan çalışmalarda; CB1r'nin daha yüksek dozlarda ligand ile aktivasyonunda ise keratinositlerde proliferasyonunun baskılandığı ve apoptozun arttığı gösterilmiştir (67-69). Çalışmamız kapsamındaki hiperkeratoz görülen bu üç hastalıkta CB1r immün reaktivitesinin özellikle stratum spinozum ve stratum granülozum tabakalarında azalması bize keratinosit farklanmasının bozularak terminal farklanma (70) olarak da

isimlendirilen keratinizasyonun bozulduğunu ve hiperkeratoza sebep olduğunu düşündürmektedir.

Hiperkeratoz iki alt başlıkta incelenir; ortokeratoz keratin tabakasının keratinosit matürasyonunun bozulmadan kalınlaşması, parakeratoz ise matürasyonun bozulmasıyla keratin tabakasına çekirdeklerini kaybetmeden geçmesidir (65). Yapılan bu tez çalışmasında CB1r immün reaktivite şiddeti, psöriasis grubunda en az, KLE grubunda psöriasis grubuna göre anlamlı olarak daha yüksektir. LS grubunda ise psöriasis ve KLE gruplarına göre immün reaktivite şiddeti en yüksektir. Hiperkeratoz değerlendirildiğinde ise psöriasis grubunda 11 örnekte, KLE grubunda ise 1 örnekte parakeratoz saptandı. LS grubunda ise parakeratoz izlenmedi. CB1r immün reaktivitesinin gözlemlendiği alan yüzdesi ve CB1r immün reaktivite şiddetinin diğer hastalıklara göre daha düşük olduğu psöriasis grubunda parakeratoz izlenmesi; CB1r aktivasyonunun azalmasının keratinosit farklanmasını daha da bozarak matürasyonunu engellediği ve parakeratoza yol açtığını düşündürmektedir.

Psöriasis hiperkeratotik plaklarla karakterize, inflamatuvar kronik bir deri hastalığıdır (7). Histopatolojisinde inflamatuvar infiltrasyonlar, hiperkeratoz, damarlanma artışı, Munro'nun mikroabseleri ve rete kenarlarının uzaması bulunmaktadır (3, 7, 71). Rete kenarları deride dermis ve epidermis arasındaki dalgalı şekilde bulunan mikroyapılardır (72). Psöriaste IL-17 artışının epitel hücrelerinin aşırı proliferasyonu ile rete kenarlarındaki uzamaya sebep olduğu bildirilmektedir (7). Çalışmamızdaki psöriasis grubu incelendiğinde stratum bazaledeki CB1r immün reaktivitesinin uzayan rete kenarlarına ait olan kısımlarda azaldığı saptandı. Önceki çalışmalarda CB1r reseptörünün aktivasyonunun deri organ kültürü ortamında ve HaCaT hücre hattı kültüründe keratinosit proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (9, 64). Psöriaste stratum bazalede CB1r immün reaktivitesinin azalmasının o bölgelerde keratinositlerde aşırı proliferasyona neden olarak psöriasteki tipik histopatolojik bulgu olan rete kenarlarında uzamaya sebep olduğunu düşündürmektedir.

Anandamide yağ asidi yapısında bir nörotransmitterdir ve endokannabinoid sisteminin ilk keşfedilen, en çok çalışılan nörotransmitteridir (39, 44). Anandamide sentez yollarında en aktif olan enzim PLD, yıkımında en aktif olan enzim ise FAAH'dır (5, 47). Yapılan çalışmalarda sıçanlara intraperitoneal lipopolisakkarit

enjeksiyonu yapılarak TNF- α miktarı arttırıldığında AEA sentezinin arttığı gösterilmiştir (73). Başka bir çalışmada ise sıçanlara direk TNF- α enjeksiyonu yapıldığında yine AEA sentezininin arttığı gösterilmiştir (62). Psöriasisli hastalarda yapılan bir çalışmada ise hastaların kanında AEA miktarının arttığı bulunmuştur (9). Çalışmamızda; AEA yapım enzimi PLD immün reaktivitesi kontrol grubunda epidermisin her tabakasında izlenirken psöriasis hasta örneklerinde stratum bazalede 4, stratum granülozumda ise 2 örnekte olmadığı saptandı. KLE hasta örneklerinde ise stratum spinozumda 1, stratum granülozumda 7 örnekte PLD immün reaktivitesi gözlemlendi. LS hasta örneklerinde ise kontrol grubuna benzer şekilde epidermisin tüm tabakalarında PLD immün reaktivitesi saptandı. PLD immün reaktivitesi gözlenen alan yüzdesi hastalık gruplarının hepsinde sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda artış göstermiştir. PLD immün reaktivite şiddeti ise KLE ve LS’de kontrole göre anlamlı şekilde artmıştır. Psöriasisiste ise PLD immün reaktivite şiddeti kontrole göre anlamlı olarak değişmemiştir. FAAH immün reaktivitesi incelendiğinde ise kontrol grubunda her tabakada izlenen immün reaktivitenin, psöriasis hasta grubunda ve KLE hasta grubunda stratum granülozum tabakasında 1’er örnekte olmadığı görülmüştür. İmmün reaktivite gösteren alan yüzdesinin KLE ve LS gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptandı. İmmün reaktivite sonuçları değerlendirildiğinde hastalık gruplarında epidermiste AEA’nın yapım enzimi olan PLD’nin arttığı, yıkım enzimi olan FAAH’ın ise azaldığı söylenebilir. Bu bulgular ışığında hastalık gruplarında artan inflamasyona bağlı olarak AEA sentezini arttırmak için PLD miktarının arttığı ve yıkımı azaltmak için FAAH enziminin miktarının azaldığı ancak CB1r miktarı azalmış olduğundan inflamasyonun baskılanamadığı sonucuna varılmıştır. KLE ve LS’de FAAH ve PLD enzimlerinin varlığı ve dağılımı ilk defa çalışılmıştır. Psöriasisiste ise epidermiste PLD enziminin artışı ilk defa gösterilmiştir.

Keratinizasyon, keratinositlerde meydana gelen ardışık sitoplazmik olaylar sonucu keratinositin epidermisin tabakaları arasında ilerleyerek korneositlere farklanmasıdır (22). Keratinositler stratum bazaleden stratum korneuma doğru biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere uğrar ve farklanma miktarı artar (25, 74). Çalışmamızdaki hastalık gruplarında hiperkeratozun varlığı ve CB1r miktarında azalma olması, bu hastalıklarda keratinosit farklanmasında sorun olduğunu

düşündürmektedir. Sağlıklı insan derisinde, HaCaT ve NHEK hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, keratinosit farklanması arttıkça hücrede bulunan FAAH enzimi miktarının arttığı gösterilmiştir (75). Çalışmamızda kontrol grubunda stratum granülozumda görülen sitoplazmik FAAH immün reaktivitesinin, psöriasisde tüm örneklerde, LS'de 10 örnekte, KLE'de ise 4 örnekte olmadığı görülmüştür. Önceki çalışmalarda keratinosit farklanmasında arttığı gösterilmiş olan FAAH enziminin, hastalık gruplarında stratum granülozumda azalmış olması keratinosit farklanmasında sorun olduğunu düşündürmektedir.

Kutanöz lupus eritematozusta dermal ödem, hiperkeratoz, inflamatuvar infiltratlar ve keratin tıkaçlar görülür (11, 76). Keratin tıkaç, kıl follikülünden kılın çıkışının çıkış bölgesinde keratin birikimi nedeniyle engellenmesidir. Keratin tıkaçlar skar dokusunda veya iyileşen deride değil yalnızca aktif lezyon bulunan KLE'de bulunurlar ve kıl follikülünün olduğu bölgede daha fazla olan hiperkeratozu gösterir (77). Keratin tıkaçların olduğu bölgedeki hiperkeratozun sebebinin, keratinositlerde farklanmanın ve proliferasyonun bozulması sebebiyle olduğu ve bunun da endokannabinoid sistemine ait olan reseptör ve enzimlerin kaybına bağlı olduğu düşünülmüştür.

CB1r, G protein bağlı bir reseptördür (38). G protein bağlı reseptörlerin genel olarak hücre membranında yer aldığı bilirse de organel membranlarında ve çekirdek membranında da yer alabildiği gösterilmiştir (78). Nükleer reseptörlerin, nükleer zarf invajinasyonları ile veya miçel içerisinde nükleoplazma içine alınabildiği ve germ hücrelerinde intranükleer lokalizasyonda buldukları gösterilmiştir (79, 80). İtranükleer reseptörlerin fizyolojik durumlarda ve hastalıklarda görev aldığı düşünülmektedir (78). Bazı reseptörlerin hücre membranında bulunduğu zamandaki işlevleri ile intranükleer veya çekirdek zarfında bulunduğu zamandaki işlevleri arasında fark olduğu gösterilmiştir (81). Çalışmamızda kontrol grubunda stratum bazalede 5, stratum spinosum ve stratum granülozumda 10 örnekte bazı hücrelerde sitoplazmik immün reaktivitenin yanında nükleer immün reaktivite saptanmıştır. Epidermin tüm tabakalarında nükleer immün reaktivite gösteren örnek sayısı psöriasis ve KLE'de azalmıştır. LS'de ise stratum granülozumda 8 örnekte sitoplazmik immün reaktivite izlenmezken, nükleer immün reaktivitenin olduğu gözlemlendi. Bu bilgiler ışığında bu çalışmamızda sitoplazmik immün reaktivitesini kaybeden ancak nükleer immün

reaktivitesi olan hücrelerin varlığı, CB1r'nin hücrenin farklı bölgelerinde farklı görevlerinin olduğunu düşündürmüştür.

FAAH enziminin hücre içinde endoplazma retikulumunun membranında bulunduğu bilinmektedir (5). Ancak düşük yapan 45 hastanın düşük materyalinde yapılan bir çalışmada trofoblastlarda FAAH enziminin nükleer lokalizasyonda bulunduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada trofoblastlardan geliştirilen koryokarsinom hücre hattında da nükleer FAAH varlığı gösterilmiştir. Kannabinoid ligandlarının lipofilik olması bu ligandların yıkımının intranükleer olarak da olabileceğini düşündürmüş, trofoblastlarda nükleer immün reaktivite varken yanlarındaki desidual hücrelerde olmaması intranükleer FAAH'ın farklı görevleri olabileceğini düşündürmüştür (82). Bu tez çalışmasında kontrol grubunda tüm örneklerde bulunan sitoplazmik ve nükleer FAAH immün reaktivitesi, hastalık grupları incelendiğinde, nükleer immün reaktivite psöriasis örneklerinin yaklaşık yarısında stratum bazalede kaybolurken, üç hastalık grubunda da stratum granülozumda sitoplazmik immün reaktivite kaybolurken nükleer immün reaktivitenin korunduğu görülmüştür. Sitoplazmik FAAH kaybolurken intranükleer FAAH immün reaktivitesinin devam ediyor olması, intranükleer FAAH'ın sitoplazmada bulunan FAAH'dan farklı görevleri olabileceği düşüncesini desteklemektedir.

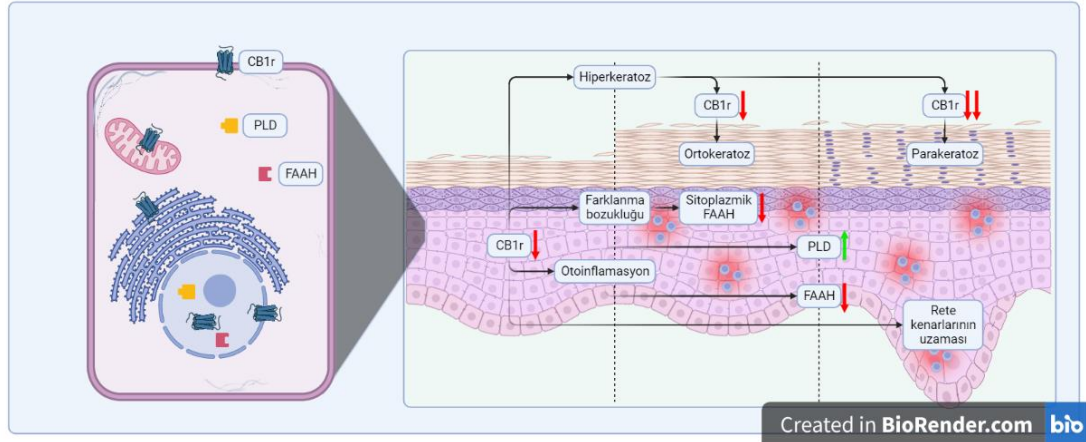
PLD'nin sitozolik bir enzim olduğu bilgisi mevcuttur (48). Ancak domuz aortasında alınan damar düz kas hücreleri ile hazırlanan hücre kültürü çalışmasında, bu hücrelerde hem nükleer hem sitozolik PLD olduğu ve nükleer PLD aktivitesinin Fosfoinositid-3 Kinaz (PI3K) sinyali ile G proteini kenetli reseptör (GPCR) kaskadına bağlı olduğu gösterilmiştir (83). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ise kannabinoidlerin PI3K sinyal yolağını CB1r ile aktive edebildiği gösterilmiştir (84). Nükleer PLD'nin vasküler düz kas hücrelerinde inflamasyon ve proliferasyon ile ilgili olduğu düşünülmektedir (85). Bu tez çalışmasında kontrol grubunda hiçbir örnekte nükleer PLD immün reaktivitesi görülmezken; psöriasis örneklerinin yaklaşık yarısında stratum spinosum ve stratum granülozum tabakalarında, KLE örneklerinin yaklaşık yarısında stratum bazalede ve neredeyse tüm örneklerde stratum spinosumda, LS örneklerinin ise tamamında tüm tabakalarda nükleer PLD immün reaktivitesi gözlemlendi. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızdaki hastalıklarda nükleer PLD'nin

sebebinin, bir G protein kenetli reseptör olan CB1r'nin miktarının değişmesine, keratinosit proliferasyonun bozulmasına ve inflamasyona bağlı olduğu düşünölmüştür.

Bu tez çalışması bazı sınırlılıklar içermektedir. Çalışmada kullanılan örnek sayısı, maddi imkanlar sebebiyle 12 ile kısıtlandırılmak zorunda kalmıştır. Bu sayı gruplar arasında yüksek büyüklükte bir etki farkı bulunacağı öngörüsü altında (etki büyüklüğü =0,50), %80 güç düzeyinde ve %5 tip-1 hata ile hesaplanmıştır. Bunun yanında hastalık örnekleri ve sağlıklı doku örnekleri vücudun aynı bölgelerinden alınmamıştır. Güneş alan bölgelerde ultraviyole ışığın inflamasyonu ve buna bağlı kannabinoid sistemi tetiklediği bilinmektedir (73, 86). Çalışmada KLE örnekleri yüz bölgesinden alınmışken, LS örnekleri ve kontrol örnekleri güneş görmeyen bölgelerden alınmıştır. Psöriaste ise güneş alan ve almayan bölgelerden alınan örnekler karşılaştırmak istendiğinde dağılım eşit olmadığı için karşılaştırılmadı. Aynı maddi kısıtlılık sebebiyle incelenen endokannabinoid sistemi elemanları sadece CB1r, FAAH enzimi ve PLD enzimi olmuştur. Oysaki endokannabinoid sisteme ait birçok reseptör, ligand ve enzim bulunmaktadır (38). CB1r'i aktive eden tek ligand anandamide olmadığı gibi, anandamide'in yapımında sadece PLD enzimi, yıkımında ise sadece FAAH enzimi yoktur (39, 47). Anandamide miktarını indirekt olarak belirlemek için yapım ve yıkım enzimlerine bakılmış olmasına rağmen, dokulardaki anandamide miktarı ölçölmemiştir. Bu çalışmada hasta örneklerinde yalnızca epidermis tabakası değerlendirilmiştir. Ancak bu hastalıklarda yalnızca epidermis etkilenmemiştir (3, 11, 50). Yine de bu çalışma KLE ve LS'de endokannabinoid sistemin çalışıldığı, psöriaste ise PLD'nin çalışıldığı ilk çalışma olarak literatüre katkıda bulunacak, yeni çalışmaların ve tedavilerin önünü açacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında psöriasis, KLE ve LS hastalıklarında endokannabinoid sistemi elemanlarından CB1r, FAAH enzimi ve PLD enziminin dağılımının ve miktarının sağlıklı kontrol grubuna göre farklılık gösterdiği ve bunların bu hastalıkların fizyopatolojilerinde etkili olabileceği gösterildi (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Tez çalışması kapsamında sorulan araştırma sorularının yanıtları ve ulaşılan sonuçlar şematize edildi. (Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.)

Sonuç olarak;

1. Psöriasisde, KLE’de ve LS’de epidermiste CB1r azalması otoinflamasyona ve hiperkeratoza neden olmaktadır.
2. CB1r immün reaktivitesinin azalması hiperkeratozun ortokeratozdan parakeratoza yönelmesine sebep olmaktadır.
3. Psöriasisin tipik bulgusu olan rete kenarlarının uzadığı bölgede CB1r miktarının azaldığı ilk kez gösterilmiştir. Psöriasisde stratum bazalede CB1r immün reaktivitesinin azalması o bölgelerde proliferasyon artışına neden olarak psöriasisdeki tipik histopatolojik bulgu olan rete kenarlarının uzamasına sebep olmaktadır.
4. Psöriasisde, KLE’de ve LS’de PLD immün reaktivitesinde artış, FAAH immün reaktivitesinde azalma inflamasyona bağlı olarak gerçekleşmektedir.
5. Psöriasisde, KLE’de ve LS’de stratum granülozum tabakasında sitoplazmik FAAH immün reaktivitesinin azalması, keratinositlerdeki farklanma bozukluğundan kaynaklanmaktadır.

6. CB1r, FAAH ve PLD miktarının azalması keratin tıkaçlardaki hiperkeratozun sebebidir.
7. CB1r sitoplazmik olarak bulunabildiği gibi intranükleer olarak da bulunabilir ve nükleer CB1r'nin sitoplazmik ve hücre membranı yerleşimli CB1r'den farklı görevleri olabilir.
8. Nükleer FAAH ve PLD enzimleri sitoplazmik enzimlerden farklı görevlere sahiptir.
9. KLE ve LS'de endokannabinoid sistemi ilk defa çalışıldı.

Bu tez çıktıları, endokannabinoid sistemin psöriasis, KLE ve LS fizyopatolojileri ile ilgili olduğunu göstermiş olup, bu üç hastalıkta yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi için zemin hazırlamıştır. Aynı zamanda hiperkeratozla giden otoinflatuvar diğer hastalıkların patogeneplerinde de endokannabinoid sisteminin etkisinin araştırılması için gerçekleştirilecek diğer çalışmalar yol gösterici olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Bukiya AN. Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology Introduction. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1162:V-Vi.
2. Milano R, Friedman A. Cannabinoids: Potential Role in Inflammatory and Neoplastic Skin Diseases. *Am J Clin Dermatol.* 2019;20(2):167-80.
3. Rio CD, Millan E, Garcia V, Appendino G, DeMesa J, Munoz E. The endocannabinoid system of the skin. A potential approach for the treatment of skin disorders. *Biochem Pharmacol.* 2018;157:122-33.
4. Proksch E, Soeberdt M, Neumann C, Kilic A, Abels C. Modulators of the endocannabinoid system influence skin barrier repair, epidermal proliferation, differentiation and inflammation in a mouse model. *Exp Dermatol.* 2019;28(9):1058-65.
5. Maccarrone M. Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:166.
6. Biro T, Toth BI, Hasko G, Paus R, Pacher P. The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(8):411-20.
7. Boehncke W-H, Schön MP. Psoriasis. *The Lancet.* 2015;386(9997):983-94.
8. NANCY WEIGLE M. Psoriasis. *Am Fam Physician.* 2013;87(9):626-33.
9. Toth KF, Adam D, Biro T, Olah A. Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the "C(ut)annabinoid" System. *Molecules.* 2019;24(5).
10. Scheau C, Badarau IA, Mihai LG, Scheau AE, Costache DO, Constantin C, et al. Cannabinoids in the Pathophysiology of Skin Inflammation. *Molecules.* 2020;25(3).
11. Geller L, Antonov NK, Lauren CT, Morel KD, Garzon MC. Pityriasis Lichenoides in Childhood: Review of Clinical Presentation and Treatment Options. *Pediatr Dermatol.* 2015;32(5):579-92.
12. Sayarlıoğlu M. İleri Yaşta Başlayan Sistemik Lupus Eritematozus. *Van Tıp Dergisi.* 2003;10 (3).
13. Kirtschig G. Lichen Sclerosus-Presentation, Diagnosis and Management. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113(19):337-43.
14. Perez-Lopez FR, Vieira-Baptista P. Lichen sclerosus in women: a review. *Climacteric.* 2017;20(4):339-47.
15. Menzinger S, Frassati-Biaggi A, Leclerc-Mercier S, Bodemer C, Molina TJ, Freitag S. Pityriasis Lichenoides: A Large Histopathological Case Series With a Focus on Adnexotropism. *Am J Dermatopath.* 2020;42(1):1-10.
16. Ross MH, & Pawlina, W. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology (8th ed.)*2019.
17. Richmond JM, Harris JE. Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(12):a015339.
18. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8).
19. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol.* 2012;30(3):257-62.
20. Kim DK, Holbrook KA. The appearance, density, and distribution of Merkel cells in human embryonic and fetal skin: their relation to sweat gland and hair follicle development. *J Invest Dermatol.* 1995;104(3):411-6.
21. Arda O, Goksugur N, Tuzun Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol.* 2014;32(1):3-13.
22. Gilaberte Y, Prieto-Torres L, Pastushenko I, Juarranz Á. Anatomy and Function of the Skin. *Nanoscience in Dermatology*2016. p. 1-14.

23. Eckert RL. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev.* 1989;69(4):1316-46.
24. Freeman SC, Sonthalia S. Histology, Keratohyalin Granules. *StatPearls. Treasure Island (FL)2022.*
25. Deo PN, Deshmukh R. Pathophysiology of keratinization. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2018;22(1):86-91.
26. Weedon D. Disorders of epidermal maturation and keratinization. *Weedon's Skin Pathology2010.* p. 247-79.e35.
27. Edmondson SR, Thumiger SP, Werther GA, Wraight CJ. Epidermal homeostasis: the role of the growth hormone and insulin-like growth factor systems. *Endocr Rev.* 2003;24(6):737-64.
28. Kubic JD, Young KP, Plummer RS, Ludvik AE, Lang D. Pigmentation PAX-ways: the role of Pax3 in melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance, and disease. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008;21(6):627-45.
29. Lee DH, Ahn SS, Kim JB, Lim Y, Lee YH, Shin SY. Downregulation of alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone-Induced Activation of the Pax3-MITF-Tyrosinase Axis by Sorghum Ethanolic Extract in B16F10 Melanoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6).
30. Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature.* 2007;445(7130):834-42.
31. Keith L. Moore B, MSc, PhD, DSc, FIAC, FRSM, FAAA, T. V. N. Persaud, MD, PhD, DSc, FRCPath (Lond.), FAAA and Mark G. Torchia, MSc, PhD. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 11th Edition: Elsevier; 2019.*
32. Hu MS, Borrelli MR, Hong WX, Malhotra S, Cheung ATM, Ransom RC, et al. Embryonic skin development and repair. *Organogenesis.* 2018;14(1):46-63.
33. Carlson B. *Human Embryology and Developmental Biology (6th edition): Elsevier; 2018.*
34. Richardson RJ, Hammond NL, Coulombe PA, Saloranta C, Nousiainen HO, Salonen R, et al. Periderm prevents pathological epithelial adhesions during embryogenesis. *J Clin Invest.* 2014;124(9):3891-900.
35. Thulabandu V, Chen D, Atit RP. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2018;7(2).
36. Baswan SM, Klosner AE, Glynn K, Rajgopal A, Malik K, Yim S, et al. Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) for Skin Health and Disorders. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2020;13:927-42.
37. del Rio C, Millan E, Garcia V, Appendino G, DeMesa J, Munoz E. The endocannabinoid system of the skin. A potential approach for the treatment of skin disorders. *Biochemical Pharmacology.* 2018;157:122-33.
38. Sheriff T, Lin MJ, Dubin D, Khorasani H. The potential role of cannabinoids in dermatology. *J Dermatolog Treat.* 2020;31(8):839-45.
39. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(9):771-84.
40. Bukiya AN. *Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology2019.*
41. Paradisi A, Pasquariello N, Barcaroli D, Maccarrone M. Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor-dependent manner. *J Biol Chem.* 2008;283(10):6005-12.
42. Pasquariello N, Oddi S, Malaponti M, Maccarrone M. Chapter 17 Regulation of Gene Transcription and Keratinocyte Differentiation by Anandamide. *Vitamins and Hormones. Vitamins & Hormones2009.* p. 441-67.
43. Trusler AR, Clark AK, Sivamani RK, Shi VY. The Endocannabinoid System and Its Role in Eczematous Dermatoses. *Dermatitis.* 2017;28(1):22-32.

44. Martin BR, Mechoulam R, Razdan RK. Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sci.* 1999;65(6-7):573-95.
45. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science.* 1992;258(5090):1946-9.
46. Wang J, Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostag Oth Lipid M.* 2009;89(3-4):112-9.
47. Biringer RG. The rise and fall of anandamide: processes that control synthesis, degradation, and storage. *Mol Cell Biochem.* 2021;476(7):2753-75.
48. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220).
49. Akkaya Dad. Liken Sklerozuslu Kadin Olgularinda Serum Prolaktin Düzeylerinin Araştirilmesi 2007.
50. Fergus KB, Lee AW, Baradaran N, Cohen AJ, Stohr BA, Erickson BA, et al. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Treatment of Lichen Sclerosus: A Systematic Review. *Urology.* 2020;135:11-9.
51. Powell JJ, Wojnarowska F. Lichen sclerosis. *The Lancet.* 1999;353(9166):1777-83.
52. Knio Z, Kurban M, Abbas O. Lichen sclerosis: clinicopathological study of 60 cases from Lebanon. *Int J Dermatol.* 2016;55(10):1076-81.
53. Kuhn A. Kutanöz Lupus Eritematozus Tedavisinde S2k Kılavuzu2017.
54. Filotico R, Mastrandrea V. Cutaneous lupus erythematosus: clinico-pathologic correlation. *G Ital Dermatol Venereol.* 2018;153(2):216-29.
55. Little AJ, Vesely MD. Cutaneous Lupus Erythematosus: Current and Future Pathogenesis-Directed Therapies. *Yale J Biol Med.* 2020;93(1):81-95.
56. Achtman JC, Werth VP. Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:182.
57. Walling HW. Cutaneous Lupus Erythematosus Issues in Diagnosis and Treatment. *Am J Clin Dermatol.* 2009;10 (6):365-81.
58. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001;23(4):291-9.
59. Morin-Buote J, Ennour-Idrissi K, Poirier E, Lemieux J, Furrer D, Burguin A, et al. Association of Breast Tumour Expression of Cannabinoid Receptors CBR1 and CBR2 with Prognostic Factors and Survival in Breast Cancer Patients. *J Pers Med.* 2021;11(9).
60. Nicholson EM, Greenlee JJ, Hamir AN. PrPSc detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissue by ELISA. *BMC Res Notes.* 2011;4:432.
61. Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology.* 2010;215(8):588-97.
62. Fernandez-Solari J, Prestifilippo JP, Bornstein SR, McCann SM, Rettori V. Participation of the endocannabinoid system in the effect of TNF-alpha on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1088:238-50.
63. Jean-Gilles L, Braitch M, Latif ML, Aram J, Fahey AJ, Edwards LJ, et al. Effects of pro-inflammatory cytokines on cannabinoid CB1 and CB2 receptors in immune cells. *Acta Physiol (Oxf).* 2015;214(1):63-74.
64. Rubio-Araiz A, Arevalo-Martin A, Gomez-Torres O, Navarro-Galve B, Garcia-Ovejero D, Suetterlin P, et al. The endocannabinoid system modulates a transient TNF pathway that induces neural stem cell proliferation. *Mol Cell Neurosci.* 2008;38(3):374-80.
65. Farci F, Mahabal GD. Hyperkeratosis. *StatPearls. Treasure Island (FL)2022.*

66. Maccarrone M, Di Rienzo M, Battista N, Gasperi V, Guerrieri P, Rossi A, et al. The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J Biol Chem*. 2003;278(36):33896-903.
67. Toth BI, Dobrosi N, Dajnoki A, Czifra G, Olah A, Szollosi AG, et al. Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. *J Invest Dermatol*. 2011;131(5):1095-104.
68. Ramot Y, Sugawara K, Zakany N, Toth BI, Biro T, Paus R. A novel control of human keratin expression: cannabinoid receptor 1-mediated signaling down-regulates the expression of keratins K6 and K16 in human keratinocytes in vitro and in situ. *PeerJ*. 2013;1:e40.
69. Ramot Y, Olah A, Paus R. Cover Image: Neuroendocrine treatment of inherited keratin disorders by cannabinoids? *Br J Dermatol*. 2018;178(6):1469.
70. Liu B, Zhu F, Xia X, Park E, Hu Y. A tale of terminal differentiation: IKKalpha, the master keratinocyte regulator. *Cell Cycle*. 2009;8(4):527-31.
71. Murphy M, Kerr P, Grant-Kels JM. The histopathologic spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol*. 2007;25(6):524-8.
72. Shen Z, Sun L, Liu Z, Li M, Cao Y, Han L, et al. Rete ridges: Morphogenesis, function, regulation, and reconstruction. *Acta Biomater*. 2023;155:19-34.
73. Rettori V, Fernandez-Solari J, Prestifilippo JP, Mohn C, De Laurentiis A, Bornstein SR, et al. Endocannabinoids in TNF-alpha and ethanol actions. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14(3-4):188-92.
74. Nakamura T. Shadow Cell Differentiation: A Comparative Analysis of Modes of Cell Death with Apoptosis and Epidermal/Trichilemmal Keratinization. *Dermatopathology (Basel)*. 2018;5(3):86-97.
75. Pasquariello N, Oddi S, Malaponti M, Maccarrone M. Regulation of gene transcription and keratinocyte differentiation by anandamide. *Vitam Horm*. 2009;81:441-67.
76. Daldon PE, Macedo de Souza E, Cintra ML. Hypertrophic lupus erythematosus: a clinicopathological study of 14 cases. *J Cutan Pathol*. 2003;30(7):443-8.
77. Lopez-Tintos BO, Garcia-Hidalgo L, Orozco-Topete R. Dermoscopy in active discoid lupus. *Arch Dermatol*. 2009;145(3):358.
78. Goncalves-Monteiro S, Ribeiro-Oliveira R, Vieira-Rocha MS, Vojtek M, Sousa JB, Diniz C. Insights into Nuclear G-Protein-Coupled Receptors as Therapeutic Targets in Non-Communicable Diseases. *Pharmaceuticals-Base*. 2021;14(5).
79. Ribeiro-Oliveira R, Vojtek M, Goncalves-Monteiro S, Vieira-Rocha MS, Sousa JB, Goncalves J, et al. Nuclear G-protein-coupled receptors as putative novel pharmacological targets. *Drug Discov Today*. 2019;24(11):2192-201.
80. Nielsen JE, Rolland AD, Rajpert-De Meyts E, Janfelt C, Jorgensen A, Winge SB, et al. Characterisation and localisation of the endocannabinoid system components in the adult human testis. *Sci Rep*. 2019;9(1):12866.
81. Gobeil F, Fortier A, Zhu T, Bossolasco M, Leduc M, Grandbois M, et al. G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharm*. 2006;84(3-4):287-97.
82. Chamley LW, Bhalla A, Stone PR, Liddell H, O'Carroll S, Kearn C, et al. Nuclear localisation of the endocannabinoid metabolizing enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) in invasive trophoblasts and an association with recurrent miscarriage. *Placenta*. 2008;29(11):970-5.

83. Gayral S, Deleris P, Laulagnier K, Laffargue M, Salles JP, Perret B, et al. Selective activation of nuclear phospholipase D-1 by G protein-coupled receptor agonists in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2006;99(2):132-9.
84. Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem.* 2007;102(4):1105-14.
85. Ushio-Fukai M. Nuclear phospholipase D1 in vascular smooth muscle: specific activation by G protein-coupled receptors. *Circ Res.* 2006;99(2):116-8.
86. Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32633-42.