

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARELERDE LİPOPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENEN  
SOLUNUM YOLU İNFLAMASYONUNDA MİTOKONDRIYE  
HEDEFLENDİRİLMİŞ YAVAŞ HİDROJEN SÜLFÜR  
SALIVEREN AP39'UN VE NİTRİK OKSİT SENTAZ  
İNHİBİTÖRÜ ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN (ADMA)'NİN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ecz. Yasemin KARAMAN KUTLUAY**

**Farmakoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2019**

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARELERDE LİPOPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENEN  
SOLUNUM YOLU İNFLAMASYONUNDA MİTOKONDRIYE  
HEDEFLENDİRİLMİŞ YAVAŞ HİDROJEN SÜLFÜR  
SALIVEREN AP39'UN VE NİTRİK OKSİT SENTAZ  
İNHİBİTÖRÜ ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN (ADMA)'NİN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ecz. Yasemin KARAMAN KUTLUAY**

**Farmakoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

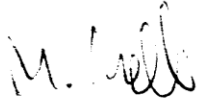
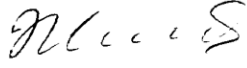



**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. İnci ERDEMLİ**

**ANKARA**

**2019**

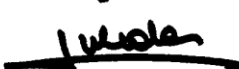
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**FARELERDE LİPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENEN SOLUNUM YOLU**  
**İNFLAMASYONUNDA MİTOKONDRIYE HEDEFLENDİRİLMİŞ YAVAŞ HİDROJEN**  
**SÜLFÜR SALIVEREN AP39'UN VE NİTRİK OKSİT SENTAZ İNHİBİTÖRÜ ASİMETRİK**  
**DİMETİL ARJİNİN (ADMA)'NİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**  
**Ecz. Yasemin KARAMAN KUTLUAY**  
**Danışman: Prof. Dr. İnci ERDEMLİ**

Bu tez çalışması 11/12/2019 tarihinde jürimiz tarafından "Farmakoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

<b>Jüri Başkanı:</b>	<i>Prof. Dr. Mehmet Melli</i> (Ankara Üniversitesi)	
<b>Üye:</b>	<i>Prof. Dr. Serdar Uma</i> (Hacettepe Üniversitesi)	
<b>Üye:</b>	<i>Prof. Dr. Nuray Arı</i> (Ankara Üniversitesi)	
<b>Üye:</b>	<i>Doç. Dr. T. Emrah Bozkurt</i> (Hacettepe Üniversitesi)	
<b>Üye:</b>	<i>Dr. Öğr. Üyesi Melike H. Özkan</i> (Hacettepe Üniversitesi)	

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

16 Aralık 2019

  
**Prof. Dr. Diclehan ORHAN**  
**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

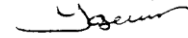
Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

11 /12/2019



Ecz. Yasemin KARAMAN KUTLUAY

i

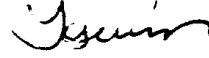
<sup>i</sup>"**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**"

- (1) **Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.**
- (2) **Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metodların kullandığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulgular içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.**
- (3) **Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.**  
**Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir**

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Prof. Dr. İnci ERDEMLİ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



*Ecz. Yasemin KARAMAN KUTLUAY*

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi, birikim ve tecrübeleriyle yol gösteren, bana her konuda yardımcı olan, desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. İnci Erdemli' ye tez çalışmama ve bana kattıkları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen, uygun çalışma ve laboratuvar şartlarının oluşmasını sağlayan sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Serdar Uma' ya,

Bilimsel ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarımın hep bir adım daha ileriye gidebilmesi için bütün imkanları zorlayan sevgili hocam Sayın Doç. Dr. T. Emrah Bozkurt'a,

Tezimin histopatolojik incelemelerindeki değerli katkıları için Sayın Doç. Dr. Sevgen Çelik Önder'e,

Tezimin fluksomiks analiz ve sülfür metabolitlerinin düzeylerinin ölçümünü gerçekleştiren Sayın Doç. Dr. Emirhan Nemutlu' ya ve Cemil Can Eylem' e,

Farmakoloji eğitimimim boyunca beni teze hazırlayan Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli hocalarıma bana kattıkları her şey için teşekkür ederim.

İlk laboratuvar deneyimlerimi paylaştığım, tüm bilgi ve tecrübesini aktarmak için elinden geleni esirgemeyen sevgili Dr. Öğr. Üyesi Yeşim Kaya Yaşar'a,

Laboratuvarı eğlenceli hale getiren, her zor zamanımda yanımda olan, en ihtiyacım olan anlarda yardımlarını esirgemeyen ve birçok güzel anı paylaştığım sevgili çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bütün hayatım boyunca özveri ile yanımda olan, en büyük destekçilerim çok sevgili anneme, babama ve kardeşime tüm kalbimle teşekkür ederim. Bu süreçte desteklerini hep yanımda hissettiğim eşimin ailesine ve tüm geniş aileme çok teşekkür ederim.

Bu süreçte varlığından güç aldığım eşime teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (proje no: TSA-14475) tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

**Karaman-Kutluay, Y. Farelerde Lipopolisakkarit ile İndüklenen Solunum Yolu İnflamasyonunda Mitokondriye Hedeflendirilmiş Yavaş Hidrojen Sülfür Salıveren AP39'un ve Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörü Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA)'nın Etkilerinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2019.** Bu çalışmada lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda mitokondriye hedeflendirilmiş hidrojen sülfür'ü yavaş salıveren donör AP39'un etkileri *in vitro* ve *in vivo* modeller ile incelendi. *In vitro* modelde farelerden izole edilen trakea halkaları ve akciğer dokuları doku kültüründe LPS ile dört gün boyunca inkübe edildi. LPS inkübasyonu trakea halkalarında 5-hidroksitriptamin ve bradikinin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artışa ve akciğer dokularında interlökin (IL)-1 $\beta$ , tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-6 düzeylerinde artışa yol açtı. AP39 inkübasyonu 30 nM konsantrasyonda trakeal 5-HT hiperreaktivitesini ve 30 ve 300 nM konsantrasyonlarda TNF- $\alpha$ , IL-6 düzeylerindeki artışı önledi. *In vivo* modelde ise LPS ve AP39 farelere intranasal olarak uygulandı. AP39 (250, 500 ve 1000 nmol/kg) tedavisi LPS ile indüklenen bronşiyal hiperreaktiviteyi ve bronkoalveolar lavaj sıvısında IL-6 artışını bütün dozlarda, nötrofil sayısındaki artışı 1000 nmol/kg, TNF- $\alpha$  artışını 250 ve 500 nmol/kg dozlarda engelledi, akciğerde parankimal inflamasyonu ise etkilemedi. AP39 500 nmol/kg dozda, LPS ile indüklenen glukoz-6-fosfat ve süksinat birikimini önledi, 250 nmol/kg dozda ise sistein düzeyindeki azalmayı inhibe etti ve glutasyon ve taurin düzeylerini artırdı. Bu çalışmada ayrıca endojen bir nitrik oksit sentaz inhibitörü olan asimetrik dimetil arjinin (ADMA)'ın LPS ile indüklenen solunum yolu inflamasyonundaki rolü araştırıldı. Doku kültüründe ADMA (3 $\mu$ M) inkübasyonu 5-hidroksitriptamin ve bradikinin ile indüklenen kasılmaları artırdı. Ancak, LPS varlığında ADMA (30 ve 100  $\mu$ M) inkübasyonu 5-hidroksitriptamin hiperreaktivitesini önledi. LPS ile indüklenen *in vivo* solunum yolu inflamasyonunda ADMA (200 nmol/kg)'nın intratrakeal yoldan akut olarak veya intranasal (30 mg/kg) olarak uygulanması bronşiyal hiperreaktiviteyi inhibe etti ve intranasal uygulama bronkoalveolar lavaj sıvısındaki nötrofil sayısındaki artışı da önledi. Bulgularımıza göre AP39, solunum yolu inflamasyonunu azaltmakta ve bronşiyal hiperreaktiviteyi önlemektedir; ancak uygulanacağı doz kritik görünmektedir. ADMA nitrik oksit sentaz enziminin indüklenebilir ve yapısal alt tiplerini inhibe ederek solunum yolu fonksiyonlarının düzenlenmesine katılmaktadır ve solunum yolu inflamasyonunda terapötik potansiyeli olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Hidrojen sülfür, lipopolisakkarit, AP39, solunum yolu inflamasyonu, bronşiyal hiperreaktivite.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (proje no: TSA-14475) tarafından desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Karaman-Kutluay, Y. Investigation of the Effects of Mitochondria-Targeted Slow Hydrogen Sulfide Releasing AP39 and Nitric Oxide Synthase Inhibitor Asymmetric Dimethyl Arginine (ADMA) in Lipopolysaccharide-Induced Airway Inflammation in Mice. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, PhD Thesis in Pharmacology, Ankara, 2019.** In this study, the effects of mitochondria-targeted slow H<sub>2</sub>S releasing donor AP39 on lipopolysaccharide (LPS)-induced airway inflammation were investigated in *in vitro* and *in vivo* models. In *in vitro* model tracheal rings and lung tissues isolated from mice were incubated with LPS for four days in tissue culture. LPS incubation lead to an increase in 5-hydroxytryptamine- and bradykinin-induced contraction responses in tracheal rings and interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6 levels were enhanced in lung tissues incubated with LPS. AP39 incubation prevented tracheal 5-hydroxytryptamine hyperreactivity at 30 nM concentration and increase in TNF- $\alpha$ , IL-6 levels at 30 and 300 nM concentrations. In *in vivo* model LPS and AP39 was applied as intranasal. AP39 (250, 500 and 1000 nmol/kg) treatment prevented the LPS-induced bronchial hyperreactivity and increase in IL-6 levels in bronchoalveolar lavage fluid at all doses, the increase in neutrophil numbers at 1000 nmol/kg, the increase in TNF- $\alpha$  level at 250 and 500 nmol/kg and did not prevent parenchymal inflammation in lung tissue. AP39 at 500 nmol/kg dose prevented the LPS-induced glucose-6-phosphate and succinate accumulation and 250 nmol/kg dose inhibited the decrease in cysteine levels and increased glutathione and taurine levels. In this study, the role of an endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethyl arginine (ADMA) in LPS-induced airway inflammation was also evaluated. In tissue culture ADMA (3 $\mu$ M) incubation lead to an increase in 5-hydroxytryptamine- and bradykinin induced contractions. On the other hand, ADMA (30 and 100  $\mu$ M) prevented 5-hydroxytryptamine hyperreactivity in the presence of LPS. In LPS-induced *in vivo* airway inflammation ADMA application via intratracheal route as acutely or intranasally inhibited bronchial hyperreactivity and intranasal application also prevented the increase in neutrophil numbers in bronchoalveolar lavage fluid. Our results indicate that the mitochondria-targeted H<sub>2</sub>S releasing donor AP39 decrease airway inflammation and prevent bronchial hyperreactivity however, the dose to be administered appears to be critical. ADMA is involved in the regulation of airway functions by inhibiting inducible and constitutive nitric oxide synthase and is thought to have therapeutic potential in airway inflammation.

**Keywords:** Hydrogen sulphide, lipopolysaccharide, AP39, airway inflammation, bronchial hyperreactivity.

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project no: TSA-2017-14475).



## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xx
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Solunum Yolu İnflamasyonu	3
2.1.1. Bronşiyal Hiperreaktivite	3
2.1.2. LPS ile Deneysel Solunum Yolu İnflamasyonu	5
2.1.3. Solunum Yolu İnflamasyonunda Pro-İnflamatuvar Sitokinlerin Rolü	5
2.2. 5-Hidroksitriptamin (5-HT)	7
2.2.1. Solunum Yolu İnflamasyonunda 5-HT'nin Rolü	8
2.3. Bradikinin	8
2.3.1. Solunum Yolu İnflamasyonunda Bradikininin Rolü	9
2.4. Mitokondri	10
2.4.1. Glikoliz ve Mitokondride Krebs Döngüsünün İnflamatuvar Yanıtın Düzenlenmesi ile İlişkisi	10
2.4.2. Solunum Yolu İnflamasyonunda Mitokondrinin Rolü	13
2.5. Hidrojen Sülfür (H <sub>2</sub> S)	14
2.5.1. Mitokondriye Hedeflendirilmiş Yavaş H <sub>2</sub> S Salıveren Donör AP39	15
2.5.2. Solunum Sisteminde H <sub>2</sub> S'nin Rolü	16
2.5.3. Solunum Yolu İnflamasyonunda H <sub>2</sub> S'nin Rolü	17
2.6. Nitrik Oksit (NO) ve Solunum Sistemindeki Rolü	18

2.7. NOS-Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA)- Dimetilarjinin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) (NOS-ADMA-DDAH) Yolağı	20
2.7.1. Solunum Sisteminde ADMA' nın Rolü	21
2.7.2. ADMA' nın İnflamasyon Üzerine Etkileri	22
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	24
3.1. Doku Kültüründe Lipopolisakkarit (LPS) İnkübasyonu ile Oluşturulan <i>in vitro</i> Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu Modeli	24
3.1.1. Doku Kültüründe LPS İnkübasyonu ile Oluşturulan <i>in vitro</i> Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu Modelinde AP39 İnkübasyonu	24
3.1.2. Doku Kültüründe LPS İnkübasyonu ile Oluşturulan <i>in vitro</i> Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu Modelinde ADMA İnkübasyonu	24
3.2. Deney Protokolü	24
3.2.1. Dokuların Hazırlanması ve Doku Kültürü	24
3.2.2. Trakea Reaktivitesinin Ölçümü	25
3.2.3. Karbakol, 5-HT ve Bradikinin ile İndüklenen Kasılma Yanıtlarının İncelenmesi	26
3.2.4. İzoprenalin ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi	26
3.2.5. Akciğer Doku Homojenatlarının Hazırlanması	26
3.2.6. Akciğer Homojenatlarında İnflamatuar Sitokin Düzeyi Ölçümü	26
3.3. LPS ile indüklenen Deneysel <i>in vivo</i> Solunum Yolu İnflamasyonu	27
3.3.1. LPS ile İndüklenen Deneysel <i>in vivo</i> Solunum Yolu İnflamasyonunda İntranazal AP39 Tedavisi	27
3.3.2. LPS ile İndüklenen Deneysel <i>in vivo</i> Solunum Yolu İnflamasyonunda İntranazal ADMA Uygulaması	27
3.3.3. Solunum Yolu Fonksiyonunun <i>in vivo</i> Ölçümü	28
3.3.4. Bronkoalveoler Lavaj (BAL) Sıvısı Örneklerinde İnflamatuar Hücre Sayımı	29
3.3.5. BAL Sıvısı Örneklerinde İnflamatuar Sitokin Düzeyi Ölçümü	29
3.3.6. Histopatolojik Değerlendirme	29
3.3.7. Fluksomiks Analiz ile Mitokondri Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi	30
3.3.8. Sülfür Metabolizmasına Ait Metabolitlerin Miktar Tayini	31
3.4. Bulguların Sunuluğu ve İstatistiksel Analizi	33

3.5. Deneylerde Kullanılan Solüsyonlar ve İlaçlar	34
<b>4. BULGULAR</b>	36
4.1. Doku Kültüründe LPS İnkübasyonu ile Oluşturulan <i>in vitro</i> Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu ve AP39 İle İnkübasyonun Etkileri	36
4.1.1. Karbakol, 5-HT ve Bradikinin ile İndüklenen Kasılma, İzoprenalin ile İndüklenen Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi	36
4.1.2. Pro-İnflamatuar Sitokin Düzeylerinin Değerlendirilmesi	41
4.2. Doku Kültüründe LPS İnkübasyonu ile Oluşturulan <i>in vitro</i> Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu Modelinde ADMA İnkübasyonunun Etkileri	43
4.2.1. Karbakol, 5-HT ve Bradikinin ile İndüklenen Kasılma, İzoprenalin ile İndüklenen Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi	43
4.3. Farelerde LPS ile İndüklenen <i>in vivo</i> Solunum Yolu İnflamasyonu ve İntranazal AP39 Tedavisinin Etkileri	50
4.3.1. <i>In vivo</i> Bronşiyal Reaktivitenin Değerlendirilmesi	50
4.3.2. BAL SIVISI Örneklerinde İnflamatuar Hücre Sayımı	55
4.3.3. BAL SIVISI Örneklerinde İnflamatuar Sitokin Düzeyi Ölçümü	56
4.3.4. Histopatolojik Değerlendirme	59
4.3.5. Mitokondri Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi	62
4.3.6. Sülfür Metabolizmasına Ait Metabolitlerin Miktar Tayini	65
4.4. Farelerde LPS ile İndüklenen <i>in vivo</i> Solunum Yolu İnflamasyonunda İntranazal ADMA Uygulamasının Etkileri	67
4.4.1. <i>In vivo</i> Bronşiyal Reaktivitenin Değerlendirilmesi	67
4.4.2. BAL SIVISI Örneklerinde Hücre Sayımı	67
4.5. Farelerde LPS ile İndüklenen <i>in vivo</i> Solunum Yolu İnflamasyonunda Akut ADMA Uygulaması	68
4.5.1. <i>In vivo</i> Bronşiyal Reaktivite Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	68
4.5.2. BAL SIVISI Örneklerinde Hücre Sayımı	69
4.5.3. Histopatolojik Değerlendirme	70
<b>5. TARTIŞMA</b>	71
5.1. Doku Kültüründe Lipopolisakkarit (LPS) İnkübasyonu ile Oluşturulan <i>in vitro</i> Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu	71

5.1.1. Doku Kùltüründe Lipopolisakkarit (LPS) İnkübasyonu ile Oluşturulan <i>in vitro</i> Kronik Solunum Yolu İnfiamasyonunda AP39'un Etkileri	73
5.1.2. Doku Kùltüründe Lipopolisakkarit (LPS) İnkübasyonu ile Oluşturulan <i>in vitro</i> Kronik Solunum Yolu İnfiamasyonunda ADMA'nın Etkileri	75
5.2. LPS ile İndüklenen Deneysel <i>in vivo</i> Solunum Yolu İnfiamasyonu	76
5.2.1. LPS ile İndüklenen Deneysel <i>in vivo</i> Solunum Yolu İnfiamasyonunda İtranazal AP39 Tedavisinin Etkileri	79
5.2.2. LPS ile İndüklenen Deneysel <i>in vivo</i> Solunum Yolu İnfiamasyonunda ADMA'nın Etkileri	82
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>85</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>88</b>
<b>8. EKLER</b>	<b>102</b>
<b>EK-1:</b> Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
<b>EK-2:</b> Tez çalışması Orjinallik Raporu	
<b>EK-3:</b> Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ADMA</b>	Asimetrik dimetilarjinin, N <sup>G</sup> -dimetil-L-arjinin
<b>Asetil KoA</b>	Asetil koenzim A
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>BAL</b>	Bronkoalveolar lavaj
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Kalsiyum
<b>CAT</b>	Katyonik amino asit taşıyıcılar
<b>C<sub>dyn</sub></b>	Kompliyans
<b>cGMP</b>	Siklik guanozin monofosfat
<b>CBS</b>	Sistasyonin-β-sentetaz
<b>CIC</b>	Sitrat taşıyıcı
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbon dioksit
<b>CO</b>	Karbon monoksit
<b>COX-1</b>	Siklooksijenaz-1
<b>COX-2</b>	Siklooksijenaz-2
<b>CSE</b>	Sistasyonin-γ-liyaz
<b>DDAH</b>	Dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DNA</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>EAA</b>	Eğri altında kalan alan
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>E<sub>maks</sub></b>	Maksimum etki
<b>eNANC</b>	eksitatör non-adrenerjik non-kolinerjik
<b>eNOS</b>	Endotelyal nitrik oksit sentaz
<b>ERK1/2</b>	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz 1/2
<b>ETZ</b>	Elektron taşıma zinciri
<b>FADH</b>	Flavin adenin dinükleotit
<b>G6P</b>	Glukoz-6-fosfat
<b>GC-MS</b>	Gaz kromatografi-kütle spektrometresi
<b>GM-CSF</b>	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
<b>GSH</b>	Glutatyon

<b>H<sub>2</sub><sup>18</sup>O</b>	<sup>18</sup> O bakımından zenginleştirilmiş su
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Hidrojen sülfür
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 $\alpha$
<b>5-HT</b>	5-Hidroksitriptamin
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i> (Hücreler arası adezyon molekülü-1)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	İnterferon- $\gamma$
<b>IgE</b>	İmmüoglobulin E
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	NF- $\kappa$ B inhibitör proteinleri
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>i.n.</b>	İntranazal
<b>iNANC</b>	İnhibitör non-adrenerjik non-kolinerjik
<b>iNOS</b>	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>i.p.</b>	İntraperitoneal
<b>i.t.</b>	İntratrakeal
<b>K<sub>ATP</sub></b>	ATP-bağımlı potasyum kanalı
<b>KCl</b>	Potasyum klorür
<b>KOAH</b>	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
<b>LC-MS/MS</b>	<i>Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i> (Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometresi)
<b>L-NAME</b>	N <sup>W</sup> -nitro-L-arjinin metil esteri
<b>L-NMMA</b>	N <sup>G</sup> -monometil-L-arjinin
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>LT</b>	Lökotrien
<b>MIF</b>	Makrofaj migrasyon inhibitör faktör
<b>MPO</b>	Miyeloperoksidaz
<b>MRM</b>	Çoklu reaksiyon izleme
<b>3-MST</b>	3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz
<b>MSTFA</b>	N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamid
<b>NAD</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NaHS</b>	Sodyum hidrojen sülfür
<b>NANC</b>	Non-adrenerjik non-kolinerjik

<b>NF-κB</b>	Nükleer faktör-kappa B
<b>nNOS</b>	Nöronal nitrik oksit sentaz
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentaz
<b><sup>18</sup>O</b>	Oksijen-18
<b>O<sub>2</sub></b>	Oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süperoksiti
<b>PAF</b>	Trombosit aktive edici faktör
<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu serum fizyolojik
<b>PG</b>	Prostaglandin
<b>PRMT</b>	Protein-arjinin metiltransferaz
<b>RI</b>	Solunum yolu direnci
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türevleri
<b>SDH</b>	Süksinat dehidrogenaz
<b>SDMA</b>	Simetrik dimetilarjinin, N <sup>G</sup> -N <sup>G</sup> -dimetil-L-arjinin
<b>SH</b>	Standart hata
<b>SUCNR1</b>	Süksinat reseptörü
<b>TCA</b>	Trikarboksilik asit döngüsü
<b>TLR</b>	<i>Toll-like</i> reseptör
<b>TMCS</b>	Trimetilklorosilan
<b>TNF-α</b>	Tümör nekroz faktörü alfa
<b>TPP<sup>+</sup></b>	Trifenil fosfonyum
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> (Vasküler hücre adezyon molekülü-1)

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Mitokondride Krebs döngüsü ve aspartat-arjinosüksinat hattı.	13
2.2. AP39'un kimyasal yapısı.	16
2.3. Metillenmiş arjinin rezidülerinin kimyasal yapısı.	20
3.1. <i>In vivo</i> solunum yolu fonksiyonunun ölçümü.	29
4.1. Doku kültüründe kontrol grubu ve LPS grubu izole fare trakea halkalarında karbakol ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları.	36
4.2. Doku kültüründe kontrol grubu ve LPS grubu izole fare trakea halkalarında 5-HT ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları.	37
4.3. Doku kültüründe kontrol grubu ve LPS grubu izole fare trakea halkalarında bradikinin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları.	37
4.4. Doku kültüründe kontrol grubu ve LPS grubu izole fare trakea halkalarında izoprenalin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları.	38
4.5. Doku kültüründe kontrol, LPS ve 10 nM (A), 30 nM (B), 100 nM (C) ve 300 nM (D) AP39 ile inkübe edilen LPS grubu izole fare trakea halkalarında 5-HT ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları.	39
4.6. Doku kültüründe kontrol, LPS ve 10 nM (A), 30 nM (B), 100 nM (C) ve 300 nM (D) AP39 ile inkübe edilen LPS grubu izole fare trakea halkalarında bradikinin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları.	40
4.7. Kontrol, LPS ve AP39 ile inkübe edilen LPS grubu akciğer homojenatlarında IL-1 $\beta$ (A), TNF- $\alpha$ (B) ve IL-6 (C) düzeyleri.	42
4.8. Doku kültüründe kontrol, LPS ve 3 $\mu$ M (A), 30 $\mu$ M (B), 100 $\mu$ M (C) ADMA ile inkübe edilen LPS grubu izole fare trakea halkalarında 5-HT ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları.	44
4.9. Doku kültüründe kontrol, LPS ve 3 $\mu$ M (A), 30 $\mu$ M (B), 100 $\mu$ M (C) ADMA ile inkübe edilen LPS grubu izole fare trakea halkalarında bradikinin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları.	45



- 4.10.** Doku kültüründe kontrol ve 3  $\mu$ M (A), 30  $\mu$ M (B), 100  $\mu$ M (C) ADMA ile inkübe edilen kontrol grubu izole fare trakea halkalarında 5-HT ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. 47
- 4.11.** Doku kültüründe kontrol ve 3  $\mu$ M ADMA ile inkübe edilen kontrol grubu trakea halkalarında 5-HT ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtı eğrilerinin altında kalan alan (EAA). 47
- 4.12.** Doku kültüründe kontrol ve 3  $\mu$ M (A), 30  $\mu$ M (B), 100  $\mu$ M (C) ADMA ile inkübe edilen kontrol grubu izole fare trakea halkalarında bradikinin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. 48
- 4.13.** Doku kültüründe kontrol ve 3  $\mu$ M ADMA ile inkübe edilen kontrol grubu trakea halkalarında bradikinin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtı eğrilerinin altında kalan alan (EAA). 49
- 4.14.** Doku kültüründe kontrol ve 3  $\mu$ M (A), 30  $\mu$ M (B), 100  $\mu$ M (C) ADMA ile inkübe edilen kontrol grubu izole fare trakea halkalarında izoprenalin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları. 50
- 4.15.** *In vivo* solunum yolu direnci ölçümünde intratrakeal metakolin uygulaması ile solunum yolu direnci ve kompliyansında meydana gelen değişikliklere ait deney traseleri. 51
- 4.16.** Kontrol ve LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu direnci (RI) yanıtları. 52
- 4.17.** Kontrol ve LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu kompliyansı ( $C_{dyn}$ ) yanıtları. 52
- 4.18.** Kontrol, LPS ve 250 nmol/kg (A), 500 nmol/kg (B), 1000 nmol/kg (C) AP39 tedavisi uygulanan LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu direnci (RI) yanıtları. 53
- 4.19.** Kontrol ve 250 nmol/kg (A), 500 nmol/kg (B), 1000 nmol/kg (C) AP39 tedavisi uygulanan kontrol grubu farelerde intratrakeal metakolin ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu direnci (RI) yanıtları. 54
- 4.20.** Kontrol, LPS ve AP39 tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında nötrofil hücre sayısı. 55
- 4.21.** Kontrol ve AP39 tedavisi uygulanan kontrol grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında nötrofil hücre sayısı. 56

- 4.22.** Kontrol, LPS ve AP39 tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında TNF- $\alpha$  konsantrasyonları. 57
- 4.23.** Kontrol ve AP39 tedavisi uygulanan kontrol grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında TNF- $\alpha$  konsantrasyonları. 58
- 4.24.** Kontrol, LPS ve AP39 tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında IL-6 konsantrasyonları. 58
- 4.25.** Kontrol ve AP39 tedavisi uygulanan kontrol grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında IL-6 konsantrasyonları. 59
- 4.26.** Kontrol, LPS ve AP39 tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında histopatolojik skor. 60
- 4.27.** Kontrol (A), LPS (B), 250 nmol/kg (C), 500 nmol/kg (D) ve 1000 nmol/kg (E) tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer örneklerinin histolojik kesitleri. 61
- 4.28.** Kontrol, LPS ve AP39 tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında  $^{18}\text{O}$  ile işaretlenmiş süksinat (A), sitrat (B), fumarat (C) ve malat (D) miktarları. 63
- 4.29.** Kontrol, LPS, AP39 tedavisi uygulanan LPS ve çözücü uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında  $^{18}\text{O}$  ile işaretlenmiş glukoz-6-fosfat (G6P) miktarları. 64
- 4.30.** Kontrol, LPS ve AP39 tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında sistein (A), metiyonin (B), sistin (C), taurin (D) ve glutatyon (GSH) (E) düzeyleri. 66
- 4.31.** Kontrol, LPS ve ADMA uygulaması yapılan LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu direnci (Rl) yanıtları. 67
- 4.32.** Kontrol, LPS ve ADMA uygulaması yapılan LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında nötrofil hücre sayısı. 68
- 4.33.** Kontrol, LPS ve metakolin yanıtından 15 dakika önce akut olarak ADMA uygulanan LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu direnci (Rl) yanıtları. 69

- 4.34.** Kontrol, LPS ve metakolin yanıtından 15 dakika önce akut olarak ADMA uygulanan LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında nötrofil hücre sayısı. 70
- 4.35.** Kontrol, LPS ve metakolin yanıtından 15 dakika önce akut olarak ADMA uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında histopatolojik skor. 70

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b> Akciğer dokularında histopatolojik değerlendirme için yarı-kantitatif skorlama sistemi.	30
<b>3.2.</b> GC-MS için çalışma koşulları.	31
<b>3.3.</b> Sülfür metabolizmasına ait metabolitler ve parçalanma ürünleri.	32
<b>3.4.</b> Gradient elüsyon.	32
<b>3.5.</b> Sülfür metabolitlerine ait kalibrasyon aralığı ve denklemi.	32
<b>4.1.</b> Doku kültüründe kontrol, LPS, AP39 ile inkübe edilen LPS ve çözücü ile inkübe edilen LPS grubu izole fare trakea halkalarında karbakol, 5-HT ve bradikinin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları.	40
<b>4.2.</b> Doku kültüründe kontrol ve AP39 ile inkübe edilen kontrol grubu izole fare trakea halkalarında karbakol, 5-HT ve bradikinin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları.	41
<b>4.3.</b> Doku kültüründe kontrol, LPS ve AP39 ile inkübe edilen LPS grubu akciğer dokularında IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ve IL-6 düzeyleri.	43
<b>4.4.</b> Doku kültüründe kontrol, LPS ve ADMA ile inkübe edilen LPS grubu izole fare trakea halkalarında karbakol, 5-HT ve bradikinin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları.	46
<b>4.5.</b> Doku kültüründe kontrol ve ADMA ile inkübe edilen kontrol grubu izole fare trakea halkalarında karbakol, 5-HT ve bradikinin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları.	49
<b>4.6.</b> Kontrol, LPS ve AP39 ile tedavi edilen LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin ile ölçülen maksimum solunum yolu direnci yanıtları.	53
<b>4.7.</b> Kontrol ve AP39 ile tedavi edilen kontrol grubu farelerde intratrakeal metakolin ile ölçülen maksimum solunum yolu direnci yanıtları.	54
<b>4.8.</b> Kontrol, LPS ve AP39 tedavisi uygulanan kontrol grubu ve LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarındaki nötrofil sayıları.	56
<b>4.9.</b> Kontrol, LPS ve AP39 tedavisi uygulanan kontrol ve LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarındaki TNF- $\alpha$ ve IL-6 konsantrasyonları.	59

- 4.10.** Kontrol, LPS, AP39 tedavisi uygulanan LPS ve AP39 çözücüsü uygulanan LPS grubu farelerden elde edilen akciğer örneklerindeki glikoliz ve Krebs döngüsü metabolik ara ürün düzeyleri. 64
- 4.11.** Metakolin yanıtından 15 dakika önce akut olarak solunum yollarına PBS uygulanan kontrol ve LPS grupları ile ADMA uygulanan LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin ile ölçülen maksimum solunum yolu direnci yanıtları. 69

## 1. GİRİŞ

Astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi kronik solunum yolu hastalıklarının insidansı gittikçe artmaktadır. Solunum yolu inflamasyonu ve hiperreaktivitesi bu hastalıkların karakteristik bir özelliğidir (1). Günümüzde solunum yolu hastalıklarının tedavisinde inflamasyonun baskılanması ve bronkodilatasyonun sağlanması hedeflenmektedir. Bu amaçla kortikosteroidler, beta-2-agonistler gibi ilaçlar kullanılmaktadır; ancak hasta popülasyonunun bir kısmında semptomlar bu ilaçlar ile kontrol altına alınamamakta, hastalığın ilerlemesi önlenememektedir. Bu nedenle inflamatuvar solunum yolu hastalıklarının tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesi önem kazanmaktadır. Son yıllarda artan çalışmalar astım hastalığı ile mitokondri fonksiyonlarındaki bozukluklar arasında ilişki olduğunu ortaya koymakta ve mitokondriyi hedefleyen tedavi stratejileri solunum yolu hastalıklarının tedavisinde denenmektedir (2).

Hidrojen sülfür ( $H_2S$ ), nitrik oksit (NO) ve karbon monoksit (CO) gibi endojen olarak sentezlenen gaz yapısında bir mediyatördür (3, 4).  $H_2S$  sentezleyen enzimlerin solunum sisteminde eksprese edildiği ve solunum yolunun fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonlarında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (5, 6).

Asimetrik dimetilarjinin (ADMA), metillenmiş doku proteinlerinin yıkımı ile oluşan endojen bir nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörüdür ve NO düzeylerinin düzenlenmesinde yer almaktadır (7). ADMA'nın vücutta ana kaynağı olarak akciğerler gösterilmektedir ve solunum yolunda patofizyolojik fonksiyonlarda rol oynadığı düşünülmektedir (8).

Deneyisel araştırmalarda sistemik veya solunum yollarına lokal olarak lipopolisakkarit (LPS) uygulaması ile solunum yolunda inflamasyon oluşturulması sıklıkla kullanılan ve kabul gören yöntemlerden biridir (9). Bu tez çalışmasında, izole fare trakea halkaları ve akciğer dokularının doku kültüründe LPS ile inkübe edilmesi ile oluşturulan *in vitro* solunum yolu inflamasyonunda mitokondriye hedeflendirilmiş yavaş  $H_2S$  salıveren donör AP39 ve NOS inhibitörü ADMA'nın trakeal hiperreaktivite üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Farelerde solunum yollarına LPS uygulaması ile indüklenen *in vivo* solunum yolu inflamasyonunda ise AP39 ve ADMA'nın bronşiyal

hiperreaktivite, inflamasyon ve ayrıca AP39'un mitokondri fonksiyonu ve kükürt grubu taşıyan amino asit düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Solunum Yolu İnflamasyonu

Solunum yolu inflamasyonu kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), astım, kistik fibrozis, idiyopatik pulmoner fibrozis gibi pek çok solunum yolu hastalığının patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır (10). Solunum yollarına inflamatuvar hücre infiltrasyonu, mukus sekresyonu artışı, ödem oluşumu, epitel hasarı ve bronşiyal hiperreaktivite ile karakterize edilmektedir (11, 12).

Solunum yolu inflamasyonu genellikle patojenler tarafından veya toksinlere, çevre kirliliğine yol açan maddelere, tahriş edici maddelere ve alerjenlere maruz kalma sonucu gelişir. Patojenler, toksinler, tahriş edici maddeler ve alerjenler, solunum yolu epitel hücrelerini uyararak inflamatuvar yanıtı aktive ederler. *Toll-like* reseptörler (TLR), patojenler tarafından paylaşılan moleküler kalıpları tanır ve nükleer faktör-kappa B (NF- $\kappa$ B) yolağı aktive olarak, inflamatuvar hücreleri aktive eder ve büyüme faktörleri, kemokinler, pro-inflamatuvar sitokinler olan interlökin 8 (IL-8) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) üretilir. IL-8 nötrofilleri uyarırken, TNF- $\alpha$  dokuya hücre göçünde önemli olan adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır (13). Solunum yolu inflamasyonunda, nötrofil, eozinofil, makrofaj, lenfosit, monosit ve bazofil gibi hemen her tip inflamatuvar hücrenin solunum yollarına infiltre olduğu görülmektedir (11). Astım hastalarının bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında mast hücre kaynaklı mediyatörler olan histamin ve lökotrien (LT) C4, D4, E4, prostaglandin (PG) D2 düzeylerinin artmış olduğu bildirilmiştir (12, 14). Bu mediyatörler mukus sekresyonunu, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve bronşiyal düz kasın kontraktilitesini artırarak inflamasyon tablosuna katkıda bulunan mediyatörlerdendir (12). Astım hastalarının BAL sıvısında ayrıca IL-1 $\beta$ , IL-6 ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi sitokinlerin, hücreler arası adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi adhezyon moleküllerinin de düzeyinin arttığı gösterilmiştir (12).

#### 2.1.1. Bronşiyal Hiperreaktivite

Solunum yolu reaktivitesi, solunum yollarının konstriktör agonistler ile uyarıldığında kasılma yanıtı oluşturma kabiliyetinin göstergesidir (15). Solunum yolunun direkt ve direkt olmayan uyaranlara karşı verdiği yanıtın ölçülmesi ile



değerlendirilir. Metakolin, histamin, sisteinil lökotrienler gibi direkt uyarılar solunum yolu düz kasındaki reseptörlerine bağlanarak kasılma yanıtı oluştururlar. Egzersiz, soğuk, kuru hava gibi fiziksel ve hava kirliliği, sigara dumanı gibi kimyasal uyarılar, direkt olmayan uyarılardır ve inflamatuvar hücrelerden mediyatör salıverilmesine neden olarak kasılma yanıtı oluşturur (16).

Solunum yolu hiperreaktivitesi ise solunum yollarının kasıcı agonistlere karşı duyarlılığının artması, uyarılara aşırı cevap vermesi olarak tanımlanabilir. Agonistlerin daha küçük konsantrasyonları ile solunum yolu düz kasında kasılma meydana gelirken maksimum yanıt da artar (15).

Solunum yolu hiperreaktivitesinin altında yatan mekanizmalar çok karmaşıktır ve iki bileşenin olduğu kabul edilir. Bunlardan ilki kalıcı solunum yolu hiperreaktivitesidir ve kronik astım hastalarının çoğunda görülür. Diğer bileşen ise çeşitli uyarılar ile indüklenebilen akut, değişken ve geri dönüşlü solunum yolu hiperreaktivitesidir. Bu iki bileşenin mekanizmaları da farklıdır. Solunum yolu hiperreaktivitesinin kalıcı bileşeni solunum yolundaki yapısal değişiklikler, solunum yolu *remodeling*'i ile ilişkili iken değişken bileşeni ise solunum yolu inflamasyonunun akut etkilerini yansıtır (16).

Solunum yollarındaki aşırı duyarlılığın gelişmesinde inflamasyon önemli rol oynar. Astım hastalarının solunum yollarında artmış olan eozinofil sayısının epitel hasarı, bazal membran ve solunum yolu duvarının kalınlaşmasına yol açtığı ve bronkokonstriksiyon oluşturucu mediyatörlerin salıverilmesini artırdığı düşünülmektedir (15). İnflamatuvar mediyatörler solunum yolu düz kası fenotipinde değişikliğe neden olarak solunum yolu düz kasının kontraktilesini artırır ve aşırı duyarlılığa neden olur (17). Yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13 gibi inflamatuvar sitokinlerin *in vitro* ortamda solunum yolu düz kasının kasıcı ajanlara verdiği yanıtı artırdığı, gevşetici ajanlara verdiği yanıtı ise azalttığı gösterilmiştir (17-21).

Solunum yolu hiperreaktivitesi inflamatuvar solunum yolu hastalıklarının karakteristik bir özelliğidir ve bu hastalıkların tedavi stratejilerinde bronkokonstriksiyonun önlenmesi önemli yer tutmaktadır. Günümüzde bronkokonstriksiyonun tedavisinde  $\beta_2$ -adrenerjik reseptör agonistleri, kolinerjik muskarinik reseptör antagonistleri gibi bronkodilatör ajanlar kullanılmaktadır; ancak kalıcı solunum yolu hiperreaktivitesi görülen çoğu astım hastasında bronkodilatör

tedavisine verilen yanıtın azalmış olduğu görülmektedir. Bu nedenle, solunum yolu aşırı duyarlılığını azaltmak için terapötik değeri olan yeni stratejiler üzerine araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (22).

### **2.1.2. LPS ile Deneysel Solunum Yolu İnflamasyonu**

LPS, Gram-negatif bakterilerin dış membranının temel bileşenidir ve TLR ligandır (23, 24). TLR'ler doğal bağışıklık sisteminin bir parçasıdır ve viral ve bakteriyel bileşenlerin tanınmasında kilit unsurlardır. Viral ve bakteriyel bileşenler tarafından aktive edilen TLR'ler inflamatuvar yanıtı tetiklerler. TLR'ler eozinofiller, nötrofiller, mast hücreleri, monositler, dendritik hücreler, makrofajlar, B-hücreler, T-hücreler, epitel hücreleri ve düz kas hücreleri olmak üzere hemen her tip hücrede eksprese edilirler (24).

LPS, TLR'lerin TLR4 alt tipini aktive eder ve doğal bağışıklığı uyararak (24, 25) nötrofillerin egemen olduğu belirgin bir inflamasyon indükler (24, 26). TLR4'ün aktivasyonu NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu ve hücre çekirdeğine translokasyonunu sağlar (27). Hücre çekirdeğine geçen NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MIF (makrofaj migrasyon inhibitör faktör) gibi inflamatuvar sitokinlerin gen transkripsiyonunu aktive eder (25). Deneysel hayvanlarında inflamasyon indüklenmesi amacıyla LPS uygulanması sık kullanılan modellerden biridir ve sistemik veya solunum yollarına lokal olarak uygulanması solunum yollarında inflamasyon oluşturarak, solunum yolu hiperreaktivitesinin gelişmesine neden olur (26, 28, 29).

### **2.1.3. Solunum Yolu İnflamasyonunda Pro-İnflamatuvar Sitokinlerin Rolü**

Sitokinler; küçük, protein yapıda mediyatörlerdir ve inflamatuvar yanıtın oluşmasında, sürdürülmesinde ve koordinasyonunda kritik role sahiptirler. Sitokinler inflamatuvar hücrelerin gelişimini, farklılaşmasını, uyarılmasını, aktivasyonunu ve hayatta kalmasını teşvik ederek inflamatuvar yanıtın düzenlemesine yardımcı olur (30). Histamin, sisteinil lökotrienler gibi mediyatörlerin salıverilmesine neden olarak, solunum yolu *remodelling*'i, bronşiyal hiperreaktivite gelişimine katkıda bulunurlar (14). Bu sitokinlerin etkilerinin temelini anlaşılmasının, inflamatuvar solunum yolu hastalıklarının tedavisi için yeni stratejiler geliştirmek ve mevcut olanları iyileştirmek için önemli bir adım olabileceği düşünölmektedir (18).

IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 pro-inflamatuar sitokinler grubunu oluşturur. Pro-inflamatuar sitokinler çoğu inflamasyon tipinde rol oynar, inflamatuvar yanıtı güçlendirir ve sürdürülmesini sağlar. Astım hastalığının şiddeti ve anti-inflamatuar tedaviye yanıtındaki direnç açısından önemli yer tutmaktadırlar (14).

### **IL-1 $\beta$**

IL-1 $\beta$ 'nin ana kaynağı çoğu dokuda aktive monosit/makrofajlar olmasına karşın, nötrofiller, doğal öldürücü hücreler, B-hücreler, T-hücreler, endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri olmak üzere çok çeşitli hücrelerde sentez edilir. Transmembranal glikoprotein yapısında iki tip reseptörü bulunur ve bu reseptörlere bağlanarak etki gösterir. TNF- $\alpha$ , GM-CSF, endotoksin ve fagositoz gibi çeşitli uyaranlar IL-1 $\beta$  sentezini artırır. IL-1 $\beta$ , kemik iliğinden nötrofil salıverilmesini uyarır ve IL-6 gibi diğer sitokinlerin üretimini indükler (14). ICAM-1, VCAM-1 (vasküler hücre adezyon molekülü-1) gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırarak solunum yolu epiteline inflamatuvar hücre infiltrasyonunu artırır (31). Astım hastalarının BAL sıvısında IL-1 $\beta$  düzeyinin yükseldiği ve makrofajlarında IL-1 $\beta$  mRNA transkripsiyonunun arttığı gösterilmiştir (32). Sıçanlara IL-1 $\beta$  inhale ettirilmesi solunum yollarına nötrofil infiltrasyonu ve inhale bradikinine karşı hiperreaktivite gelişmesi ile sonuçlanmıştır (33). IL-1 $\beta$  uygulaması izole kobay solunum yolunda asetilkolin ile indüklenen kasılma yanıtını artırmış, izoprenalin ile indüklenen gevşeme yanıtını azaltmıştır (34). İzole insan bronş dokusunda ise IL-1 $\beta$  asetilkolin yanıtlarında değişikliğe yol açmazken, nörokinin NK<sub>1</sub> reseptör agonisti ile indüklenen kasılma yanıtlarını artırmıştır (18). IL-1 $\beta$  reseptör antagonisti (IL-1Ra) uygulamasının farede alerjen ile indüklenen solunum yolu hiperreaktivitesini azalttığı gösterilmiştir (35). Bu gözlemler pro-inflamatuar sitokin IL-1 $\beta$ 'nin solunum yolu düz kasının kasılma ve gevşemesinde direkt etkileri ile değişikliklere aracılık ettiğini ve solunum yolu inflamasyonunun düzenlenmesinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir (34).

### **TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  makrofajlar, T lenfositler, mast hücreleri, eozinofiller, nötrofiller, epitel hücreleri, solunum yolu düz kası hücreleri gibi birçok hücre tipi tarafından üretilse de

ana kaynağı makrofajlardır (14, 30, 35). Etkilerini iki tipi bulunan hücre yüzey reseptörü yapısındaki reseptörleri üzerinden gösterir ve bu reseptörler eritrositler hariç hemen her tip hücre yüzeyinde bulunur (14). TNF- $\alpha$  üretimi için en güçlü uyaranlar arasında lipopolisakkaritler olsa da fiziksel, kimyasal, immünolojik uyaranlar hızlı bir şekilde üretimine ve salıverilmesine neden olabilir (30). Makrofajlardan TNF- $\alpha$  salıverilmesi diğer sitokinler IL-1 $\beta$ , GM-CSF ve interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) tarafından artırılır. TNF- $\alpha$ , solunum yolu epitel hücrelerinde IL-4, GM-CSF gibi diğer sitokinlerin, ICAM-1, VCAM-1 gibi adhezyon moleküllerinin üretimini artırır ve solunum yollarına nötrofil, eozinofil gibi lökositlerin adhezyonunu uyarır (14). TNF- $\alpha$ ; solunum yolu inflamasyonunun şiddetlenmesine yol açar ve astım hastalarının BAL örneklerinde, akciğer dokularında TNF- $\alpha$  düzeyleri yükselmektedir (14). Sağlıklı insanlara TNF- $\alpha$  inhalasyonu ve sıçanlara TNF- $\alpha$  infüzyonu uygulamasının solunum yolu reaktivitesinde artışa ve nötrofil infiltrasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (36, 37). Araştırmalar TNF- $\alpha$ 'nın solunum yolu düz kasında çeşitli kasıcı ajanlar ile indüklenen kasılma yanıtını artırdığını ortaya koymaktadır (18). İzole insan bronşiyollerinin organ banyosunda 16 saat boyunca TNF- $\alpha$  ile inkübe edilmesi asetilkolin ile indüklenen kasılma yanıtını %27 oranında artırmıştır (38). TNF- $\alpha$ 'nın kobay, fare, koyun, inek gibi diğer türlerin de solunum yollarında hiperreaktiviteye yol açtığı bildirilmiştir (18).

## **IL-6**

IL-6, ilk olarak antiviral etkisi ile tanımlanmıştır. Monosit/makrofaj, T-hücre, B-hücre, fibroblast, endotel hücreleri, epitel hücreleri, solunum yolu düz kası tarafından üretilir ve salıverilir. IL-4 ile indüklenen immünoglobulin E (IgE) sentezinde önemli bir kofaktördür (14). İnflamatuar hücrelerin aktive edilmesinde diğer sitokinler ile birlikte rol alır ve akut inflamatuvar yanıtın indüklenmesine katkı sağlar (39). Astım hastalarının alveolar makrofajlarında IL-6 salıverilmesinin arttığı bildirilmiştir (14, 35).

## **2.2. 5-Hidroksitriptamin (5-HT)**

5-HT ilk olarak mide ve barsak mukozasında tanımlanan amin yapılı bir mediyatördür. Ardından santral sinir sisteminde varlığı gösterilmiş ve birçok fizyolojik fonksiyonlara aracılık eden bir nörotransmitter (40) ve periferik vasküler

sistemde lokal bir hormon olduğu bildirilmiştir. 5-HT etkilerini G-proteini ile kenetli 5-HT reseptörleri aracılığıyla göstermektedir. Bu reseptörlerin 7 farklı tipi ve bunların da alt tipleri bulunmaktadır (41).

### **2.2.1. Solunum Yolu İnflamasyonunda 5-HT'nin Rolü**

5-HT solunum sisteminde, solunum yolu epitelindeki nöroendokrin hücreler ve trombositlerden salıverilmektedir (42). Ayrıca 5-HT alerjik reaksiyonlarda mast hücrelerinden büyük miktarda salıverilir ve antijen ile indüklenen kasılmalardan sorumlu ana mediyatördür (43). Sağlıklı insanda bronşlar 5-HT'ye karşı duyarlı değildir ve *in vitro* ortamda insan solunum yolunda 5-HT kasılma oluşturmaz; ancak astım hastalarında bronkokonstriksiyon yapabilir (14). 5-HT'nin solunum yolu düz kasındaki reseptörleri üzerinden direkt olarak ve kolinerjik sinir uçlarından asetilkolin salıverilmesini artırarak indirekt olarak kasılma oluşturduğu gösterilmiştir (44, 45). Bu etkiye kobay solunum yollarında 5-HT<sub>3</sub> reseptörleri (46), fare solunum yollarında ise 5-HT<sub>2A</sub> reseptörleri aracılık etmektedir (47).

Solunum sisteminin kronik inflamatuvar hastalıklarında 5-HT'nin önemli rol oynadığı rapor edilmektedir. Astım, KOAH hastalarında plazma 5-HT seviyelerinin yükseldiği bildirilmiştir (14, 48, 49). Deneysel olarak oluşturulan solunum yolu inflamasyonu modellerinde solunum yollarında 5-HT'ye karşı hiperreaktivite geliştiği gösterilmiştir (50-52). Allerjen ile indüklenen solunum yolu inflamasyonu modelinde kobay akciğer dokusunda 5-HT<sub>2A</sub> ve 5-HT<sub>4</sub> reseptör alt tiplerinin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (41). Ancak; solunum yollarında inflamasyon ile birlikte gelişen 5-HT hiperreaktivitesinin altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir.

### **2.3. Bradikinin**

Bradikinin, plazmada ve dokuda kininojenler adı verilen öncül peptidlerin proteolitik olarak ayrılması sonucu oluşan peptid yapılı bir mediyatördür. Kardiyovasküler sistem, gastrointestinal sistem, solunum sistemi, immün sistemde ve alerjik reaksiyonlarda fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonlarda önemli rol oynar. Etkilerini temel olarak G-proteini ile kenetli iki tip bradikinin reseptörü üzerinden gösterir. Bunlar bradikinin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> reseptörleridir. Bradikinin B<sub>2</sub> reseptörü yapısal

nitelikte reseptör iken B<sub>1</sub> reseptörü indüklenabilir niteliktedir ve inflamasyon, enfeksiyon gibi durumlarda ekspresyonu artar (14).

### **2.3.1. Solunum Yolu İnflamasyonunda Bradikininin Rolü**

Solunum yollarında bronşiyal ve pulmoner damar endotelinde, epitel hücrelerinde, düz kasta, submukozal bez ve sinir hücrelerinde bradikinin B<sub>2</sub> reseptörlerin varlığı gösterilmiştir. Bradikininin solunum yollarında çok sayıda etkisi vardır ve bu etkilerin bir kısmı B<sub>2</sub> reseptörlerin uyarılması ile direkt olarak ortaya çıkarken bir kısmı ise diğer mediyatör ve nörotransmitterlerin salıverilmesini uyarması ile indirekt olarak ortaya çıkmaktadır (14).

İlk kez; astım hastalarına inhalasyonu ile gözlenen bronkokonstriksiyondan sonra bradikininin astım patofizyolojisinde rol alan bir mediyatör olduğu öne sürülmüştür. Bradikinin sağlıklı insanlarda yüksek konsantrasyonlarda bile bronkokonstriksiyon oluşturmazken, astım hastalarında güçlü bir bronkokonstriktör ajandır (53). Astım hastalarında BAL sıvısında varlığı gösterilmiş (14) ve akciğerde B<sub>2</sub> reseptör ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (54). Astım hastalarının eozinofillerinde B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> reseptörlerinin ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiştir (55).

Bradikinin, prostaglandinler, nitrik oksit ve taşikininler gibi diğer mediyatörlerin sentez edilmesini indükler ve inflamatuvar hücrelerin aktive olmasına neden olarak akut inflamatuvar yanıtın modüle edilmesinde rol alır (14, 55). Solunum yolu epiteli hücrelerinden nötrofil ve monosit kemotaktik faktörlerin (56), astım hastalarının alveolar makrofajlarından LTB<sub>4</sub>, PAF (trombosit aktive edici faktör) ve eozinofilik kemotaktik faktörlerin salıverilmesine neden olduğu gösterilmiştir (57). B<sub>1</sub> reseptör antagonistinin farelere allerjen uygulaması ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda, solunum yollarına inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azalttığı rapor edilmiştir (58).

Bradikininin solunum yollarındaki en önemli etkilerinden biri de nosiseptif sinir liflerini aktive etmesidir. Bu liflerin aktive olması astımın karakteristik özellikleri olan öksürük ve göğüs sıkışmasının ortaya çıkmasına aracılık eder (14). Bradikinin ve bradikinin reseptörlerinin astım patofizyolojisindeki rolleri üzerine çalışmalar devam

etmektedir ve bradikinin sentez yolağı, reseptör ekspresyonu veya aktivitesinin düzenlenmesine yönelik tedavi stratejilerinin önemli olduğu düşünölmektedir (55).

## 2.4. Mitokondri

Mitokondri, kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) homeostazı ve hücresele enerji üretimindeki kritik rolleri dolayısıyla solunum yolu düz kasının fizyolojisinde önemli yer almaktadır (59). Mitokondrinin ana rolü düz kas kasılması ve gevşemesi için gerekli olan adenozein trifosfat (ATP) formundaki hücresele enerjiyi üretmektir. Bu glukoz, piruvat ve nikotinamid adenin dinökleotid (NAD)'ın oksidatif fosforilasyonu ile sağlanır ve aerobik solunum olarak bilinir. Mitokondriyal matristeki kalsiyum bağımlı dehidrogenazlar, mitokondriyal kalsiyumdaki artışa cevap olarak  $NAD^{+}$  ve flavin adenin dinökleotit (FADH)'i, NADH ve FADH<sub>2</sub>'ye indirger (60). Bu nedenle, mitokondrideki  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu, mitokondri tarafından ATP üretiminin önemli bir düzenleyicisidir (2, 59). Mitokondri ayrıca  $Ca^{+2}$ 'u hızla organel içine alması, salıvermesi ve geçici olarak depolama yeteneğı sayesinde hücresele  $Ca^{+2}$  homeostazına katkıda bulunur ve hücrelerin  $Ca^{+2}$  tamponlama sistemi olarak işlev görür (59).

Diğer birçok hücre tipinde olduğu gibi, solunum yolu düz kasında da reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretiminin ana yerlerinden biri mitokondridir. Elektron transferi sırasında elektron taşıma zincirinden (ETZ) sızan elektronlar, oksijenle reaksiyona girerek mitokondriyal ROS'un ana formu olan süperoksit anyonunu ( $O_2^{-}$ ) oluştururlar. Fizyolojik ROS seviyeleri hücre sinyal yolağında ikincil mesajcı olarak rol almasına rağmen artan ROS üretimi DNA (deoksiribo nükleik asit) ve protein hasarına ve sonuçta hücre ölümeüne neden olmaktadır.

Mitokondrinin ATP sentezi, ROS üretimi ve  $Ca^{+2}$  homeostazının düzenlenmesindeki fonksiyonel rolü sayesinde solunum yolu düz kası fizyolojisi için mitokondri sağlığının korunmasının oldukça önemli olduğu düşünölmektedir (59).

### 2.4.1. Glikoliz ve Mitokondride Krebs Döngüsünün İnflamatuar Yanıtın Düzenlenmesi ile İlişkisi

Son yıllarda mitokondrinin immün cevabın düzenlenmesinde kilit rol oynadığı düşünölmektedir (61). Krebs döngüsü [trikarboksilik asit, (TCA) döngüsü] ve oksidatif fosforilasyon, hücresele enerji ihtiyacını karşılayan hücresele fonksiyonlardır.

Krebs döngüsünde yer alan ara ürünlerin doğal bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (61, 62). LPS gibi pro-inflamatuar uyaranlarla makrofaj ve monosit gibi lökositlerin aktifleştirilmesi, Krebs döngüsünü etkilemekte ve böylece hücre içinde süksinat, itakonat, sitrat ve fumarat gibi metabolik ara ürünlerin birikimine ve ayrıca hücre dışına taşınmasına yol açmaktadır (63).

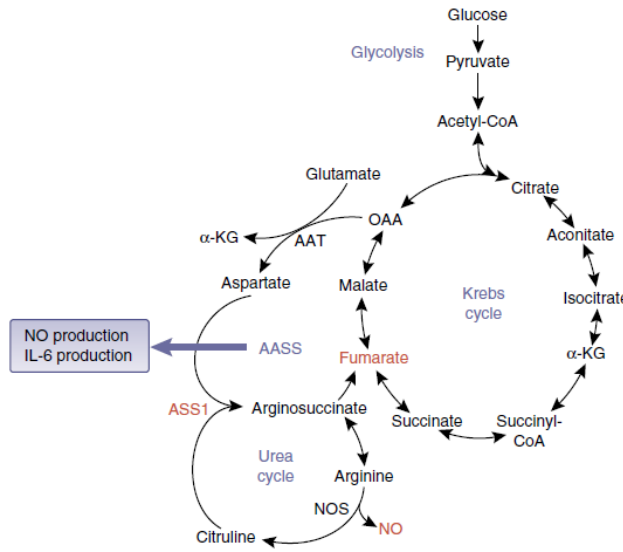
Süksinat, Krebs döngüsünde süksinat dehidrogenaz (SDH) tarafından oksidasyona uğrayarak fumarat oluşturur. Süksinat, Krebs döngüsü ile mitokondriyal elektron taşıma zinciri arasında bağlantı sağlar (61). Tannahill ve diğ., LPS stimülasyonunun, makrofajlarda önemli miktarda süksinat birikmesine yol açtığını ve LPS'e bağlı IL-1 $\beta$  üretimindeki artışı potansiyalize ettiğini bildirmiştir (64). Süksinatın pro-inflamatuar etkileri için öne sürülen ana mekanizmalar arasında hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) stabilizasyonu, mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun artması, süksinilasyon yoluyla diğer proteinlerin post-translasyonel modifikasyonu yer alır (61). Karaciğer, kalp, böbrek ve beyin gibi dokularda iskemik hasarın yüksek seviyelerde süksinat birikimine yol açtığı gösterilmiştir (65). Farede inme ve miyokard enfarktüsü modellerinde süksinat birikiminin farmakolojik inhibisyonunun doku hasarını azalttığı gösterilmiştir. Süksinat, G-proteini ile kenetli reseptörü SUCNR1 üzerinden de etki gerçekleştirmektedir ve SUCNR1'in karaciğer, dalak, böbrek gibi dokularda dendritik hücre ve makrofajlarda eksprese edildiği gösterilmiştir (61). Süksinat uygulamasının hematopoetik progenitör hücrelerde SUCNR1'in uyarılması yoluyla dolaşımdaki nötrofil ve trombositlerin sayısını arttırdığı gösterilmiştir (66). Farede gerçekleştirilen artrit modelinde sinoviyal sıvıda yüksek miktarda süksinat biriktiği ve SUCNR1 protein düzeyinin azaltılmasının dizdeki ödemi azalttığı gösterilmiştir (61). Özetle; sistemik veya lokal inflamasyon, enfeksiyon durumlarında aktive olmuş makrofajlardan süksinat salıverilmesini arttırmaktadır ve süksinat otokrin ve parakrin etkileri ile inflamasyon yanıtının şiddetlenmesinde rol almaktadır. Hücrede süksinat birikiminin inhibisyonunun veya SUCNR1 reseptör antagonistlerinin geliştirilmesinin, inflamatuvar durumların tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmektedir (61, 62).

Krebs döngüsünde oksaloasetat ve asetil koenzim A (asetil KoA)'dan üretilen sitrat; mitokondriyal sitrat taşıyıcı (CIC) tarafından mitokondriden sitozole taşınır.



Makrofajların LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ile uyarılması CIC ekspresyonunu ve sitozolik sitrat konsantrasyonunu artırmaktadır (61, 67). Düzeyi artan sitozolik sitratın NO ve PGE<sub>2</sub> üretimini artırdığı gösterilmiştir (68). CIC ekspresyonu azaltılmış hücreler veya CIC inhibisyonu; LPS ile aktive edilen makrofajlarda pro-inflamatuar mediyatörlerin salıverilmesini azaltmıştır. Bu bulgu sitrat ve sitrat taşıyıcı sistemin inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde rolü olduğunu düşündürmektedir (61, 67). Sitozolik sitrat oksaloasetat ve asetil KoA'ya metabolize olur. Asetil KoA yağ asidi sentezine katılarak prostaglandinler gibi inflamasyon durumunda sentezlenerek salıverilen inflamatuvar proteinlerin salıverilmesini artırır (68).

Fumarat, Krebs döngüsünde süksinattan süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından oluşturulur. İnflamatuar durumlarda SDH'nın *down*-regülasyonu sonucu süksinat fumarata dönüştürülemez. Krebs döngüsünün devamının sağlanması amacıyla aspartat-arjinosüksinat hattının aktivitesi artmakta ve buradan üretilen fumarat Krebs döngüsüne katılarak döngüyü devam ettirmektedir. Aspartat-arjinosüksinat hattı NO ve IL-6 üretiminde rol almaktadır ve çalışmalarda aspartat-arjinosüksinat hattının inhibe edilmesinin indüklenebilir NOS (iNOS) ekspresyonunu, NO ve IL-6 düzeyini düşürdüğü gösterilmiştir (62). LPS ile aktive edilmiş makrofajlarda fumarat biriktiği gösterilmiştir (61). Ekzojen olarak fumarat analogu dimetil fumarat uygulanmasının makrofajlarda TNF- $\alpha$ , IL-6 gen ekspresyonunu azalttığı (69), farelerde kardiyak iskemi/reperfüzyon hasarı modelinde koruyucu etkileri bildirilmiştir (70). Klinikte dimetil fumarat psöriyazis ve multiple sklerozis tedavisinde kullanılmaktadır (61).



**Şekil 2.1.** Mitokondride Krebs döngüsü ve aspartat-arjinosüksinat hattı. Şekil Mills, E.L. ve diğ. (62)'den alınmıştır.

TLR4 uyarılmasının, immün hücrelerde enerji ihtiyacının karşılanmasında değişikliğe yol açtığı ve oksidatif fosforilasyondan glikolize doğru kaydığı gösterilmiştir (71, 72). LPS ile aktive olan makrofajlarda 24 saat içerisinde glikolitik ara ürünler, glukoz-6-fosfat biriktiği bildirilmiştir. 2-deoksiglukoz ile glukoz-6-fosfat üretiminin inhibe edilmesi, *in vitro* ortamda LPS'e bağlı olarak indüklenen IL-1 $\beta$  transkripsiyonunu, *in vivo* IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  transkripsiyonunu inhibe etmektedir (64). İnflamasyon durumunda hücrenin artmış enerji ihtiyacının karşılanması amacıyla ve mitokondride Krebs döngüsünde ortaya çıkan aksaklıklar nedeniyle hücrelerde glikoliz artmaktadır ve düzeyi artan ara ürünler inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde rol almaktadır (64).

#### 2.4.2. Solunum Yolu İnflamasyonunda Mitokondrinin Rolü

Son yıllarda artan çalışmalar, mitokondriyal disfonksiyon ile astım arasında bir bağlantı olduğunu ortaya koymaktadır (2, 59). Mitokondri yapısı ve fonksiyonlarında görülen değişiklikler ile ilişkili olarak ATP üretiminin düşmesi, ROS düzeylerinin artması ve Ca<sup>2+</sup> homeostazının bozulması; akciğer fibrozisi, astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı dahil olmak üzere pek çok solunum yolu hastalığının ve akciğer yaşlanmasının patofizyolojik sürecine katkıda bulunmaktadır (59). Solunum yolu inflamasyonunda mitokondride yapısal değişiklikler (krista kaybı gibi) ve

fonksiyonlarında bozukluklar geliştiği gözlenmiştir (2). Astımlı hastaların epitel ve solunum yolu düz kasında (73) ve deney hayvanlarında indüklenen alerjik astım modellerinde mitokondriyal disfonksiyon geliştiği gözlenmiştir (74). İnsan solunum yolu düz kasında çok sayıda mitokondri bulunur ve astım hastalarında mitokondriyal biyogenezin arttığı gösterilmiştir (73).

İnflamatuar mediyatörler ve ROS, mitokondriyal yapı ve fonksiyonu değiştirebilirler (75-78). TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar mediyatörlerin mitokondriyal  $Ca^{+2}$  transportunu bozarak sitozolik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu ve solunum yolu düz kas kasılmasını artırdığı gösterilmiştir (2, 79). Solunum yolu inflamasyonunda artan iNOS kaynaklı NO'nun peroksinitrit oluşumunu artırarak mitokondriyal disfonksiyona yol açtığı bildirilmiştir (80). Aguilera-Aguirre ve diğ., antijen maruziyetinden önce mitokondriyal proteinlerin hasarlanmasının solunum yolu inflamasyonunu kötüleştirdiğini ve bronşiyal hiperreaktiviteye yol açtığını göstermiştir (75).

Mitokondri; plazma membranı, endoplazmik retikulum, lizozom ve çekirdek gibi pek çok organel ile etkileşimdedir ve böylece protein üretimi, sitozolik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun düzenlenmesi, proliferasyon, apoptoz gibi birçok hücrel fonksiyonu etkileyebilir. Bu bağlamda solunum yolu hastalıklarında mitokondriyal disfonksiyona yol açan faktörlerin anlaşılması için çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir (2). Ayrıca solunum yolu hastalıklarının tedavisinde mitokondriyi hedefleyen stratejiler gün geçtikçe önem kazanmaktadır (81).

## 2.5. Hidrojen Sülfür (H<sub>2</sub>S)

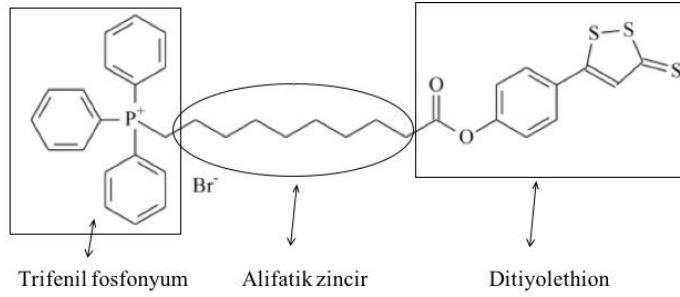
H<sub>2</sub>S; renksiz, yanıcı, suda çözünen, çürük yumurta kokulu bir gazdır (4). H<sub>2</sub>S memelilerin vücutlarında endojen olarak üretilmektedir ve NO, CO gibi gaz mediyatörlerden biridir. Endojen H<sub>2</sub>S sentezi L-sistein amino asidinin enzimatik olarak desülfürizasyonu ile gerçekleşmektedir ve başlıca üç adet enzim tarafından katalize edilmektedir: sistatyonin- $\gamma$ -liyaz (CSE), sistatyonin- $\beta$ -sentetaz (CBS), 3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz (3-MST) (6, 82). CBS santral sinir sistemi ve karaciğerde yoğun olarak bulunurken CSE esas olarak kardiyovasküler sistemde H<sub>2</sub>S sentezinden sorumludur. 3-MST ise ağırlıklı olarak mitokondride lokalize olmaktadır (82).

Ekzojen H<sub>2</sub>S'nin fizyolojik ve farmakolojik etkilerini araştırmak için fizyolojik pH'da ortama H<sub>2</sub>S salıveren donör bileşikler kullanılır. Sülfür tuzları bu amaçla en yaygın kullanılan bileşiklerdir ve sodyum hidrojen sülfür (NaHS) bu bileşiklerin prototipi olarak kabul edilmektedir. Sülfür tuzları H<sub>2</sub>S'yi hızlı salıveren donörlerdir ve birkaç saniye içinde yüksek konsantrasyonda H<sub>2</sub>S salıverirler. Dokular ve hücreler kısa süre içinde yüksek konsantrasyonda H<sub>2</sub>S'ye maruz kalırlar (82, 83). Sülfür tuzlarının ardından H<sub>2</sub>S salıveren sentetik bileşikler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu bileşikler H<sub>2</sub>S'yi yavaş bir şekilde salıvererek endojen H<sub>2</sub>S etkilerini daha iyi taklit edebilirler. Donörden donöre farklılık göstermekle birlikte genellikle dakikalar içinde H<sub>2</sub>S salıvermeye başlarlar ve H<sub>2</sub>S konsantrasyonu birkaç saat boyunca sabit kalır (82).

### **2.5.1. Mitokondriye Hedeflendirilmiş Yavaş H<sub>2</sub>S Salıveren Donör AP39**

H<sub>2</sub>S'in fizyolojik etkilerinin araştırılması için fizyolojik ortamda H<sub>2</sub>S salıveren donörler kullanılmaktadır (82). Bu tez çalışmasında mitokondriye hedeflendirilmiş yavaş H<sub>2</sub>S salıveren donör olan AP39 kullanılmıştır. AP39, bir alifatik zincir ile birbirine bağlanan H<sub>2</sub>S salıveren ditiyoethion yapısı ve mitokondriye hedeflemeyi sağlayan trifenil fosfonyum (TPP<sup>+</sup>) kısımlarından oluşur (82, 84, 85). Bu yapının sentezinin amacı, TPP<sup>+</sup> 'nın mitokondride birikme eğiliminden yararlanarak H<sub>2</sub>S'yi mitokondriye hedeflemektir (84, 85).

Lipofilik yapıdaki TPP<sup>+</sup> katyonu hücrelerarası boşluktan 5-10 kat fazla olarak sitoplazmaya ve mitokondri membranı potansiyeline bağlı olarak sitoplazmadan 100-500 kat fazla mitokondride birikme eğilimindedir (84). TPP<sup>+</sup> katyonunun mitokondride akümüle olma özelliğinden yararlanılarak katyona çeşitli bileşikler bağlanarak mitokondriye hedeflendirilmektedir. Daha önce bu şekilde antioksidanlar (86), sitotoksik ajanlar (87), mitokondriyal kanal modüle edici bileşikler (88) ve NO (89) mitokondriye hedeflendirilmiştir. H<sub>2</sub>S için ise AP39 mitokondriye H<sub>2</sub>S hedeflemeyi sağlayan ilk bileşiktir (84).



**Şekil 2.2.** AP39'un kimyasal yapısı.

### 2.5.2. Solunum Sisteminde H<sub>2</sub>S'nin Rolü

H<sub>2</sub>S solunum sisteminde önemli bir mediyatördür ve fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonlarda rol alır. H<sub>2</sub>S sentezleyen enzimlerin, solunum yolu ve akciğer dokularındaki dağılımı türe ve hücre tipine göre değişmektedir. İnsan solunum yolu düz kasında CSE ve CBS proteinlerinin ekspresyonu gösterilmiştir (90). Sıçan akciğer dokularında solunum yolu düz kasında CSE'nin eksprese edilen ana enzim olduğu, fare akciğer dokularında ise endotel hücreleri, pulmoner damar ve solunum yolu düz kas hücrelerinde CSE ve CBS enzimlerinin eksprese edildiği bildirilmiştir (6).

H<sub>2</sub>S'nin çeşitli dokularda özellikle vasküler düz kas preparatlarında düz kas gevşetici etkileri gösterilmiştir (91). H<sub>2</sub>S'nin solunum yolu düz kası üzerindeki gevşetici etkileri de farklı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. İzole fare bronşiyal halka preparatlarında karbakol ön-kasılmasını takiben NaHS uygulanması güçlü bir gevşeme yanıtı indüklerken (51, 92), kobay bronşiyal halka preparatlarında zayıf bir gevşeme oluşturmuştur (92). İzole sıçan trakealarında asetilkolin veya yüksek konsantrasyonda potasyum klorür (KCl) ile oluşturulan ön-kasılma ardından NaHS uygulanması ise konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtı oluşturmuştur (93). NaHS ile oluşturulan gevşeme yanıtları ATP-bağımlı potasyum kanalının (K<sub>ATP</sub>) inhibe edilmesi, epitelin haraplanması, nitrik oksit sentaz, guanilil siklaz, siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimlerinin inhibisyonu ile önlenememiştir (92, 93). H<sub>2</sub>S'nin solunum sistemindeki etkilerinin hangi mekanizma ile gerçekleştiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

### 2.5.3. Solunum Yolu İnflamasyonunda H<sub>2</sub>S'nin Rolü

Solunum sisteminde KOAH, astım, pulmoner fibrozis, hipoksi ile indüklenen pulmoner hipertansiyon, akciğer iskemi-reperfüzyon hasarı ve akut akciğer hasarı gibi çeşitli patofizyolojik koşullarda endojen olarak üretilen H<sub>2</sub>S metabolizmasındaki değişikliklerin rolü olduğu bildirilmiştir (6).

H<sub>2</sub>S'nin deneysel çalışmalarda hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar etkileri olduğu bildirilmiştir. Farklı H<sub>2</sub>S donörleri kullanılarak yapılan çalışmalarda birbiriyle çelişen sonuçlar elde edilmiştir. Whiteman ve diğ., fare RAW264.7 makrofaj hücrelerini LPS ile inkübe ederek yürüttükleri çalışmada, yavaş salıveren H<sub>2</sub>S donörü GYY4137'nin LPS inkübasyonuna bağlı olarak artan IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NO üretimini azalttığı, NaHS uygulamasının ise pro-inflamatuar sitokinler üzerinde bifazik etki göstererek; yüksek konsantrasyonda IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  düzeylerini artırdığını göstermiştir. H<sub>2</sub>S'nin inflammatuar süreçteki etkilerinin H<sub>2</sub>S konsantrasyonuna ve salıverilme hızına bağlı olarak farklılık gösterdiği ileri sürülmektedir (94).

Farklı deneysel inflamasyon modellerinde plazma H<sub>2</sub>S konsantrasyonu ve doku CSE ekspresyon düzeyi ve H<sub>2</sub>S sentez kapasitesinin arttığı gösterilmiştir (95-97). Endotoksin ile indüklenen inflamasyon modelinde intraperitoneal LPS uygulaması ile plazma H<sub>2</sub>S konsantrasyonunun, karaciğer ve böbrek dokularında CSE enzim ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada intraperitoneal NaHS enjeksiyonunun akciğer inflamasyonu, akciğer ve karaciğerde miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin artışı, plazma TNF- $\alpha$  düzeyinin yükselmesine neden olduğu gösterilmiştir (95). Sıçanlarda ovalbumin ile indüklenen alerjik solunum yolu inflamasyonu modelinde akciğer dokusunda endojen H<sub>2</sub>S düzeyinin azaldığı ve NaHS uygulamasının eozinofil, nötrofil infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (98). Farklı bir çalışmada ise NaHS inhalasyonunun ovalbumin ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda mast hücre aktivasyonunu ve bronşiyal hiperreaktiviteyi önlediği bildirilmiştir (99). Sıçanda sigara dumanı ile indüklenen KOAH modelinde NaHS uygulaması solunum yolu hiperreaktivitesini, akciğerde patolojik skor, IL-8 ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonunu azaltmıştır (93). Akut akciğer hasarı modelinde H<sub>2</sub>S, nötrofil apoptozunu indükleyerek ve iNOS ekspresyonunu azaltarak anti-inflamatuar etki göstermiştir (83). Farede LPS ile indüklenen akciğer hasarı modelinde GYY4137

tedavisinin BAL sıvısında IL-1 $\beta$  and MIF-2 düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (100). Oleik asit uygulaması ile indüklenen akciğer hasarı modelinde de NaHS uygulaması IL-6, IL-8 seviyelerini azaltmış, anti-inflamatuar sitokin IL-10 seviyesini ise artırmıştır (83). Ozon inhalasyonu (101), viral enfeksiyon (102) ile indüklenen solunum yolu inflamasyonu modellerinde de H<sub>2</sub>S tedavisinin pro-inflamatuar sitokin düzeylerini azalttığı gösterilmiştir.

Mitokondriye hedeflendirilmiş H<sub>2</sub>S'i yavaş salıveren donör AP39'un inflamasyon üzerine etkilerine dair çalışmaların kısıtlı sayıda olması ile birlikte inflamasyonu azaltıcı yönde etkileri bildirilmiştir. Ahmad ve diğ., farede gerçekleştirilen yanık modelinde AP39'un akciğer dokusunda nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan MPO düzeyini azalttığını ve plazma IL-6 seviyesindeki artışı engellediğini göstermiştir (103). Böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında AP39 plazma IL-12 düzeyini düşürmüş, böbrek dokusunda MPO düzeyini ve interstisyuma nötrofil akümülyasyonunu ve hasarı azaltmıştır (85). Farede hemorajik şok modelinde AP39 sistemik inflamasyonu azaltmış plazma IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18 konsantrasyonunu düşürmüş, akciğer dokusunda iNOS ve I $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B inhibitör proteinleri) ekspresyonundaki artışı azaltmıştır ancak akciğer dokusunda IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 düzeylerindeki artışı önlememiştir (104).

## 2.6. Nitrik Oksit (NO) ve Solunum Sistemindeki Rolü

NO; endojen gaz mediyatörlerden biridir ve çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde ve solunum sistem hastalıkları da dahil olmak üzere pek çok patofizyolojik olayda rolü olduğu gösterilmiştir (105, 106). Endojen NO, L-arjinin amino asidinin nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından L-sitrülline dönüşümü sırasında üretilir. NOS enziminin insan vücudunda üç farklı izoformu gösterilmiştir ve bunların tümü solunum sisteminde tanımlanmıştır. Nöronal (nNOS) ve endotelial NOS (eNOS) izoformları yapısal olarak hücrelerde bulunmaktadır ve femtomolar veya pikomolar konsantrasyonda NO üreterek NO homeostazının kilit düzenleyicisi olarak fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol alırlar (107). nNOS, solunum yollarında non-adrenerjik non-kolinerjik sinir sisteminde ve solunum yolu epitelinde bulunmaktadır ve nNOS tarafından üretilen NO; NO/siklik guanozin monofosfat (cGMP) yolağı ile solunum yolu düz kas tonusunun kontrolünde önemli bir

nörotransmitterdir. eNOS ise solunum sisteminde trakea, bronş ve alveol epitelinde lokalize olmuştur (108). İndüklenebilir NOS (iNOS) ekspresyonu ise ilk olarak alveolar makrofajlarda gösterilmiştir ve solunum yollarında iNOS enziminin ana kaynağı alveolar makrofajlar olarak gösterilse de (105) bronş epiteli (108), bronş ve damar düz kası (109), mast hücreleri (110), endotel hücreleri (111) ve nötrofillerde (112) ekspresyonu gösterilmiştir. Solunum yollarında TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  gibi pro-inflamatuar sitokinler ve endotoksinler iNOS ekspresyonu ve aktivitesini artırır (107). Yapısal NOS izoformlarının aksine iNOS aktivasyonu ile sürekli ve fizyolojik konsantrasyonların üzerinde NO üretilir. Patolojik durumlarda iNOS kaynaklı NO üretimi 1000 kata kadar artabilir ve NO'nun düzenleyici ve koruyucu etkileri ortadan kalkar (105). İnflamatuar sitokinler ile indüklenen iNOS aktivasyonu sonucu düzeyi aşırı derecede artan NO'nun oldukça toksik bir bileşik olan peroksinitrit oluşumunu artırarak hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir (113, 114).

Deney hayvanları ve insanların solunum yollarında bronkomotor tonusun düzenlenmesinde klasik kolinerjik ve adrenerjik sistemlerin yanı sıra non-adrenerjik non-kolinerjik (NANC) sinir sistemi de rol oynamaktadır ve bu sistemin eksitatör kısmının (eNANC) aktivasyonu kontraksiyon, inhibitör kısmının (iNANC) aktivasyonu ise gevşemeye neden olmaktadır. NO; iNANC sistemin nörotransmitteridir ve solunum sisteminin fizyolojik düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (115). NO trakea ve bronş düz kasında gevşetici etkiye sahiptir (116). NO donörlerinin uygulanması bronkodilatasyona neden olurken, NOS inhibitörlerinin uygulanmasının izole sığır trakeasında elektriksel alan uygulaması veya farmakolojik agonistler ile indüklenen kasılma yanıtlarında artışa yol açtığı bildirilmiştir (105, 117). NO uygulaması kobay ve tavşanda metakolin ile indüklenen bronkokonstriksiyonun azalmasına neden olmuştur (118, 119). eNOS<sup>-/-</sup> farelerin ise inhale metakolin ile indüklenen bronkokonstriksiyona daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (120). Ovalbumin ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda, eNOS aşırı ifade eden farelerde solunum yolu hiperreaktivitesinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (121).

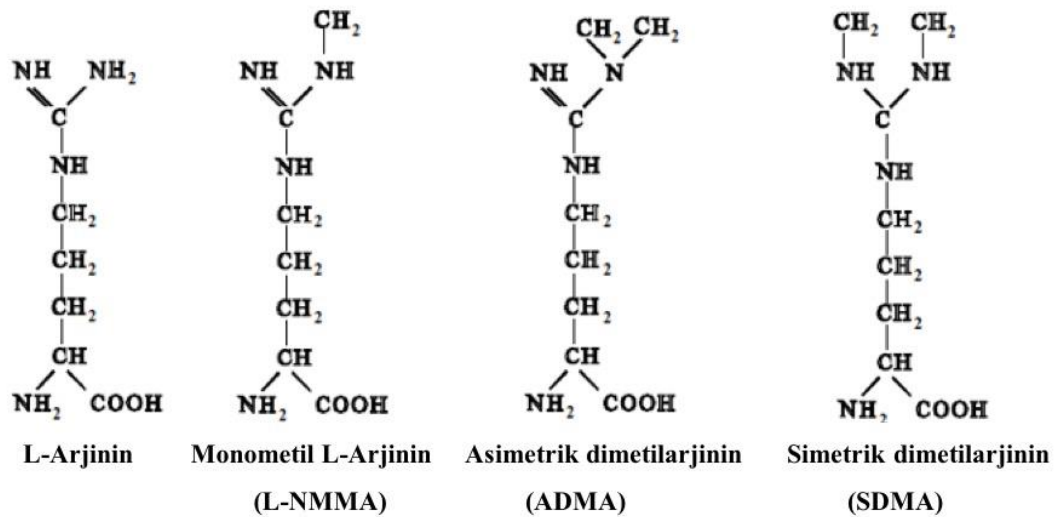
NOS enziminin üç izoformu da solunum sisteminde eksprese edilmektedir ve her üçü de solunum yollarının fizyolojisinin düzenlenmesine katılmaktadır. Bu enzimlerden birinin aktivitesindeki değişiklik NO seviyesinin değişmesine yol açar ve çeşitli solunum yolu hastalıklarının patogenezinde rol oynar (105). Bu nedenle



solunum yollarında NO düzeyinin regülasyonunda rol oynayan mediyatörlere dair araştırmalar ve bu mediyatörlerin yer aldığı yolları hedefleyen terapötik yaklaşımlar yoğun olarak devam etmektedir.

### 2.7. NOS-Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA)- Dimetilarjinin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) (NOS-ADMA-DDAH) Yolağı

Metillenmiş arjinin rezidüleri olan N<sup>G</sup>-monometil-L-arjinin (L-NMMA), N<sup>G</sup>-dimetil-L-arjinin (asimetrik dimetilarjinin; ADMA) ve N<sup>G</sup>-N<sup>G</sup>-dimetil-L-arjinin (simetrik dimetilarjinin; SDMA), post-translasyonel olarak metillenmiş doku proteinlerinin proteolizi ile oluşurlar (7, 8).



Şekil 2.3. Metillenmiş arjinin rezidülerinin kimyasal yapısı.

L-NMMA ve ADMA endojen NOS inhibitörleridir ve nNOS, eNOS ve iNOS olmak üzere enzimin üç izoformunu da aktif bölge için L-arjinin ile yarışarak kompetitif olarak inhibe ederler (7, 8, 122, 123). Metillenmiş arjinin rezidüleri, proteinlerin arjinin amino asidinin yan zincirindeki azot atomunun protein-arjinin metiltransferazlar (PRMT) adı verilen bir enzim ailesi tarafından genellikle geri-dönüşsüz olarak metillenmesi ile oluşur. Metilarjinin grubu içeren proteinlerin yıkımı sonucu sitoplazmaya serbest metilarjinin rezidüleri salıverilir (7). ADMA katyonik amino asit taşıyıcılar (CAT) tarafından hücre içinden dolaşıma taşınabilir, diğer hücre ve dokular tarafından alınabilir ve dolayısı ile üretildiği dokudan farklı bölgede etki gösterebilir (124).

Plazmadan serbest metilarjininlerin temizlenmesi böbreklerden itrah ve hepatik metabolizma aracılığı ile gerçekleşmektedir. L-NMMA ve ADMA'nın %80'den fazlası dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından sitrülin ve sırasıyla monometilamin veya dimetilamine yıkılır (7, 8). DDAH enziminin DDAH-1 ve DDAH-2 olmak üzere iki izoformu izole edilmiştir. DDAH-1 beyinde yüksek miktarda ifade edilirken, DDAH-2 izoformu kalp, plasenta, böbrekler, nötrofil, makrofajlar gibi immün hücreler, dalak, timus, kemik iliğinde ifade edilmektedir (7). DDAH ekspresyonunun NOS ile ko-lokalize olduğu gösterilmiştir ve DDAH tarafından hücre içi ADMA düzeylerinin regülasyonunun NOS aktivitesini ve dolayısı ile NO'in etkilerini regüle etmek için önemli olduğu bildirilmiştir (7).

Metillenmiş arjinin rezidülerini demetilleyen enzimatik bir mekanizma bugüne kadar gösterilmemiştir. Hücre içi ve plazma metilarjininlerin ana kaynağı doku proteinlerinin yıkımıdır. Metilarjininlerin konsantrasyonu protein sentez ve yıkım hızı ve PRMT aktivitesi ile yakından ilişkilidir. Karaciğer gibi protein sentez ve yıkım hızı yüksek olan dokularda serbest metilarjinin türevlerinin düzeyi protein degradasyonuna bağlı olarak yükselmektedir. Hücresel stres, açlık, endotoksemi, diyabet gibi koşullarda anormal proteinlerin uzaklaştırılması için bu yolağın aktivitesi artmış ve serbest metilarjininlerin hücresel konsantrasyonlarının yükselmiş olabileceği bildirilmektedir (7).

### **2.7.1. Solunum Sisteminde ADMA' nın Rolü**

PRMT enzim ailesi üyelerinin fare akciğerinde bronş ve alveol epitelinde ifade edildiği bildirilmiştir. DDAH alt tiplerinin her ikisinin de mRNA ve proteinlerinin fare akciğerinde ifade edildiği (125), DDAH-2 alt tipi ifadesinin ise daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir (8).

Farelere intratrakeal olarak akut ADMA uygulamasının solunum yolu direncinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (126). Osmotik pompa kullanılarak sistemik ADMA düzeylerinin yükseltilmesinin solunum yolu direncini artırdığı, kompliyansını azalttığı bulunmuştur (127). ADMA' nın solunum yollarındaki fizyolojik fonksiyonlarda ve KOAH, astım, pulmoner fibrozis, pulmoner hipertansiyon gibi patofizyolojik fonksiyonlarda rolü olduğu düşünülmektedir. Ovalbumin ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda, farelerin akciğerlerinde kontrol grubundakilere

kıyasla PRMT2 enzimi protein düzeylerinin arttığı, DDAH-2 enzimi protein düzeylerinin ise azaldığı bildirilmiştir (128). Farklı bir deneysel çalışmada ise ovalbumin ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda sistemik ADMA uygulamasının akciğerlerdeki eozinofil ve nötrofil düzeylerini artırdığı bildirilmiştir (129).

Hem deney hayvanları üzerinde hem de insanlarda yapılan çalışmalarda; L-arjinin: ADMA oranının solunum yolu hiperreaktivitesi gelişmesi ve astım patogeneğinde önemli rol oynayabileceği ve L-arjinin biyoyararlanımını artıracak yaklaşımların inflamatuvar solunum yolu hastalıklarının tedavisinde faydalı olabileceği öne sürülmüştür (8). Pulmoner ADMA metabolizmasının modülasyonunun KOAH gibi kronik inflamatuvar solunum yolu hastalıklarının tedavisinde yeni bir tedavi yaklaşımı sunabileceği bildirilmiştir (130).

### **2.7.2. ADMA' nın İnflamasyon Üzerine Etkileri**

İnflamatuvar durumlarda plazma ve doku örneklerinde ADMA düzeyi artmaktadır. Pediatrik astım hastalarından alınan balgam örneklerinde ADMA düzeyinin sağlıklı bireylerden alınan örneklere göre 2-4 kat arttığı gösterilmiştir (126). Ovalbumin veya LPS ile indüklenen farklı deneysel solunum yolu inflamasyonu modellerinde akciğer homojenatı veya BAL sıvısında ADMA düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (125, 126, 128, 131). Farelerde sigara dumanına maruziyet sonrasında da serum ADMA düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (130).

LPS ile stimüle edilmiş fare peritoneal RAW 264.7 ve alveolar makrofaj hücrelerinde ADMA, NF- $\kappa$ B aktivitesini inhibe etmiş ve iNOS mRNA ve protein ekspresyonunu baskılamıştır (132). Bu çalışmanın aksine solunum yolu epiteli hücrelerinin LPS, TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  ile birlikte ADMA ile inkübasyonu NF- $\kappa$ B aktivitesini ve iNOS proteini gen ekspresyonunu artırmıştır (129). Fare akciğer epitel hücre kültüründe sigara dumanı ekstraktı ile birlikte ADMA uygulamasının NF- $\kappa$ B aktivitesi ve TNF- $\alpha$  üretimindeki artış üzerine sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir (130). Hepatosit hücre kültüründe, hücrelerin ADMA ile inkübasyonun pro-inflamatuvar sitokinler TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 gen ekspresyonunu artırdığı, inflamasyon sinyal yolağında MAPK (p38 mitojen ile aktive edilen protein kinazlar), NF- $\kappa$ B

aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir (133). Ovalbumin ile indüklenen alerjik solunum yolu inflamasyonunda sistemik ADMA düzeyinin yükseltilmesi solunum yollarına infiltre olan inflamatuvar hücre sayısını artırdığı, alveollerdeki inflamasyonu potansiyalize ettiği ve solunum yolu epitel hücrelerinde iNOS ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (129). İnsan umbilikal ven endotel hücreleri ve insan koroner arter endotel hücrelerinin TNF- $\alpha$  ile inkübasyonunun ADMA akümülyasyonuna neden olduğu ve DDAH enzim aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (134, 135). Aort düz kas hücrelerinin IL-1 $\beta$  ile inkübasyonu DDAH enzimi ekspresyonu ve aktivitesini artırarak ADMA düzeyini azaltmış ve düşük ADMA düzeyi ile iNOS aktivitesi artmış ve NO düzeyi yükselmiştir (113). İnsan bronş epitel hücrelerinin IL-4 ile inkübasyonunun da PRMT-2 aktivitesini artırıp, DDAH-2 aktivitesini azaltarak ADMA düzeyinin yükselmesine neden olduğu bildirilmiştir (136).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyleerde erkek BALB/c fareler (10-12 haftalık, 18-25 g) kullanıldı. Araştırmalar Hacettepe Üniversitesi Deneş Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar No: 2017/16-8, 16-9).

#### 3.1. Doku Kültüründe Lipopolisakkarit (LPS) İnkübasyonu ile Oluşturulan *in vitro* Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu Modeli

Trakea halkaları ve akciğer dokuları solunum yolu inflamasyonu oluşturmak için fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS)'te çözünen LPS (10 µg/ml) ile inkübe edildi. Kontrol grubu ise aynı hacimde PBS ile inkübe edildi.

##### 3.1.1. Doku Kültüründe LPS İnkübasyonu ile Oluşturulan *in vitro* Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu Modelinde AP39 İnkübasyonu

Trakea halkaları ve akciğer dokularında LPS inkübasyonu ile oluşturulan *in vitro* kronik solunum yolu inflamasyonunda mitokondriye hedeflendirilmiş yavaş salıveren H<sub>2</sub>S donorü AP39 inkübasyonunun etkileri değerlendirildi. Bu amaçla dokular LPS ve PBS ile eş zamanlı olarak 10-300 nM konsantrasyonlarda AP39 ile inkübe edildi.

##### 3.1.2. Doku Kültüründe LPS İnkübasyonu ile Oluşturulan *in vitro* Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu Modelinde ADMA İnkübasyonu

Trakea halkalarında LPS inkübasyonu ile oluşturulan *in vitro* kronik solunum yolu inflamasyonunda ADMA inkübasyonunun etkileri değerlendirildi. Bu amaçla dokular LPS ve PBS ile eş zamanlı olarak 3-100 µM konsantrasyonlarda ADMA ile inkübe edildi.

#### 3.2. Deneş Protokolü

##### 3.2.1. Dokuların Hazırlanması ve Doku Kültürü

Fareler servikal dislokasyon ile ötanazi edildikten sonra trakeaları ve akciğer dokuları izole edildi. İzole edilen trakea halkaları penisilin (100 U/ml)-streptomisin

(100 mg/ml) karışımı içeren *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) bulunan petri kaplarına hızla alındı. Bu solüsyon içerisinde trakealar bağ dokusundan temizlenerek proksimal kısımlarından 4-6 kıkırdak içeren trakea halka preparatları hazırlandı. Her fareden bir trakea halkası izole edildi ve *unpaired* olarak çalışıldı. İzole edilen akciğer dokuları ise 10-20 mg olacak şekilde küçük parçalara ayrıldı. Trakea halkaları 300 µl DMEM içeren 96 gözlü eliza plaklarına, akciğer dokuları ise 2000 µl DMEM içeren 24 gözlü eliza plaklarına her kuyucukta bir doku olacak şekilde ayrı ayrı yerleştirildi. %5 karbon dioksit (CO<sub>2</sub>) içeren 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde dört gün boyunca inkübe edildi. Dört günlük inkübasyon süresi boyunca dokuların içinde bulunduğu DMEM her gün değiştirilerek tazelandı ve her seferinde maddeler taze DMEM içerisine eklendi.

### 3.2.2. Trakea Reaktivitesinin Ölçümü

Trakea halkaları ELISA plaklarından Krebs-Henseleit solüsyonu içeren petri kabına alındı. Petri kabı içerisinde organ askısına geçirildi ve 37 °C'de %95 oksijen (O<sub>2</sub>) - %5 CO<sub>2</sub> karışımı ile gazlandırılan, Krebs-Henseleit solüsyonu içeren organ banyolarına yerleştirildi. Trakea halkalarına 1 g bazal gerim uygulandı. Dokulardaki gerim değişiklikleri izometrik kuvvet transdüseri aracılığı ile "MP150-Biopac data acquisition system" ve Acknowledge 4.2" programı ile kaydedildi.

İzole organ banyosunda trakea halkaları 1 saat boyunca dinlendirildi. Deney süresince dokular her 15 dakikada bir Krebs-Henseleit solüsyonu ile yıkandı. Bir saatlik dinlenme periyodu sonrası her bir trakea halkasının kontraktıl kapasitesi 15 dakika aralıkla iki kez 60 mM potasyum klorür (KCl) çözeltisi eklenerek yaklaşık 15 dakika boyunca platoya ulaşana kadar alınan kasılma yanıtı ile değerlendirildi. Krebs-Henseleit solüsyonuna indometazin (3x10<sup>-6</sup> M) ilave edildi ve deney protokolü boyunca indometazin içeren solüsyon kullanıldı. Tüm kasılma ve gevşeme yanıtları agonistlerin izole organ banyosuna kümülatif olarak eklenmesi ile alındı. Agonistler ile alınan konsantrasyon-bağımlı yanıtlar arasında trakea halkaları 1 saat yıkanarak dinlendirildi.

### 3.2.3. Karbakol, 5-HT ve Bradikinin ile İndüklenen Kasılma Yanıtlarının İncelenmesi

Trakea halkalarında önce karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtı alındı. Ardından dokular 1'er saat yıkanarak dinlendirildikten sonra sırasıyla 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ve bradikinin ( $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  M) ile konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtları elde edildi.

### 3.2.4. İzoprenalin ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi

Trakea halkalarında karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile alınan konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtında maksimum kasılmanın yaklaşık %60-80'ine karşılık gelen konsantrasyonda ( $1 \times 10^{-7}$ - $3 \times 10^{-7}$  M) ön-kasılma oluşturulduktan sonra izoprenalin ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) ile konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları elde edildi.

### 3.2.5. Akciğer Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Dört günlük inkübasyon periyodunun sonunda akciğer dokuları cOmplete proteaz inhibitör kokteyli içeren PBS içerisinde, buz üzerinde ultrasonik doku homojenizatörü kullanılarak homojenize edildi. Ardından 20 dakika boyunca  $4^{\circ}\text{C}$ 'de  $15000 \times g$  hızda santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak inflamatuvar sitokin düzeyi ölçümü amacıyla kullanılana kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Süpernatantlarda Pierce sığır serum albumin kiti kullanılarak akciğer dokularındaki total protein konsantrasyonu tayin edildi.

### 3.2.6. Akciğer Homojenatlarında İnflamatuvar Sitokin Düzeyi Ölçümü

Akciğer homojenatlarında inflamatuvar sitokinler TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 konsantrasyonları ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) kitleri kullanılarak üreticinin (R&D Systems, Minneapolis, ABD) talimatlarına göre ölçüldü. Fare TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  veya IL-6 'sına özgü monoklonal antikolar kaplanmış 96 gözlü ELISA plaklarında üretici tarafından sağlanan standartlar ve akciğer homojenatları ilgili kuyucuklara eklendi ve örneklerdeki sitokinlerin kuyucuğun tabanına kaplanmış olan monoklonal antikora bağlanması sağlandı. Kuyucuklar yıkanarak bağlanmamış maddeler uzaklaştırıldı ve kuyucuklara bir enzimle konjuge edilmiş fare TNF- $\alpha$ , IL-

1 $\beta$  veya IL-6 'sına özgü poliklonal antikor eklendi. Kuyucuklar tekrar yıkanarak bağlanmamış maddeler uzaklaştırıldı ve substrat solüsyonu eklenerek enzimle konjuge edilmiş antikorun enziminin substrat eklenince oluşturduğu rengin şiddeti spektrofotometrede okundu. Standart dilüsyonlarından standart bir eğri hazırlandı ve akciğer homojenatlarındaki sitokin konsantrasyonları bu standart eğriye göre belirlendi.

### **3.3. LPS ile indüklenen Deneysel *in vivo* Solunum Yolu İnflamasyonu**

Farelerde *in vivo* solunum yolu inflamasyonu oluşturmak için, PBS'te çözülen LPS (0,1 mg/ml) 60  $\mu$ l hacminde intranazal (i.n.) yoldan uygulandı. Kontrol grubuna ise aynı hacimde PBS intranazal olarak uygulandı. İntranazal uygulama farelerin ense derisi sıkıca kavranıp tutularak sabitlendikten sonra burun deliklerine bir pipet yardımıyla uygulanacak solüsyonun damla damla damlatılarak solutulmasıyla gerçekleştirildi. PBS ve LPS uygulamalarından 48 saat sonra fareler ketamin (100 mg/kg)/ksilazin (10 mg/kg) ile anestezide edilerek solunum yolu fonksiyonları *in vivo* olarak değerlendirildi, bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısı elde edildi ve akciğerleri izole edildi.

#### **3.3.1. LPS ile İndüklenen Deneysel *in vivo* Solunum Yolu İnflamasyonunda İntranazal AP39 Tedavisi**

Farede LPS ile indüklenen *in vivo* solunum yolu inflamasyonunda H<sub>2</sub>S tedavisinin etkisini değerlendirmek için farelere PBS ve LPS uygulamalarından 1 saat önce ve 24 saat sonra mitokondriye hedeflendirilmiş yavaş H<sub>2</sub>S salıveren donör AP39 intranazal olarak uygulandı. H<sub>2</sub>S donörünün etkisini doza bağımlı olarak değerlendirmek amacıyla AP39 250 nmol/kg, 500 nmol/kg ve 1000 nmol/kg dozlarında uygulandı.

#### **3.3.2. LPS ile İndüklenen Deneysel *in vivo* Solunum Yolu İnflamasyonunda İntranazal ADMA Uygulaması**

Farede LPS ile indüklenen *in vivo* solunum yolu inflamasyonunda ADMA'nın rolünün araştırılması amacıyla solunum yollarındaki ADMA düzeyini yükseltmek için



farelere intranasal olarak ADMA uygulandı. ADMA uygulaması 30 mg/kg dozda ve LPS uygulamasından 1 saat önce ve 24 saat sonra olacak şekilde gerçekleştirildi.

### 3.3.3. Solunum Yolu Fonksiyonunun *in vivo* Ölçümü

PBS ve LPS uygulamalarından 48 saat sonra fareler solunum yolu fonksiyonlarının *in vivo* olarak değerlendirilmesi amacıyla intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanan ketamin (100 mg/kg)/ksilazin (10 mg/kg) ile anesteziye edildi. Farelerin trakealarına 1-2 mm'lik bir kesi yapılarak uygun büyüklükteki trakeal kanül takıldı ve hava sızıntısını önlemek için etrafı sütür ipliği ile bağlanarak kanüle edildi. Kanüle edilen fare vücut pletismograf haznesine yerleştirildi ve trakeal kanül ile ventilatöre bağlandı. Farelerin akciğerleri; solunum hızı 150/dakika, tidal volüm 200 µl, ekspirasyon sonu pozitif basınç 2 cm H<sub>2</sub>O olacak şekilde mekanik olarak ventile edildi. Solunum yolu direnci ve kompliyansında meydana gelen değişiklikler "Buxco Finepoint Resistance and Compliance System" ile kaydedildi. Farelerin bazal solunum yolu direnci ve kompliyansı 2 dakika boyunca kaydedildi. Daha sonra intratrakeal (i.t.) olarak PBS uygulandı ve solunum yolu direnci ve kompliyansında meydana getirdiği değişiklik ölçüldü. Ardından intratrakeal olarak metakolin (1,5–48 mg/mL) uygulanarak farelerin *in vivo* solunum yolu direncinde ve kompliyansında meydana getirdiği doza bağımlı artış ölçüldü. İntratrakeal uygulama için PBS ve metakolin dozları nebulizer başlığa 20 µl olacak şekilde eklendi ve 30 saniye boyunca aerosol halinde solunum yollarına gönderildi. PBS ve metakolin dozlarının oluşturduğu yanıt 3 dakika boyunca ölçüldü ve ardından sıradaki doz nebulize edildi. Solunum yolu direnci için her dozdan sonra ölçülen maksimum değer, kompliyans için ise minimum değer yanıt olarak kaydedildi.

Deneylerin bir grubunda ise anesteziye edilerek kanüle edilen ve ventilatöre bağlanan farelere, bazal solunum yolu direnci ve kompliyansı 2 dakika boyunca kaydedildikten sonra intratrakeal ADMA (200 nmol/kg) uygulanarak solunum yollarına gönderildi ve 15 dakika sonra metakolin (1,5 – 48 mg/mL) yanıtı alındı. Bu uygulamanın kontrolü olarak, kontrol ve LPS grubu farelere ADMA'nın çözücüsü olan PBS intratrakeal olarak uygulandı ve 15 dakika sonra metakolin (1,5 – 48 mg/mL) yanıtı alınarak PBS' in etkisi değerlendirildi.



**Şekil 3.1.** *In vivo* solunum yolu fonksiyonunun ölçümü.

### **3.3.4. Bronkoalveoler Lavaj (BAL) Sıvısı Örneklerinde İnflamatuvar Hücre Sayımı**

LPS ve PBS uygulamalarından 48 saat sonra, solunum yolu fonksiyonunun *in vivo* ölçümünün ardından farelerin trakeaları tekrar kanüle edilerek bu kanül yardımı ile 0,8 ml PBS farelerin akciğerlerine yavaşça gönderilip geri çekildi. Bu işlem üç kez tekrarlanarak BAL sıvısı elde edildi ve falkon tüplere alındı. Örnekler +4 °C'de 1200 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar lizis tamponu ile 2 dakika inkübe edildi ve PBS ile yıkanarak kırmızı kan hücreleri uzaklaştırıldı. Ardından PAP ve Giemsa ile boyanarak cam yüzeye püskürtüldü ve hücreler kör olarak sayıldı. Hücreler morfolojilerine göre makrofaj, lenfosit, nötrofil ve eozinofil olarak sayıldı.

### **3.3.5. BAL Sıvısı Örneklerinde İnflamatuvar Sitokin Düzeyi Ölçümü**

LPS ve PBS uygulamalarından 48 saat sonra elde edilen BAL sıvısı örneklerinde inflamatuvar sitokinler TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 konsantrasyonları ELISA kitleri kullanılarak üreticinin (R&D Systems, Minneapolis, ABD) talimatlarına göre 3.2.6 numaralı başlıkta anlatıldığı şekilde ölçüldü.

### **3.3.6. Histopatolojik Değerlendirme**

LPS ve PBS uygulamalarından 48 saat sonra fareler ötanazi edilerek akciğerleri izole edildi ve formaldehit (%10) ile fikse edildi. Dokulardan kesitler hazırlanarak hemotoksilen-eozin ile boyandı. Histopatolojik skorlamada parankimal ve

peribronşiyal inflamasyon değerlendirildi ve Tablo 3.1'e göre 0-4 arasında kör olarak skorlandı.

**Tablo 3.1.** Akciğer dokularında histopatolojik değerlendirme için yarı-kantitatif skorlama sistemi.

Skor	Parankimal/peribronşiyal inflamasyon derecesi
1	Az
2	Hafif
3	Orta
4	Şiddetli

### 3.3.7. Fluksomiks Analiz ile Mitokondri Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

Bu çalışmada  $^{18}\text{O}$  (oksijen-18) izotoplar kullanılarak glikolitik yolak ve mitokondride Krebs döngü hızları değerlendirildi ve fosfotransfer ağları ve fosforil metabolik dinamikler izlendi.  $^{18}\text{O}$  doğal ve kararlı bir izotoptur. İşaretlemede  $^{18}\text{O}$  kaynağı olarak  $^{18}\text{O}$  bakımından zenginleştirilmiş su kullanılmıştır ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ). Dokular,  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  içeren ortama maruz kaldıklarında,  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  hızlı bir şekilde hücre sel su ile dengeye ulaşır ve ilgili enzimatik reaksiyonların oranına bağlı olarak hücre sel fosfatmetabolitler  $^{18}\text{O}$  ile işaretlenir.

LPS ve PBS uygulamalarından 48 saat sonra farelerden akciğer dokuları izole edildi ve sol akciğer, içerisinde %30  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  içeren 3 mL Krebs-Heinseleit solüsyonu içerisinde 3 dakika bekletilerek dokuların işaretlenmesi sağlandı. İşaretleme süresi biten akciğer dokuları sıvı azota alınarak donduruldu ve deney gününe kadar  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Akciğer dokuları metanol içerisinde  $30\text{ }\mu\text{g}$  başına  $1\text{ }\mu\text{l}$  olacak şekilde buz üzerinde ultrasonik doku homojenizatörü kullanılarak homojenize edildi. Ardından 20 dakika boyunca  $4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de  $15000\times\text{g}$  hızda santrifüj edildi. Süpernatantların  $400\text{ }\mu\text{l}$ 'si alınarak vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçuruldu. Kurumuş numuneler  $20\text{ }\mu\text{l}$  metoksamin hidroklorür (piridin içinde,  $20\text{ mg/ml}$ ) ile etüvde  $30\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 90 dakika tutularak metoksillendirildi. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen numuneler üzerine  $80\text{ }\mu\text{l}$  N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamit+trimetilklorosilan (MSTFA + %1

TMCS) eklendi ve etüvde 37 °C'de 30 dakika bekletilerek türevlendirildi. Türevlendirilen numuneler silillenmiş gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) viallerine aktarıldı ve sonrasında DB5-MS kolon kullanılarak GC-MS sistemiyle analizleri Tablo 3.2'de belirtilen optimize edilmiş koşullarda gerçekleştirildi. GC-MS analizleri sonucunda elde edilen kompleks kromatogramlar ayrıştırıldıktan sonra piklerin alıkonma zamanları SpectConnect yazılımı kullanılarak düzeltildi ve veri matrisleri oluşturuldu. Metabolitlere ait pikler alıkonma indeksli Fiehn ve Golm Database kütüphaneleri kullanılarak aydınlatıldı. Metabolitlerin <sup>18</sup>O işaretlenme yüzdeleri hesaplandı.

**Tablo 3.2.** GC-MS için çalışma koşulları.

<b>Cihaz</b>	Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra
<b>Kolon</b>	DB5-MS kolon (30 m +10 m ön kolon; 0.25 mm iç çap ve 0.25 µm film kalınlığı)
<b>Fırın sıcaklık programı</b>	Fırın sıcaklığı artışı 60 °C'den (1 dakika tutulur), 325 °C'ye 10 °C/dakika artışla ulaşılır.
<b>Analiz süresi</b>	37.5 dk
<b>Enjeksiyon hacmi</b>	1 µl
<b>Taşıyıcı gaz</b>	Helyum 1 ml/dakika
<b>MSD geçiş sıcaklığı</b>	290 °C
<b>Çözücü gecikme süresi</b>	5.90 dakika
<b>Kütle aralığı</b>	50-650 dalton

### 3.3.8. Sülfür Metabolizmasına Ait Metabolitlerin Miktar Tayini

Sülfür metabolizmasında yer alan metabolitlerin (metiyonin, indirgenmiş glutatyon, sistin, sistein, glutatyon ve taurin) analizleri yüksek seçicilik ve hassasiyete sahip Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) cihazında gerçekleştirildi. Analizler, HILIC kolon (50 x 2,1 mm, 3 µm) ve hareketli faz olarak % 0.1 formik asit içeren su (Hareketli faz A) ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril (Hareketli faz B) karışımı kullanılarak gradient elüsyon ile gerçekleştirildi (Tablo 3.4). Kolon sıcaklığı 30 °C ve akış hızı 0,2 mL/dakikadır. Enjeksiyon hacmi 10 uL olarak belirlendi. Analizler LC-MS/MS (Shimadzu 8030) cihazı ile çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. MRM parametreleri Tablo 3.3'te

sunuldu. Örneklerdeki sülfür metabolitlerinin miktar tayini için kalibrasyon çözeltileri hazırlandı ve elde edilen değerler Tablo 3.5’te verildi.

**Tablo 3.3.** Sülfür metabolizmasına ait metabolitler ve parçalanma ürünleri.

Metabolitler	Ana iyon	Parçalanma ürünü	Bekleme süresi (msec)	Çarpışma enerjisi (eV)
Metiyonin	149,80	104,05	50,0	-15,0
İndirgenmiş Glutatyon	307,90	179,10	100,0	-13,0
Sistin	242,00	152,10	50,0	-15,0
Sistein	121,80	59,10	100,0	-22,0
Glutatyon	308,10	162,00	50,0	-19,0
Taurin	126,10	44,05	50,0	-20,0

**Tablo 3.4.** Gradient elüsyon.

Süre (dakika)	%A	B %
1	5	95
5	95	5
6	95	5
8	95	5
9	5	95
12	STOP	

**Tablo 3.5.** Sülfür metabolitlerine ait kalibrasyon aralığı ve denklemi.

Metabolitler	Aralık	Kalibrasyon denklemi
Metiyonin	0.001-2 ppm	$y = 4E+06x+197347$
Sistin	0.001-1 ppm	$y = 246641x + 526,09$
Sistein	0.001-0.1 ppm	$y = 647251x - 1191,5$
Glutatyon	0.001-2 ppm	$y = 4E+06x + 42511$
Taurin	0.01-0.5 pp	$y = 197222x + 7210,8$

LPS ve PBS uygulamalarından 48 saat sonra farelerden akciğer dokuları izole edildi ve sağ akciğer sıvı azota alınarak donduruldu, deney gününe kadar -80 °C’de saklandı. Akciğer dokuları metanol içerisinde 30 µg başına 1 µl olacak şekilde buz üzerinde ultrasonik doku homojenizatörü kullanılarak homojenize edildi. Ardından

20 dakika boyunca 4 °C’de 15000×g hızda santrifüj edildi ve süpernatantlar ayrıldı. Numunelerden 400 µl alınarak vakumlu santrifüjde tamamen kuruluğa kadar uçuruldu ve su:asetonitril (50:50, h/h) karışımı ile tekrar çözünür hale getirilerek ve LC-MS/MS sistemi ile yukarıda belirtilen koşullarda analizleri gerçekleştirildi.

### 3.4. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analizi

İzole trakea halkalarında karbakol kasılma yanıtı “gram” kasılma olarak, 5-HT ve bradikinin ile indüklenen kasılma yanıtları ise maksimum karbakol yanıtının yüzde (%)’si olarak verildi. İzoprenalin ile elde edilen gevşeme yanıtları, karbakol ile indüklenen ön-kasılmanın %’si olarak ifade edildi. Konsantrasyon-yanıt eğrilerinden agonistler ile elde edilen maksimum kasılma yanıtları  $E_{maks}$  (maksimum etki) değerleri olarak verildi.

Akciğer homojenatlarında inflamatuvar sitokin düzeyleri, akciğer dokusunun total protein konsantrasyonuna oranlanarak sunuldu.

Anesteziye edilerek entübe edilen ve intratrakeal metakolin ile alınan solunum yolu direnci (RI) yanıtları, PBS nebülizasyonu sonrası ölçülen bazal değerlere göre normalize edilerek sunuldu.

BAL sıvısı örneklerinde nötrofil hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak sunuldu. BAL sıvısı örneklerinde inflamatuvar sitokin düzeyleri “pg/ml” olarak verildi.

Akciğer örneklerinin histopatolojik değerlendirmesi yarı-kantitatif skorlama ile gerçekleştirildi ve parankimal ve peribronşiyal inflamasyon değerleri toplanarak toplam skor olarak sunuldu.

Fluksomiks analizde akciğer örneklerinde Krebs döngüsü metabolik ara ürünlerinin  $^{18}O$  ile işaretlenme yüzdeleri sunuldu.

Akciğer örneklerinde kükürt grubu taşıyan amino asit düzeyleri ppm olarak verildi.

Deneylelerden elde edilen değerler ortalama  $\pm$  standart hata (SH) olarak sunuldu. İstatistiksel analiz Students *t*-test, ANOVA *post hoc* Tukey ve histopatolojik skorlama için ise Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn’s kullanılarak gerçekleştirildi.  $P < 0,05$  ise ortalamalar arası fark anlamlı kabul edildi. Verilerin analizinde GraphPad Prism Version 6.01 (GraphPad Software Inc.) yazılımı kullanıldı.

### 3.5. Deneyleerde Kullanılan Solüsyonlar ve İlaçlar

Deneyleerde fizyolojik solüsyon olarak kullanılan Krebs-Henseleit solüsyonu NaCl (118 mM), KCl (4,7 mM), MgSO<sub>4</sub> (1,2 mM), CaCl<sub>2</sub> (2,5 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2 mM), NaHCO<sub>3</sub> (25,0 mM) ve glukozun (11,6 mM) distile suda çözümlenmesiyle hazırlandı.

LPS (*Escherichia coli* 0127:B8), PBS, indometazin, karbakol (karbamilkolin klorür), 5-hidroksitriptamin hidroklorür, bradikinin asetat, izoprenalin (izoproterenol hidroklorür), metakolin klorür (asetil-β-metilkolin klorür), kaptopril, N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimetilargininin dihidroklorür (ADMA), *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, D5796; 4500 mg/l D-glucose, 584 mg/l L-Glutamine), penisilin-streptomisin, dimetilsülfoksit (DMSO) Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A); 10-okso-10-(4-(3-tiokso-3H-1,2-ditiyol5il)fenoksi)desil)trifenilfosfonyum bromür (AP39) Cayman Chemicals (Ann Arbor, U.S.A.)'dan, cOmplete™ Mini Proteaz İnhibitör Kokteyli Roche (Roche Diagnostics, Laval, PQ, Canada)'den temin edildi.

Ketamin, Alfamine® ve ksilazin, Alfazyme® Egevet Hayvancılık San. ve Ticaret Limited Şirketi'nden temin edildi.

İnflamatuar sitokin düzeyi ölçümü amacıyla kullanılan ELISA kitleri; "Quantikine ELISA Mouse IL-1β/IL-1F2 Immunoassay, katalog numarası: MLB00C", "Quantikine ELISA Mouse IL-6 Immunoassay, katalog numarası: M6000B" ve "Quantikine High Sensitivity ELISA Mouse TNF-α Immunoassay, katalog numarası: MHSTA50" R&D Systems'den (Minneapolis, ABD) temin edilmiştir.

PBS, bir adet tabletin 200 mL distile suda çözülmesi ile hazırlandı. LPS, ADMA ve metakolin PBS'te, kullanılan diğer ilaçlar distile suda hazırlandı. İndometazin ile birlikte aynı ağırlıkta sodyum bikarbonat tartıldı ve birlikte distile suda çözülerek hazırlandı.

AP39, doku kültüründe izole trakea halkaları ve akciğer dokularının inkübasyonunda PBS içerisinde %0.00067 oranında DMSO içerisinde çözülerek uygulandı. *In vivo* solunum yolu inflamasyonu modelinde ise PBS içerisinde %0,2 oranında DMSO'da çözülerek kullanıldı. Bu nedenle deneyleerde çözücü kontrolü yapıldı. Bu amaçla çözücü, *in vitro* doku kültürü deneylelerinde kültür ortamına eklendi ve *in vivo* solunum yolu inflamasyonu deneylelerinde ise farelere intranazal olarak

uygulandı. LPS grubunda çözücü uygulaması bu tez kapsamında araştırılan parametreler (organ banyosunda karbakol, 5-HT, bradikinin kasılma yanıtları, *in vivo* solunum yolu direnci, kompliyansı, BAL sıvısında nötrofil sayısı, sitokin düzeyleri, akciğer dokusunun histopatolojik skoru, Krebs döngüsü ara ürünleri ve kükürt grubu taşıyan amino asit düzeyleri) üzerine etki göstermedi. Ancak glukoz-6-fosfat düzeyinin ölçüldüğü deneylerde, çözücü uygulanan LPS grubu bulguları, çözücü uygulanmayan LPS grubuna göre farklılık göstermiştir. Dolayısıyla bu deneylerde AP39 ile tedavi edilen LPS grubu bulguları, çözücü uygulanan LPS grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

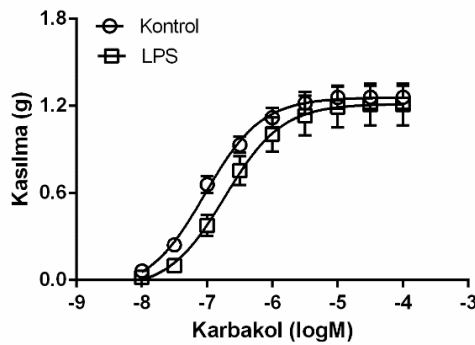


## 4. BULGULAR

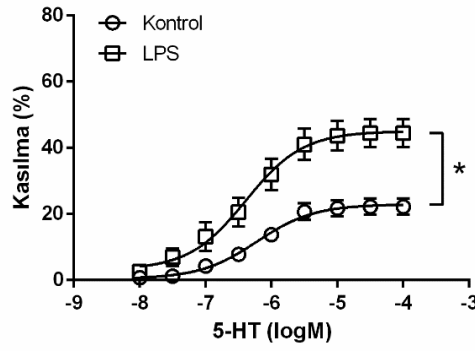
### 4.1. Doku Kültüründe LPS İnkübasyonu ile Oluşturulan *in vitro* Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu ve AP39 ile İnkübasyonun Etkileri

#### 4.1.1. Karbakol, 5-HT ve Bradikinin ile İndüklenen Kasılma, İzoprenalin ile İndüklenen Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

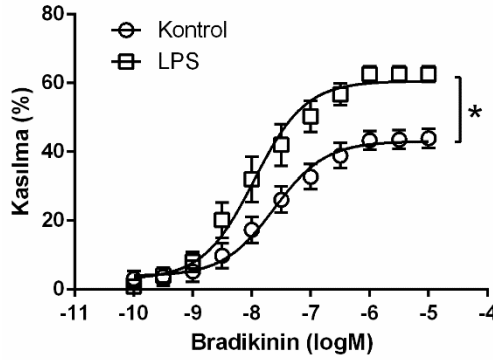
Trakea halkalarında sırasıyla karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$ ), 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$ ) ve bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$ ) ile indüklenen kasılma yanıtları alındı. Karbakol ile elde edilen kasılma yanıtları LPS (n=8) ve kontrol (n=11) gruplarında benzer bulundu ve  $E_{maks}$  değerleri sırasıyla  $1,21 \pm 0,14$  g ve  $1,26 \pm 0,08$  g olarak hesaplandı (Şekil 4.1 ve Tablo 4.1). Ancak 5-HT ile elde edilen kasılma yanıtlarında LPS inkübasyonu ile artış gözlemlendi ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.2 ve Tablo 4.1) ve  $E_{maks}$  değerleri sırasıyla  $\%44,45 \pm 4,25$  (n=8) ve  $\%22,26 \pm 2,45$  (n=11) olarak hesaplandı. Bradikinin ile elde edilen kasılma yanıtlarında da LPS grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldi ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.3 ve Tablo 4.1) ve LPS grubunda  $E_{maks}$  değeri  $\%62,63 \pm 2,51$  (n=11) ve kontrol grubunda ise  $\%43,94 \pm 2,75$  (n=10) olarak hesaplandı.



**Şekil 4.1.** Doku kültüründe kontrol grubu (n=11) ve LPS (10 µg/ml, n=8) grubu izole fare trakea halkalarında karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler 'g' cinsinden ifade edildi ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

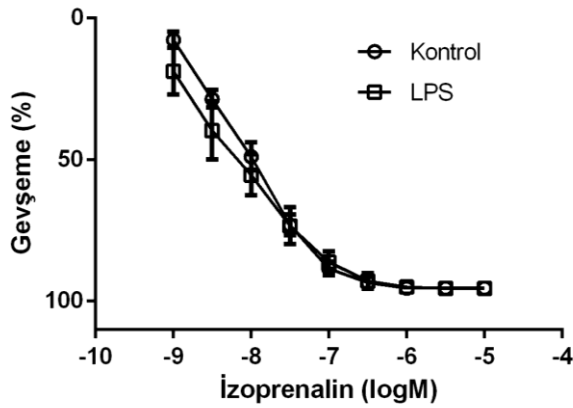


**Şekil 4.2.** Doku kültüründe kontrol grubu (n=11) ve LPS (10 µg/ml, n=8) grubu izole fare trakea halkalarında 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler maksimum karbakol kasılmasının %'si cinsinden ifade edildi ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).



**Şekil 4.3.** Doku kültüründe kontrol grubu (n=10) ve LPS (10 µg/ml, n=11) grubu izole fare trakea halkalarında bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler maksimum karbakol kasılmasının %'si cinsinden ifade edildi ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

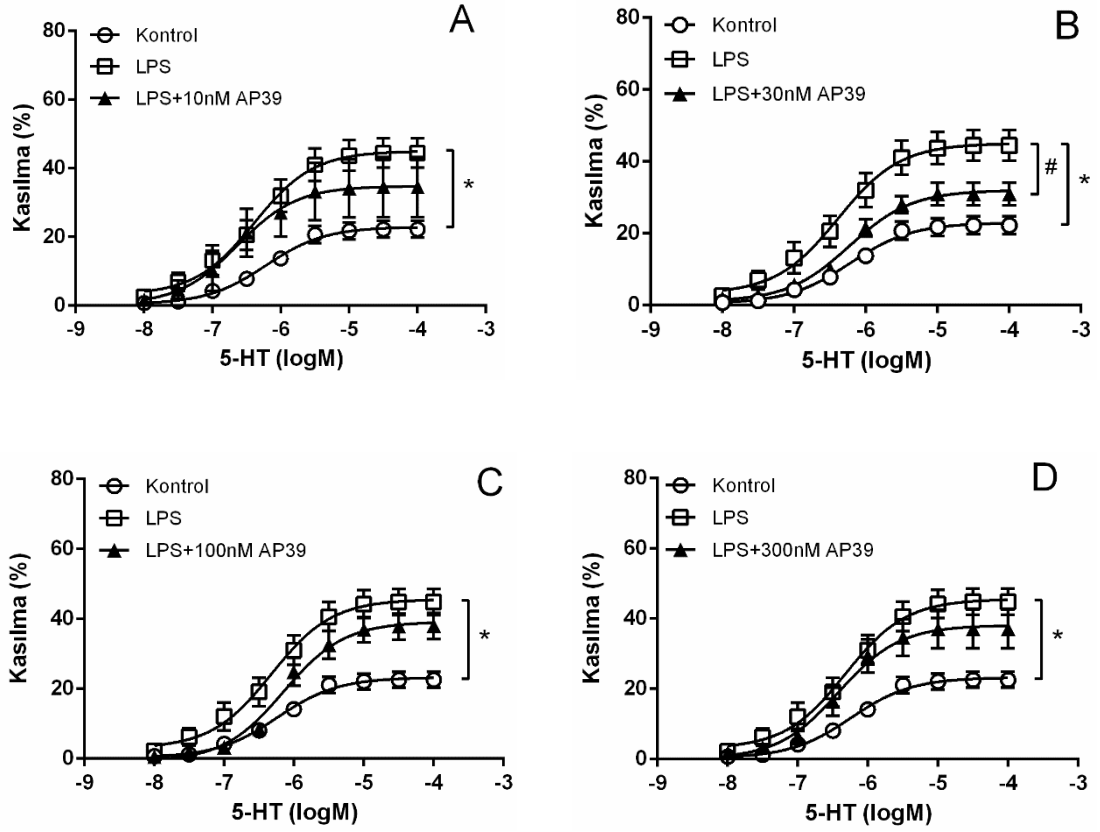
LPS ile inkübasyonun solunum yolunun gevşeme yanıtlarına etkisini incelemek için, dört gün boyunca kültür ortamında bulunan izole trakea preparatlarında karbakol ile ön-kasılma sonrası izoprenalin ile indüklenen gevşeme yanıtları değerlendirildi. LPS inkübasyonu izoprenalin ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtını değiştirmede ve maksimum gevşeme yanıtları benzer bulundu ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Doku kültüründe kontrol grubu (n=7) ve LPS (10 µg/ml, n=5) grubu izole fare trakea halkalarında izoprenalin ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları. Değerler karbakol ile indüklenen ön-kasılmanın %'si olarak ifade edildi ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

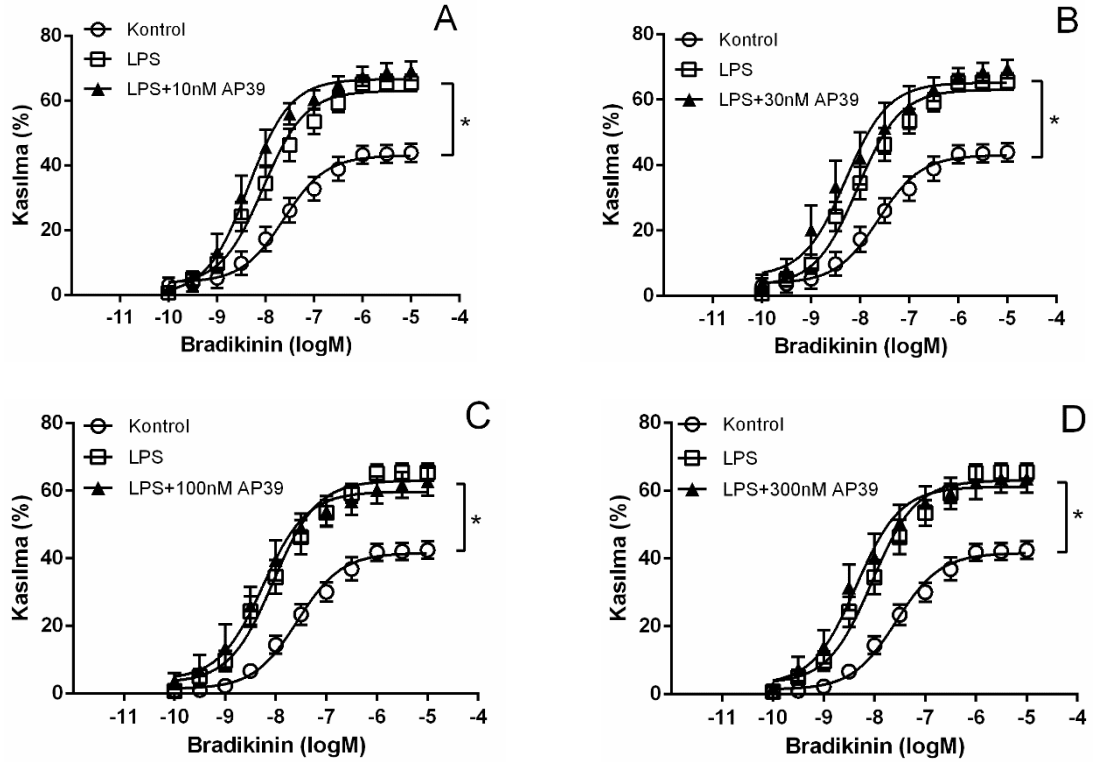
*In vitro* kronik solunum yolu inflamasyonunda LPS ile indüklenen solunum yolu hiperreaktivitesi üzerine H<sub>2</sub>S inkübasyonunun etkilerini incelemek amacıyla LPS grubu trakea halkaları 4 gün boyunca H<sub>2</sub>S'yi yavaş salıveren mitokondriye hedeflendirilmiş donör AP39 (10-300 nM) ile inkübe edildi. LPS grubunda karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile elde edilen kasılma yanıtlarında AP39 (10-300 nM) inkübasyonu anlamlı bir değişiklik oluşturmadı ( $P>0,05$ ) (Tablo 4.1).

10 nM AP39 inkübasyonu LPS grubunda 5-HT yanıtındaki artışı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmede ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.5A ve Tablo 4.1). LPS grubunda 5-HT kasılma yanıtındaki artışı 30 nM AP39 ile inkübasyon önledi ve konsantrasyon-yanıt eğrisi AP39 ile inkübe edilmeyen LPS grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.5B ve Tablo 4.1). AP39'un daha yüksek konsantrasyonları 100 ve 300 nM ile inkübasyon ise LPS grubunda 5-HT kasılma yanıtındaki artışı etkilemedi ve düşük konsantrasyonda (30 nM) görülen koruyucu etki ortadan kalktı (Şekil 4.5C ve D, Tablo 4.1).



**Şekil 4.5.** Doku kültüründe kontrol (n=11), LPS (10 µg/ml, n=8) ve 10 nM (A), 30 nM (B), 100 nM (C) ve 300 nM (D) AP39 ile inkübe edilen (n=6-7) LPS grubu izole fare trakea halkalarında 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler maksimum karbakol kasılmasının %'si cinsinden ifade edildi ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

LPS grubu trakea halkalarında bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile indüklenen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtındaki artışı AP39 (10-300 nM) inkübasyonu denenen hiçbir konsantrasyonda önlemedi ve konsantrasyon-yanıt eğrileri AP39 ile inkübe edilmeyen LPS grubundan farklı bulunmadı ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.6 ve Tablo 4.1).



**Şekil 4.6.** Doku kültüründe kontrol (n=10), LPS (10 µg/ml, n=8) ve 10 nM (A), 30 nM (B), 100 nM (C) ve 300 nM (D) AP39 ile inkübe edilen (n=6) LPS grubu izole fare trakea halkalarında bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler maksimum karbakol kasılmasının %'si cinsinden ifade edildi ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

**Tablo 4.1.** Doku kültüründe kontrol, LPS (10 µg/ml), AP39 (10-300 nM) ile inkübe edilen LPS ve çözücü ile inkübe edilen LPS grubu izole fare trakea halkalarında karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M), 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ve bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

Gruplar	$E_{maks}$		
	Karbakol kasılma yanıtı (g)	5-HT kasılma yanıtı (%)	Bradikinin kasılma yanıtı (%)
Kontrol	1,26 $\pm$ 0,08 (n=11)	22,26 $\pm$ 2,45 (n=11)	43,94 $\pm$ 2,75 (n=10)
LPS	1,21 $\pm$ 0,14 (n=8)	44,45 $\pm$ 4,25* (n=8)	65,53 $\pm$ 2,51* (n=8)
LPS+AP39 (10 nM)	1,02 $\pm$ 0,17 (n=6)	34,53 $\pm$ 8,69 (n=6)	69,20 $\pm$ 2,89 (n=6)
LPS+AP39 (30 nM)	0,91 $\pm$ 0,10 (n=7)	30,90 $\pm$ 3,16# (n=7)	69,46 $\pm$ 2,80 (n=6)
LPS+AP39 (100 nM)	1,34 $\pm$ 0,16 (n=6)	37,94 $\pm$ 3,72 (n=6)	62,75 $\pm$ 4,18 (n=6)
LPS+AP39 (300 nM)	1,12 $\pm$ 0,09 (n=6)	37,03 $\pm$ 5,54 (n=6)	63,65 $\pm$ 4,21 (n=6)
LPS+çözücü	1,09 $\pm$ 0,22 (n=6)	40,42 $\pm$ 1,68 (n=6)	66,62 $\pm$ 3,15 (n=6)

$E_{maks}$ : Agonistler ile indüklenen maksimum kasılma yanıtı. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

Kontrol grubunda ise karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M), 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ve bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen kasılma yanıtlarında AP39 (10-300 nM) inkübasyonu anlamlı bir değişiklik oluşturmadı ( $P>0,05$ ) (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Doku kültüründe kontrol ve AP39 (10-300 nM) ile inkübe edilen kontrol grubu izole fare trakea halkalarında karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M), 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ve bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

Gruplar	$E_{maks}$		
	Karbakol kasılma yanıtı (g)	5-HT kasılma yanıtı (%)	Bradikinin kasılma yanıtı (%)
Kontrol	1,26 $\pm$ 0,08 (n=11)	22,26 $\pm$ 2,45 (n=11)	43,94 $\pm$ 2,75 (n=10)
Kontrol +AP39 (10 nM)	1,00 $\pm$ 0,13 (n=4)	25,98 $\pm$ 6,69 (n=4)	49,53 $\pm$ 7,82 (n=3)
Kontrol +AP39 (30 nM)	1,27 $\pm$ 0,21 (n=5)	22,82 $\pm$ 6,24 (n=5)	42,83 $\pm$ 6,05 (n=4)
Kontrol +AP39 (100 nM)	1,51 $\pm$ 0,41 (n=3)	19,80 $\pm$ 5,40 (n=3)	44,67 $\pm$ 5,85 (n=3)
Kontrol +AP39 (300 nM)	1,83 $\pm$ 0,22 (n=3)	18,45 $\pm$ 9,95 (n=3)	48,75 $\pm$ 9,03 (n=3)

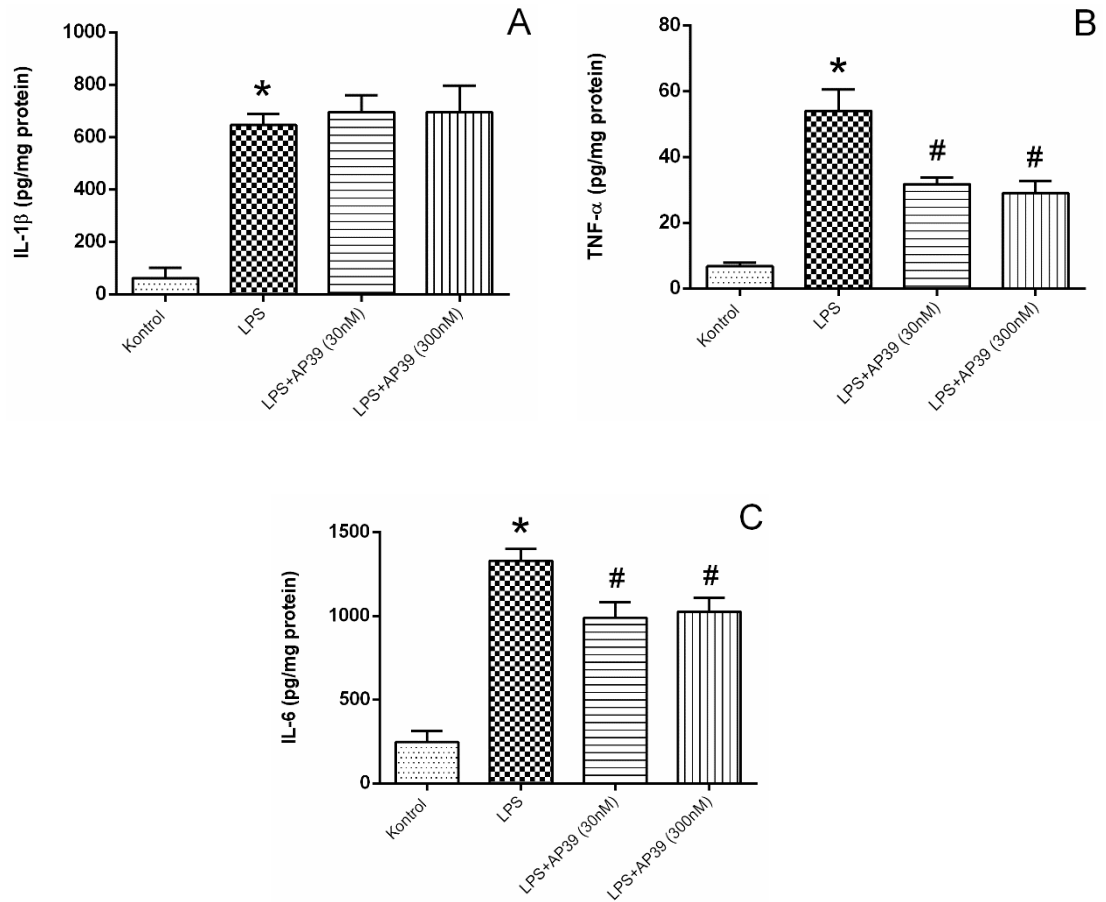
$E_{maks}$ : Agonistler ile indüklenen maksimum kasılma yanıtı.

#### 4.1.2. Pro-İnflamatuar Sitokin Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Doku kültüründe oluşturulan kronik solunum yolu inflamasyonunda inflamatuvar parametrelerin incelenmesi amacıyla kontrol ve LPS grubu akciğer dokularında TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 düzeyleri ölçüldü. LPS ile inkübe edilen akciğer dokularında IL-1 $\beta$  konsantrasyonu ( $645,95 \pm 42,57$  pg/mg protein, n=3), kontrol grubuna göre ( $62,46 \pm 38,64$  pg/mg protein, n=3) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttı ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.7A ve Tablo 4.3). LPS inkübasyonu akciğer dokularında TNF- $\alpha$  konsantrasyonunda ( $54,06 \pm 6,45$  pg/mg protein, n=6) kontrol grubu ( $6,75 \pm 1,10$  pg/mg protein, n=4) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtı ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.7B ve Tablo 4.3). LPS uygulaması akciğer dokularındaki IL-6 konsantrasyonunu da ( $1329,73 \pm 71,21$  pg/mg protein, n=7) kontrol grubuna göre ( $246,94 \pm 64,33$  pg/mg protein, n=4) anlamlı olarak artırdı ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.7C ve Tablo 4.3).

LPS ile indüklenen *in vitro* kronik solunum yolu inflamasyonunda pro-inflamatuar sitokin düzeyleri üzerine AP39 inkübasyonunun etkilerini incelemek

amacıyla LPS grubu akciğer dokuları 4 gün boyunca AP39 (30, 300 nM) ile inkübe edildi. LPS uygulanan akciğer dokularının AP39 (30, 300 nM) ile inkübasyonu, IL-1 $\beta$  konsantrasyonu üzerinde inkübe edilmeyenlere göre bir değişikliğe neden olmadı ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.7A ve Tablo 4.3). AP39 (30, 300 nM) inkübasyonu LPS grubu akciğer homojenatlarında TNF- $\alpha$  ve IL-6 konsantrasyonlarında ise LPS uygulamasına bağlı artışı önledi ve inkübe edilmeyenlerden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.7 B, C ve Tablo 4.3).



**Şekil 4.7.** Kontrol (n=3-4), LPS (10  $\mu$ g/ml, n=3-7) ve AP39 (30, 300 nM, n=6) ile inkübe edilen LPS grubu akciğer homojenatlarında IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B) ve IL-6 (C) düzeyleri. Değerler protein konsantrasyonuna oranlandı ve ortalama  $\pm$  SH olarak sunuldu. \*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, ( $P<0,05$ ).

**Tablo 4.3.** Doku kültüründe kontrol, LPS (10 µg/ml) ve AP39 (30, 300 nM) ile inkübe edilen LPS grubu akciğer dokularında IL-1β, TNF-α ve IL-6 düzeyleri. Değerler protein konsantrasyonuna oranlandı ve ortalama ± SH olarak sunuldu.

	<b>IL-1β</b> (pg/mg protein)	<b>TNF-α</b> (pg/mg protein)	<b>IL-6</b> (pg/mg protein)
Kontrol	62,46 ± 38,64 (n=3)	6,75 ± 1,10 (n=4)	246,94 ± 64,33 (n=4)
LPS	645,95 ± 42,57* (n=3)	54,06 ± 6,45* (n=6)	1329,73 ± 71,21* (n=7)
LPS+AP39 (30 nM)	695,16 ± 65,23 (n=6)	31,76 ± 1,99# (n=6)	989,80 ± 93,58# (n=6)
LPS+AP39 (300 nM)	694,65 ± 102,63 (n=6)	29,01 ± 3,62# (n=6)	1025,36 ± 81,92# (n=6)

\*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

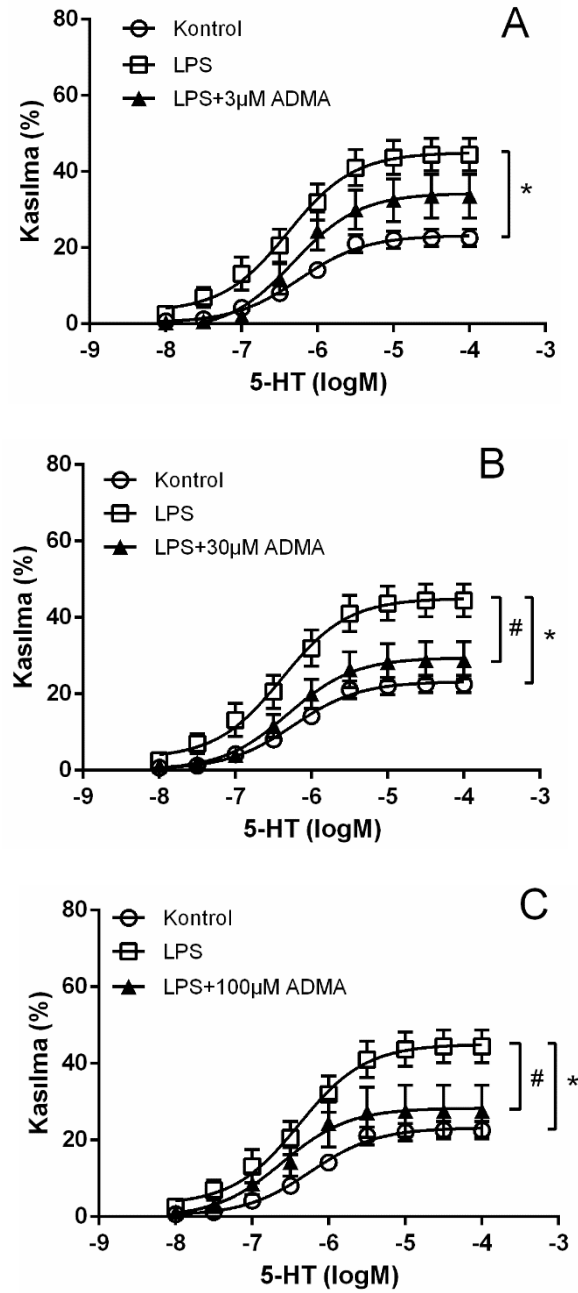
## 4.2. Doku Kültüründe LPS İnkübasyonu ile Oluşturulan *in vitro* Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu Modelinde ADMA İnkübasyonunun Etkileri

### 4.2.1. Karbakol, 5-HT ve Bradikinin ile İndüklenen Kasılma, İzoprenalin ile İndüklenen Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

*In vitro* kronik solunum yolu inflamasyonunda LPS ile indüklenen solunum yolu hiperreaktivitesi üzerine ADMA inkübasyonunun etkilerini incelemek amacıyla LPS grubu trakea halkaları 4 gün boyunca ADMA (3-100 µM) ile inkübe edildi. LPS grubunda karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile elde edilen kasılma yanıtlarında ADMA (3 – 100 µM) inkübasyonu anlamlı bir değişiklik oluşturmadı ( $P>0,05$ ) (Tablo 4.4).

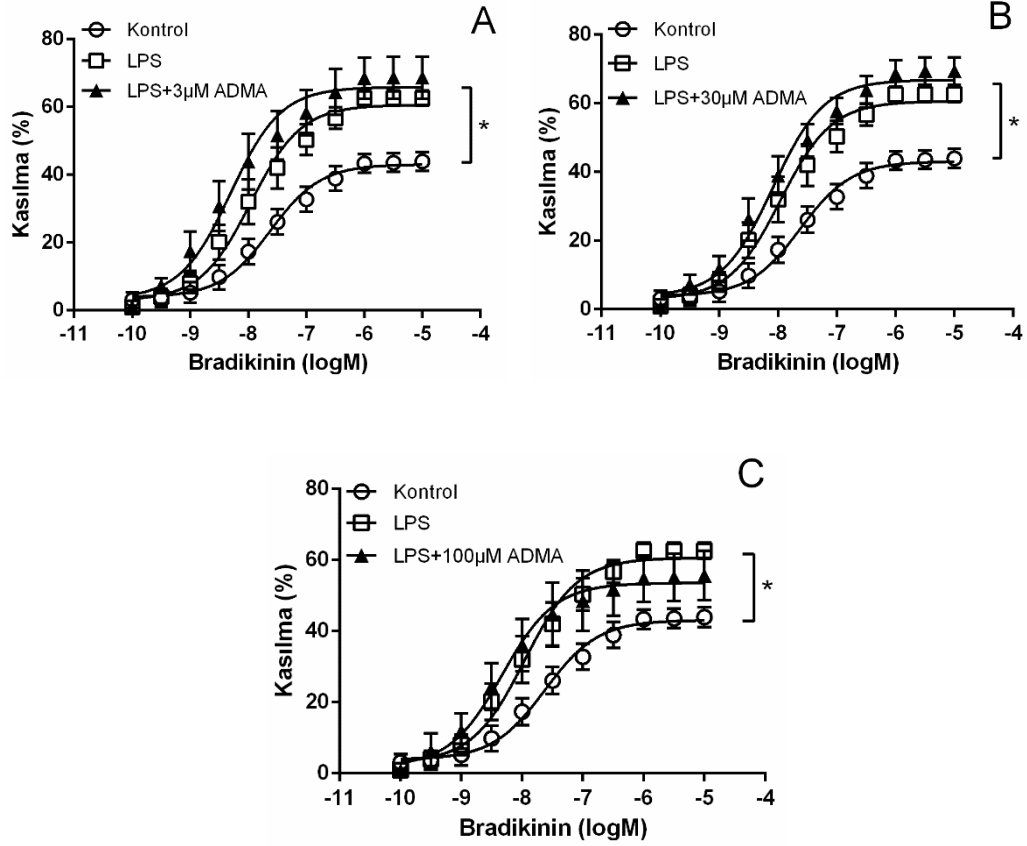
LPS grubunda 3µM ADMA inkübasyonu 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtını değiştirmede (Şekil 4.8A ve Tablo 4.4). 30µM ve 100µM konsantrasyonlarda ADMA ise 5-HT kasılma yanıtında LPS uygulamasına bağlı gelişen artışı önledi; ADMA ile inkübe edilmeyen LPS grubundan anlamlı olarak farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.8B ve C, Tablo 4.4).





**Şekil 4.8.** Doku kültüründe kontrol (n=11), LPS (10  $\mu$ g/ml, n=8) ve 3  $\mu$ M (A), 30  $\mu$ M (B), 100  $\mu$ M (C) ADMA ile inkübe edilen (n=6-8) LPS grubu izole fare trakea halkalarında 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler maksimum karbakol kasılmasının %'si cinsinden ifade edildi ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

LPS grubu trakea halkalarında bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile indüklenen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtındaki artışı ADMA (3-100  $\mu$ M) inkübasyonu önlemedi ve konsantrasyon-yanıt eğrileri ADMA ile inkübe edilmeyen LPS grubundan farklı bulunmadı ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.9 ve Tablo 4.4).



**Şekil 4.9.** Doku kültüründe kontrol (n=10), LPS (10  $\mu$ g/ml, n=8) ve 3  $\mu$ M (A), 30  $\mu$ M (B), 100  $\mu$ M (C) ADMA ile inkübe edilen (n=6-7) LPS grubu izole fare trakea halkalarında bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler maksimum karbakol kasılmasının %'si cinsinden ifade edildi ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

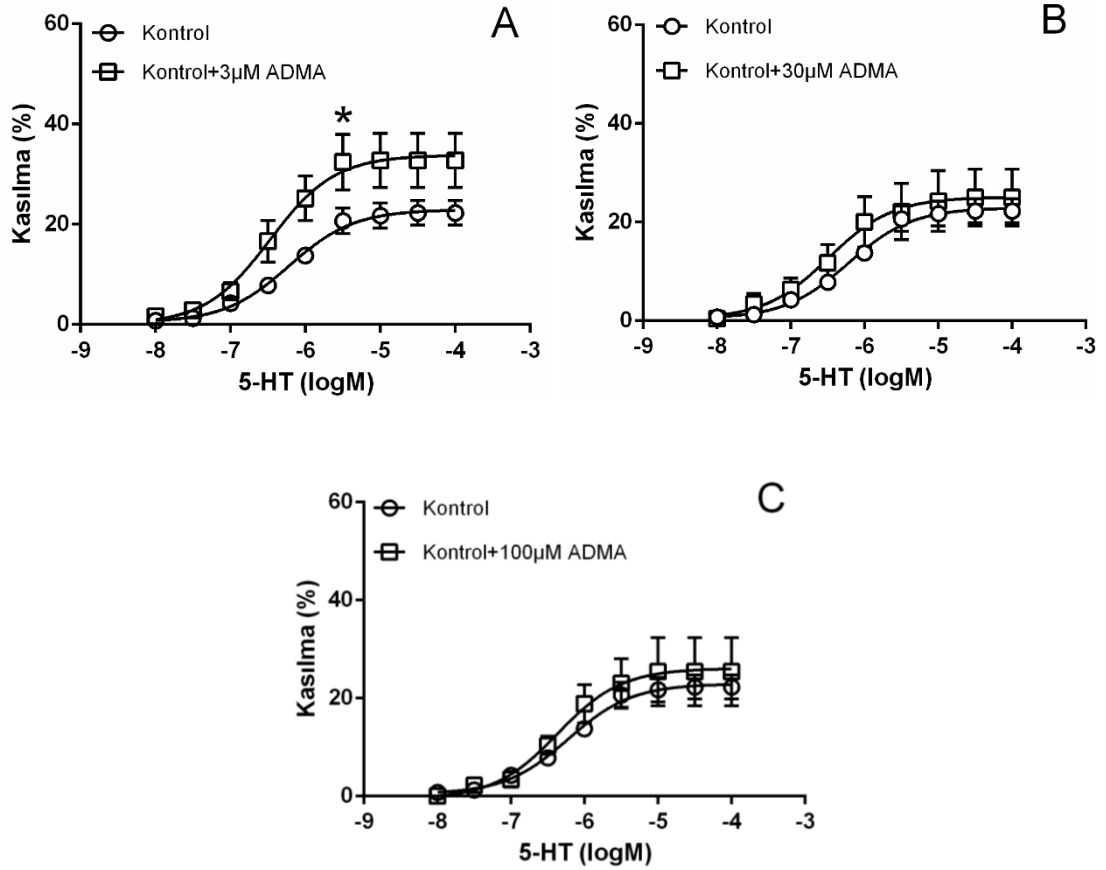
**Tablo 4.4.** Doku kültüründe kontrol, LPS (10 µg/ml) ve ADMA (3-100µM) ile inkübe edilen LPS grubu izole fare trakea halkalarında karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M), 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ve bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

Gruplar	$E_{maks}$		
	Karbakol kasılma yanıtı (g)	5-HT kasılma yanıtı (%)	Bradikinin kasılma yanıtı (%)
Kontrol	1,26 $\pm$ 0,08 (n=11)	22,26 $\pm$ 2,45 (n=11)	43,94 $\pm$ 2,75 (n=10)
LPS	1,21 $\pm$ 0,14 (n=8)	44,45 $\pm$ 4,25* (n=8)	65,53 $\pm$ 2,51* (n=8)
LPS+ADMA (3 µM)	1,15 $\pm$ 0,08 (n=6)	33,55 $\pm$ 5,73 (n=6)	68,72 $\pm$ 6,19 (n=6)
LPS+ADMA (30 µM)	1,11 $\pm$ 0,11(n=8)	28,79 $\pm$ 4,83# (n=8)	69,44 $\pm$ 4,01 (n=7)
LPS+ADMA (100 µM)	1,19 $\pm$ 0,17 (n=6)	27,55 $\pm$ 6,73# (n=6)	55,65 $\pm$ 6,93 (n=6)

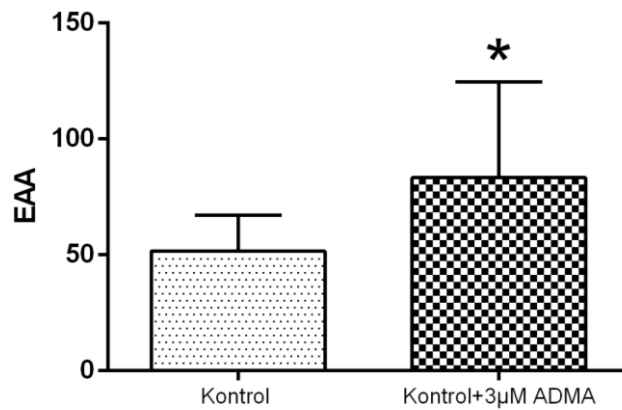
$E_{maks}$ : Agonistler ile indüklenen maksimum kasılma yanıtı. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

Doku kültüründe kontrol grubunda ADMA'nın trakeal reaktivite üzerine etkilerini incelemek amacıyla kontrol grubu trakea halkaları kültür ortamında ADMA (3 – 100 µM) ile inkübe edildi. ADMA (3 – 100 µM) inkübasyonu kontrol grubunda karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile elde edilen kasılma yanıtlarında anlamlı bir değişiklik oluşturmadı ( $P>0,05$ ) (Tablo 4.5).

3 µM ADMA inkübasyonu 5-HT ile elde edilen kasılma yanıtının  $E_{maks}$  değerini değiştirmezken,  $3 \times 10^{-6}$  M konsantrasyonda kontrol grubundan anlamlı olarak farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.10A). 3 µM ADMA ile inkübe edilen trakea halkalarında 5-HT ile indüklenen kasılma yanıtlarının eğri altında kalan alanları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.11). Kontrol grubu trakea halkalarının 30 ve 100 µM ADMA ile inkübasyonu ise 5-HT kasılma yanıtını değiştirmede; konsantrasyon-yanıt eğrileri ADMA ile inkübe edilmeyen kontrol grubundan anlamlı farklılık göstermedi ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.10B, C ve Tablo 4.5).

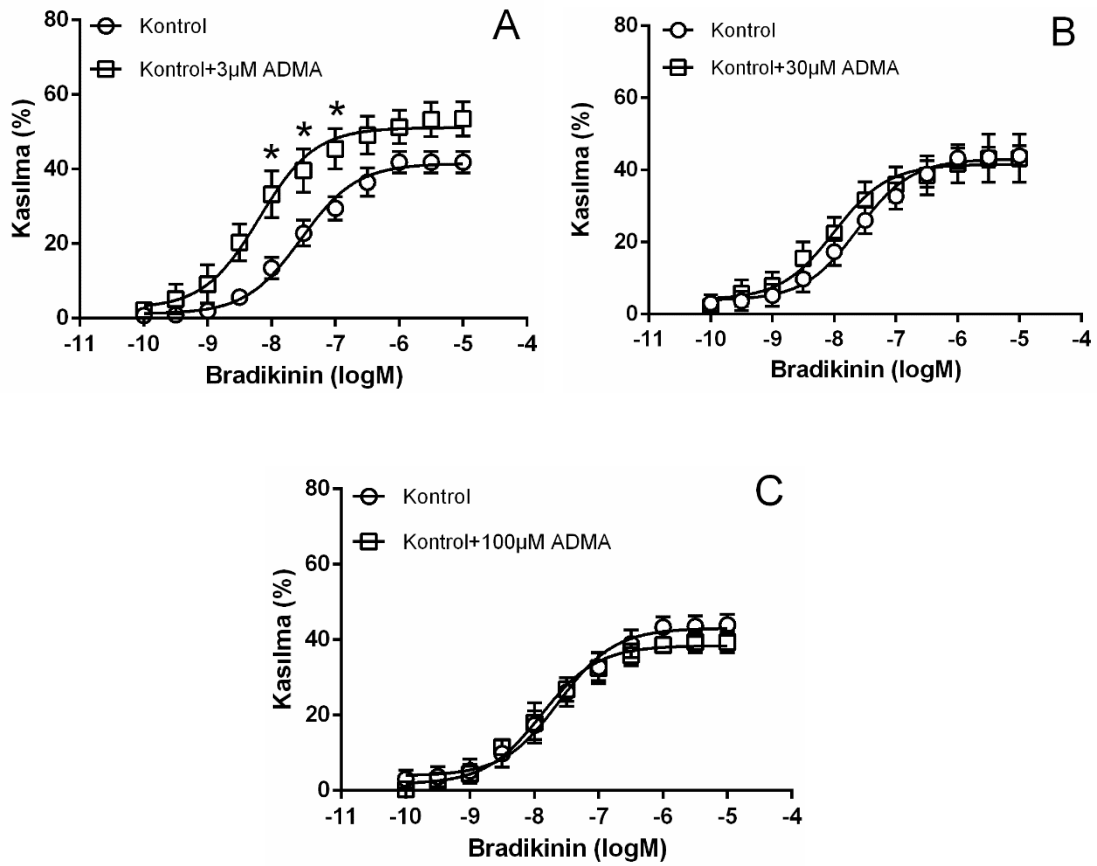


**Şekil 4.10.** Doku kültüründe kontrol (n=11) ve 3  $\mu$ M (A), 30  $\mu$ M (B), 100  $\mu$ M (C) ADMA ile inkübe edilen (n=3-8) kontrol grubu izole fare trakea halkalarında 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler maksimum karbakol kasılmasının %'si cinsinden ifade edildi ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P < 0,05$ ).

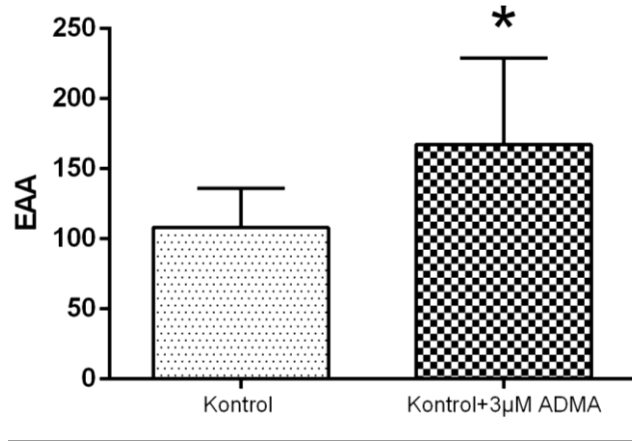


**Şekil 4.11.** Doku kültüründe kontrol (n=11) ve 3  $\mu$ M ADMA (n=8) ile inkübe edilen kontrol grubu trakea halkalarında 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtı eğrilerinin altında kalan alan (EAA). Değerler ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P < 0,05$ ).

Kontrol grubunda 3  $\mu\text{M}$  ADMA inkübasyonu bradikinin kasılma yanıtının  $E_{\text{maks}}$  değerini değiştirmezken;  $10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-8}$  ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarda kontrol grubundan anlamlı bir şekilde farklı yanıt elde edildi ( $P < 0,05$ ) (şekil 4.12A). 3  $\mu\text{M}$  ADMA ile inkübe edilen trakea halkalarında bradikinin ile indüklenen kasılma yanıtlarının eğri altında kalan alanları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $P < 0,05$ ) (şekil 4.13). 30 ve 100  $\mu\text{M}$  ADMA ile inkübasyon ise bradikinin kasılma yanıtını değiştirmede ve ADMA ile inkübe edilmeyen kontrol grubunun konsantrasyon-yanıt eğrisinden anlamlı farklılık göstermedi ( $P > 0,05$ ) (şekil 4.12 B ve C).



**şekil 4.12.** Doku kültüründe kontrol ( $n=10$ ) ve 3  $\mu\text{M}$  (A), 30  $\mu\text{M}$  (B), 100  $\mu\text{M}$  (C) ADMA ile inkübe edilen ( $n=3-8$ ) kontrol grubu izole fare trakea halkalarında bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler maksimum karbokol kasılmasının %'si cinsinden ifade edildi ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P < 0,05$ ).



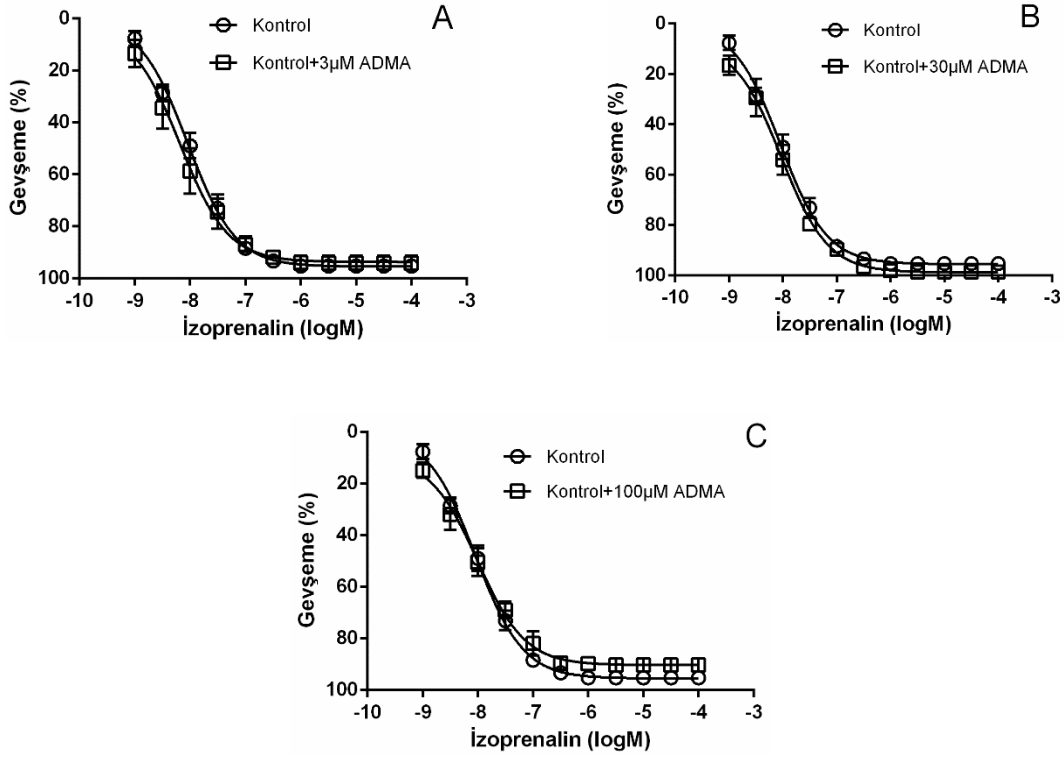
**Şekil 4.13.** Doku kültüründe kontrol (n=10) ve 3 µM ADMA (n=8) ile inkübe edilen kontrol grubu trakea halkalarında bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtı eğrilerinin altında kalan alan (EAA). Değerler ortalama ± SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P < 0,05$ ).

**Tablo 4.5.** Doku kültüründe kontrol ve ADMA (3-100 µM) ile inkübe edilen kontrol grubu izole fare trakea halkalarında karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M), 5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) ve bradikinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtları. Değerler ortalama ± SH olarak verildi.

Gruplar	$E_{maks}$		
	Karbakol kasılma yanıtı (g)	5-HT kasılma yanıtı (%)	Bradikinin kasılma yanıtı (%)
Kontrol	1,26 ± 0,08 (n=11)	22,26 ± 2,45 (n=11)	43,94 ± 2,75 (n=10)
Kontrol+ADMA (3 µM)	1,25 ± 0,09 (n=8)	32,79 ± 2,45 (n=8)	53,50 ± 4,57 (n=8)
Kontrol+ADMA (30 µM)	1,12 ± 0,1 (n=5)	25,00 ± 5,73 (n=5)	43,26 ± 6,67 (n=5)
Kontrol+ADMA (100 µM)	1,19 ± 0,24 (n=3)	25,43 ± 6,96 (n=3)	39,43 ± 2,79 (n=3)

$E_{maks}$ : Agonistler ile indüklenen maksimum kasılma yanıtı.

ADMA'nın solunum yolunun gevşeme yanıtı üzerine etkilerini incelemek amacıyla kontrol grubu trakea halkaların 3, 30 ve 100 µM konsantrasyonlarda ADMA ile inkübe edildi. ADMA (3-100 µM) trakea halkalarında izoprenalin ile elde edilen konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtını değiştirmede; konsantrasyon-yanıt eğrileri kontrol grubundan anlamlı farklılık göstermedi ( $P > 0,05$ ) (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** Doku kültüründe kontrol (n=10) ve 3  $\mu$ M (A), 30  $\mu$ M (B), 100  $\mu$ M (C) ADMA ile inkübe edilen (n=3-8) kontrol grubu izole fare trakea halkalarında izoprenalin ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) ile elde edilen konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları. Değerler karbakol ile indüklenen ön-kasılmanın %'si olarak ifade edildi ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

### 4.3. Farelerde LPS ile İndüklenen *in vivo* Solunum Yolu İnflamasyonu ve İntranazal AP39 Tedavisinin Etkileri

LPS ile indüklenen solunum yolu inflamasyonu oluşturmak için farelere intranazal yoldan LPS (0,1 mg/ml; 60  $\mu$ l), kontrol grubuna ise aynı hacimde PBS uygulandı. Solunum yolu inflamasyonunda H<sub>2</sub>S tedavisinin etkilerini incelemek amacıyla kontrol ve LPS grubu fareler, intranazal olarak mitokondriye hedeflendirilmiş yavaş H<sub>2</sub>S salıveren donör AP39 (250-1000nmol/kg) ile tedavi edildi.

#### 4.3.1. *In vivo* Bronşiyal Reaktivitenin Değerlendirilmesi

PBS uygulanan kontrol grubu ve solunum yolu inflamasyonu oluşturulan LPS grubu farelere intratrakeal olarak metakolin uygulanarak doz bağımlı yanıt alındı ve solunum yolu direnci (R<sub>I</sub>) ve kompliyansı (C<sub>dyn</sub>) parametreleri ölçülerek doz-yanıt eğrileri çizildi. Kontrol ve LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin uygulaması solunum yolu direncinde doz (1,5-48 mg/ml) bağımlı bir artış; solunum yolu

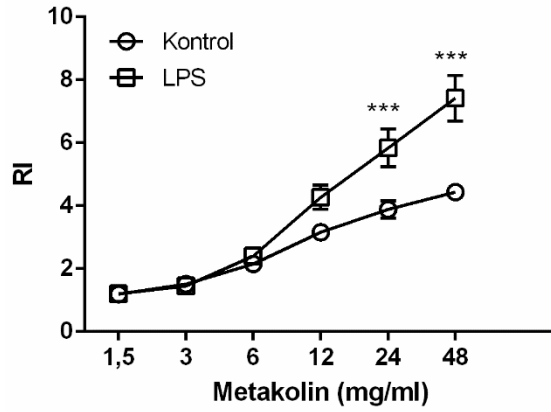
kompliyansında ise doz (1,5-48 mg/ml) bağımlı bir azalma meydana getirdi (Şekil 4.15).



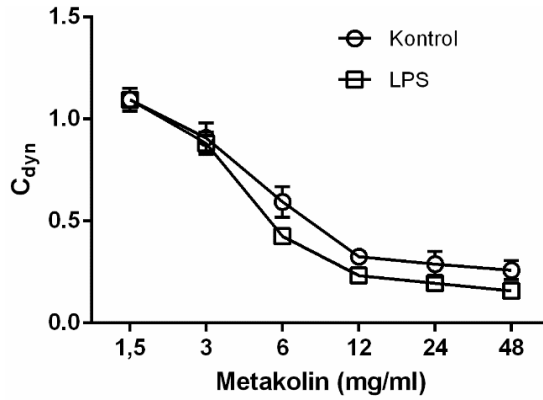
**Şekil 4.15.** *In vivo* solunum yolu direnci ölçümünde intratrakeal metakolin uygulaması ile solunum yolu direnci ve kompliyansında meydana gelen değişikliklere ait deney traseleri.

LPS grubunda elde edilen Ri doz-yanıt eğrileri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı bulundu ( $P<0.05$ ) ve maksimum değerler sırasıyla  $7,42 \pm 0,73$  ( $n=16$ ) ve  $4,44 \pm 0,25$  ( $n=14$ ) olarak hesaplandı (Şekil 4.16 ve Tablo 4.6).  $C_{dyn}$  doz-yanıt eğrileri LPS ve kontrol gruplarında benzer bulundu ve maksimum değerler sırasıyla  $0,16 \pm 0,01$  ( $n=16$ ) ve  $0,26 \pm 0,05$  ( $n=14$ ) olarak hesaplandı (Şekil 4.17).



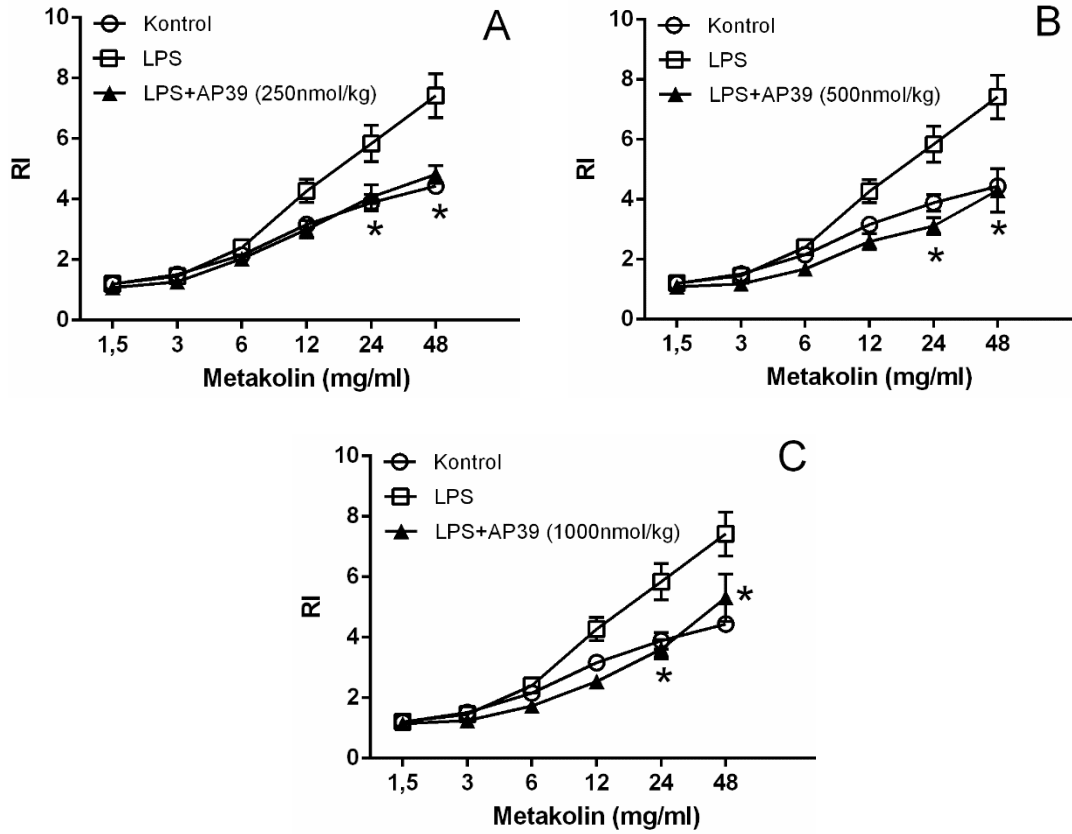


**Şekil 4.16.** Kontrol (n=14) ve LPS (0,1 mg/ml, n=16) grubu farelerde intratrakeal metakolin (1,5 – 48 mg/ml) ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu direnci (RI) yanıtları. Değerler PBS nebulizasyonu sonrası ölçülen bazal değere göre normalize edilerek sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*\*\*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,001$ ).



**Şekil 4.17.** Kontrol (n=14) ve LPS (0,1 mg/ml, n=16) grubu farelerde intratrakeal metakolin (1,5 – 48 mg/ml) ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu kompliyansı ( $C_{dyn}$ ) yanıtları. Değerler PBS nebulizasyonu sonrası ölçülen bazal değere göre normalize edilerek sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

AP39 tedavisinin bronşiyal reaktivite üzerine etkisi kontrol ve LPS grubu farelerde *in vivo* solunum yolu direncinin ölçülmesi ile değerlendirildi. LPS grubunda AP39 tedavisi (250-1000 nmol/kg) metakolin ile elde edilen doz-yanıt eğrisinde LPS uygulamasına bağlı artışı önledi ve doz yanıt eğrileri AP39 tedavisi uygulanmayan LPS grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.18 ve Tablo 4.6).



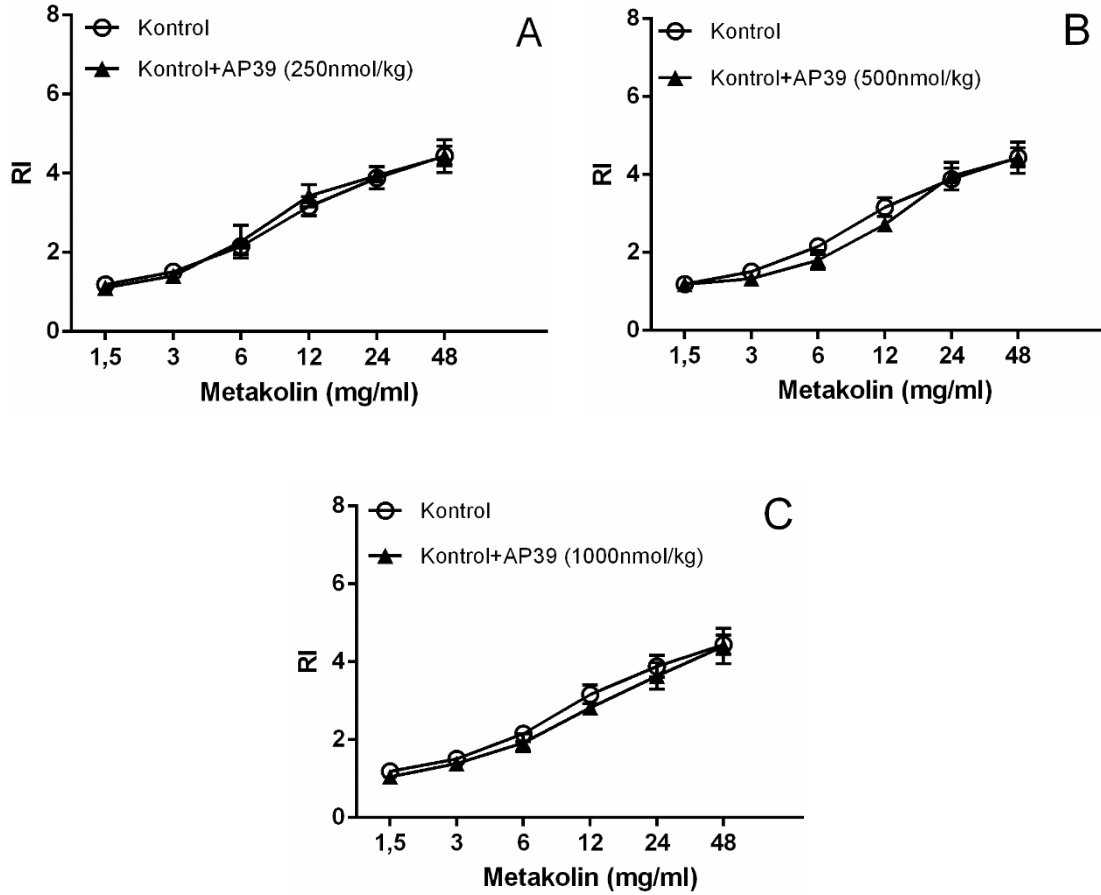
**Şekil 4.18.** Kontrol (n=14), LPS (0,1 mg/ml, n=16) ve 250 nmol/kg (A), 500 nmol/kg (B), 1000 nmol/kg (C) AP39 (i.n., n=6-7) tedavisi uygulanan LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin (1,5–48 mg/ml) ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu direnci (RI) yanıtları. Değerler PBS nebulizasyonu sonrası ölçülen bazal değere göre normalize edilerek sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*LPS grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

**Tablo 4.6.** Kontrol, LPS (0,1 mg/ml) ve AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.) ile tedavi edilen LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin (1,5 – 48 mg/ml) ile ölçülen maksimum solunum yolu direnci yanıtları. Değerler PBS nebulizasyonu sonrası ölçülen bazal değere göre normalize edilerek sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

Gruplar	$E_{maks}$	n
Kontrol	4,44 $\pm$ 0,25	14
LPS	7,42 $\pm$ 0,73*	16
LPS+AP39 (250nmol/kg)	4,82 $\pm$ 0,30 <sup>#</sup>	6
LPS+AP39 (500nmol/kg)	4,31 $\pm$ 0,73 <sup>#</sup>	7
LPS+AP39 (1000nmol/kg)	5,31 $\pm$ 0,79 <sup>#</sup>	6

$E_{maks}$ : İntratrakeal metakolin ile ölçülen maksimum solunum yolu direnci yanıtı. \*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, <sup>#</sup>LPS grubunun yanıtlarından anlamlı olarak farklıdır,  $P<0,05$ .

Kontrol grubuna uygulanan AP39 (250-1000nmol/kg) tedavisi solunum yolu direncinde anlamlı bir farklılığa neden olmadı ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.19 ve Tablo 4.7).



**Şekil 4.19.** Kontrol (n=14) ve 250 nmol/kg (A), 500 nmol/kg (B), 1000 nmol/kg (C) AP39 (i.n., n=4-6) tedavisi uygulanan kontrol grubu farelerde intratrakeal metakolin (1,5 – 48 mg/ml) ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu direnci (RI) yanıtları. Değerler PBS nebulizasyonu sonrası ölçülen bazal değere göre normalize edilerek sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

**Tablo 4.7.** Kontrol ve AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.) ile tedavi edilen kontrol grubu farelerde intratrakeal metakolin (1,5 – 48 mg/ml) ile ölçülen maksimum solunum yolu direnci yanıtları. Değerler PBS nebulizasyonu sonrası ölçülen bazal değere göre normalize edilerek sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

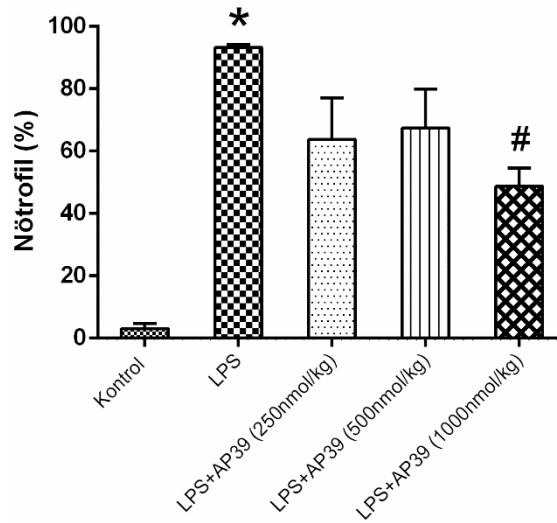
Gruplar	$E_{maks}$	n
Kontrol	$4,44 \pm 0,25$	14
Kontrol+AP39 (250nmol/kg)	$4,43 \pm 0,42$	5
Kontrol+AP39 (500nmol/kg)	$4,40 \pm 0,42$	4
Kontrol+AP39 (1000nmol/kg)	$4,40 \pm 0,45$	6

$E_{maks}$ : İnatrakeal metakolin ile ölçülen maksimum solunum yolu direnci yanıtı.

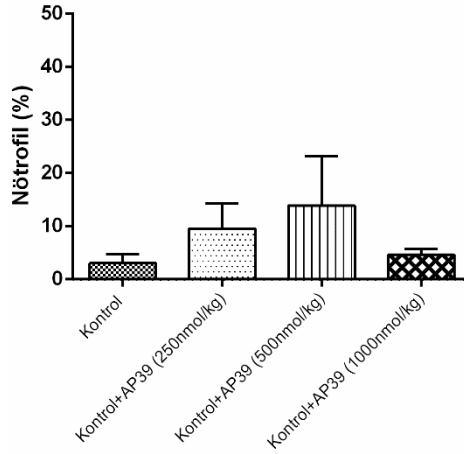
### 4.3.2. BAL Sıvısı Örneklerinde İnflamatuvar Hücre Sayımı

Kontrol ve LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvısı örneklerinde inflamatuvar hücre sayımı yapıldı. LPS grubu farelerin BAL sıvılarında nötrofil hücre sayısında ( $93,18 \pm 1,12$ ;  $n=5$ ) kontrol grubu ( $3,04 \pm 1,68$ ;  $n=5$ ) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.20 ve Tablo 4.8).

LPS ile indüklenen *in vivo* solunum yolu inflamasyonunda farelerden elde edilen BAL sıvılarındaki inflamatuvar hücre sayıları üzerine AP39 (250-1000nmol/kg, i.n.) tedavisinin etkileri araştırıldı. LPS grubunda AP39 tedavisi 250 ve 500 nmol/kg dozlarda tedavi uygulanmayanlara göre BAL sıvısındaki nötrofil sayısını değiştirmezken ( $P>0,05$ ), 1000 nmol/kg dozda tedavi uygulanmayanlardan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.20 ve Tablo 4.8). Kontrol grubunda ise AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.) tedavisi BAL sıvısı örneklerindeki nötrofil sayılarını etkilemedi ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.21 ve Tablo 4.8).



**Şekil 4.20.** Kontrol ( $n=5$ ), LPS (0,1 mg/ml,  $n=5$ ) ve AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.;  $n=6$ ) tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında nötrofil hücre sayısı. Değerler toplam hücre sayısının %'si olarak sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).



**Şekil 4.21.** Kontrol (n=5) ve AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.; n=4-5) tedavisi uygulanan kontrol grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında nötrofil hücre sayısı. Değerler toplam hücre sayısının %'si olarak sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

**Tablo 4.8.** Kontrol, LPS (0,1 mg/ml) ve AP39 (250-1000 nmol/kg; i.n.) tedavisi uygulanan kontrol grubu ve LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarındaki nötrofil sayıları. Değerler toplam hücre sayısının %'si olarak sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

Gruplar	Nötrofil (%)	n
Kontrol	3,04 $\pm$ 1,68	5
Kontrol+AP39 (250nmol/kg)	9,58 $\pm$ 4,75	5
Kontrol+AP39 (500nmol/kg)	13,88 $\pm$ 9,36	5
Kontrol+AP39 (1000nmol/kg)	4,62 $\pm$ 1,09	4
LPS	93,18 $\pm$ 1,12*	5
LPS+AP39 (250nmol/kg)	63,74 $\pm$ 13,42	6
LPS+AP39 (500nmol/kg)	67,41 $\pm$ 12,58	6
LPS+AP39 (1000nmol/kg)	48,77 $\pm$ 5,80 <sup>#</sup>	6

\*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, <sup>#</sup>LPS grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

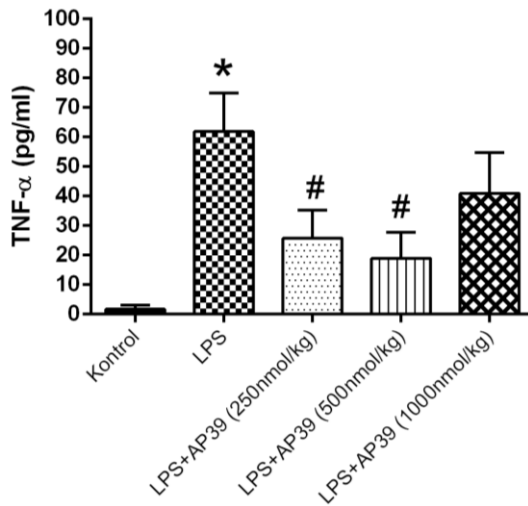
### 4.3.3. BAL Sıvısı Örneklerinde İnflamatuvar Sitokin Düzeyi Ölçümü

Kontrol ve LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvısı örneklerinde pro-inflamatuvar sitokinler TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeyleri ölçüldü. Farelere LPS uygulaması BAL sıvılarındaki TNF- $\alpha$  konsantrasyonunda (61,85 $\pm$ 13,02 pg/ml; n=7) kontrol grubu (1,73 $\pm$ 1,36 pg/ml; n=5) ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artışa yol açtı ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.22 ve Tablo 4.9). LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvısı örneklerinde

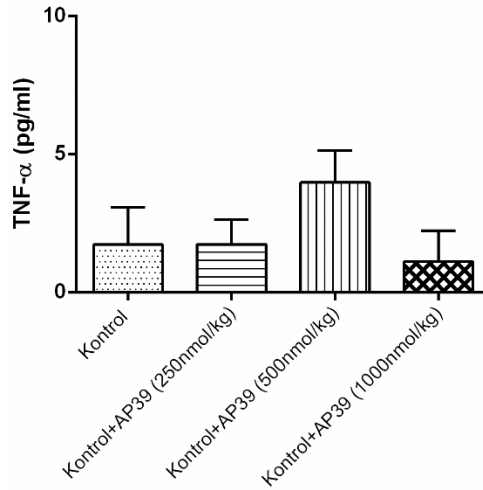
IL-6 konsantrasyonları ( $88,60 \pm 20,69$  pg/ml;  $n=6$ ) kontrol grubuna ( $2,13 \pm 0,75$  pg/ml;  $n=5$ ) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdi ( $P < 0,05$ ) (Şekil 4.24, Tablo 4.9).

Kontrol ve LPS gruplarındaki farelerden elde edilen BAL sıvılarındaki TNF- $\alpha$  ve IL-6 konsantrasyonları üzerine AP39 (250-1000 nmol/kg) tedavisinin etkileri incelendi. AP39 tedavisi 250 nmol/kg ve 500 nmol/kg dozlarda LPS grubu farelerin BAL sıvılarındaki TNF- $\alpha$  konsantrasyonundaki artışı tedavi uygulanmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde önledi ( $P < 0,05$ ) (Şekil 4.22 ve Tablo 4.9). LPS grubunda 1000 nmol/kg dozda AP39 tedavisi ise BAL sıvılarındaki TNF- $\alpha$  konsantrasyonunda tedavi uygulanmayanlara göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadı ( $P > 0,05$ ) (Şekil 4.22 ve Tablo 4.9). Kontrol grubu farelere AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.) tedavisi BAL sıvısı örneklerindeki TNF- $\alpha$  konsantrasyonunu etkilemedi ( $P > 0,05$ ) (Şekil 4.23 ve Tablo 4.9).

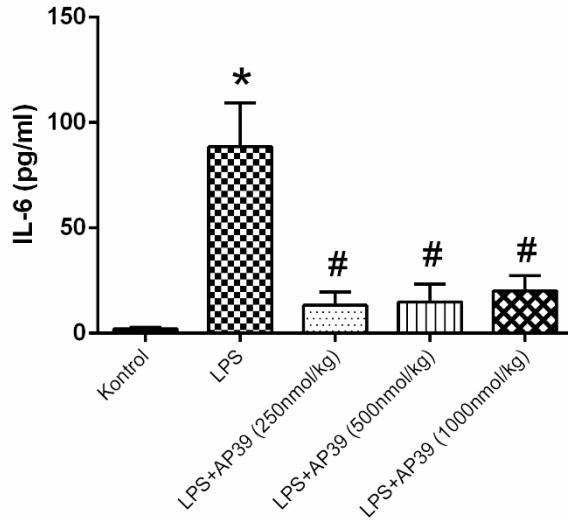
AP39 (250-1000 nmol/kg) tedavisi uygulanan LPS grubu farelerin BAL sıvısı örneklerinde IL-6 konsantrasyonları tedavi uygulanmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ve AP39 tedavisi IL-6 konsantrasyonundaki artışı önledi ( $P < 0,05$ ) (Şekil 4.24, Tablo 4.9). Kontrol grubunda ise AP39 (250-1000 nmol/kg) tedavisi BAL sıvısı örneklerindeki IL-6 konsantrasyonlarında değişikliğe neden olmadı ( $P > 0,05$ ) (Şekil 4.25, Tablo 4.9).



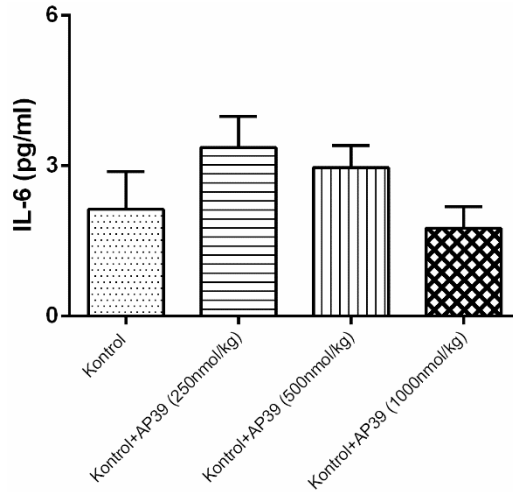
**Şekil 4.22.** Kontrol ( $n=5$ ), LPS (0,1 mg/ml,  $n=7$ ) ve AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.;  $n=5-6$ ) tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında TNF- $\alpha$  konsantrasyonları. Değerler ortalama  $\pm$  SH olarak sunuldu. \*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P < 0,05$ ).



**Şekil 4.23.** Kontrol (n=5) ve AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.; n=3-4) tedavisi uygulanan kontrol grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında TNF- $\alpha$  konsantrasyonları. Değerler ortalama  $\pm$  SH olarak sunuldu.



**Şekil 4.24.** Kontrol (n=5), LPS (0,1 mg/ml, n=6) ve AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.; n=5-6) tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında IL-6 konsantrasyonları. Değerler ortalama  $\pm$  SH olarak sunuldu. \*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).



**Şekil 4.25.** Kontrol (n=5) ve AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.; n=3-4) tedavisi uygulanan kontrol grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında IL-6 konsantrasyonları. Değerler ortalama  $\pm$  SH olarak sunuldu.

**Tablo 4.9.** Kontrol, LPS (0,1 mg/ml) ve AP39 (250-1000 nmol/kg; i.n.) tedavisi uygulanan kontrol ve LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarındaki TNF- $\alpha$  ve IL-6 konsantrasyonları. Değerler ortalama  $\pm$  SH olarak sunuldu.

Gruplar	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
Kontrol	1,73 $\pm$ 1,36 (n=5)	2,13 $\pm$ 0,75 (n=5)
Kontrol+AP39 (250nmol/kg)	1,73 $\pm$ 0,90 (n=3)	3,37 $\pm$ 0,61 (n=4)
Kontrol+AP39 (500nmol/kg)	3,98 $\pm$ 1,15 (n=3)	2,97 $\pm$ 0,44 (n=3)
Kontrol+AP39 (1000nmol/kg)	1,11 $\pm$ 1,11 (n=4)	1,76 $\pm$ 0,43 (n=4)
LPS	61,85 $\pm$ 13,01* (n=7)	88,60 $\pm$ 20,69* (n=6)
LPS+AP39 (250nmol/kg)	25,83 $\pm$ 9,39# (n=6)	13,26 $\pm$ 6,44# (n=6)
LPS+AP39 (500nmol/kg)	18,97 $\pm$ 8,85# (n=5)	14,96 $\pm$ 8,50# (n=5)
LPS+AP39 (1000nmol/kg)	40,94 $\pm$ 13,76 (n=6)	20,15 $\pm$ 7,33# (n=6)

\*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P < 0,05$ ).

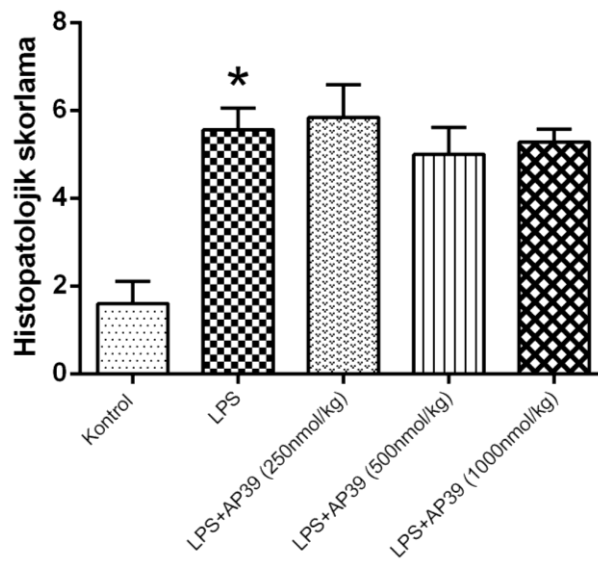
#### 4.3.4. Histopatolojik Değerlendirme

Kontrol ve LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında histopatolojik değerlendirme yapıldı ve parankimal ve peribronşiyal inflamasyon skorlandı. LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında histopatolojik skor

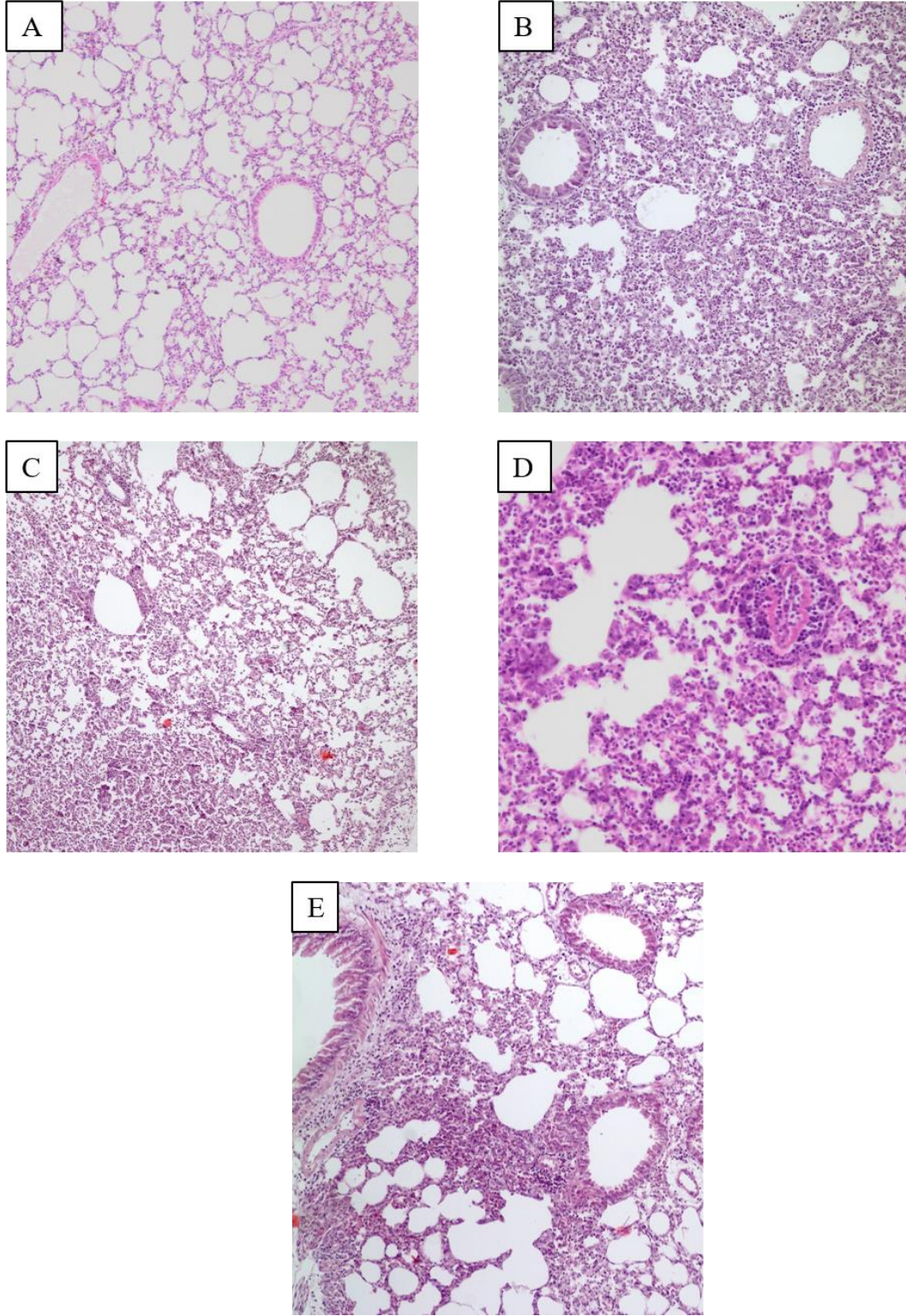


kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27 A, B).

LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularındaki parankimal ve peribronşiyal inflamasyon üzerine AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.) tedavisinin etkileri değerlendirildi. AP39 (250-1000nmol/kg, i.n.) tedavisi, LPS grubu farelerin akciğerlerinin histopatolojik skorlarında gözlenen artışı önlemedi ve tedavi uygulanmayan LPS grubu farelerin akciğer örneklerinden farklı bulunmadı ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27 C, D, E).



**Şekil 4.26.** Kontrol (n=5), LPS (0,1 mg/ml, n=9) ve AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.; n=6-7) tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında histopatolojik skor. Değerler ortalama ± SH olarak sunuldu. \*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, ( $P<0,05$ ).



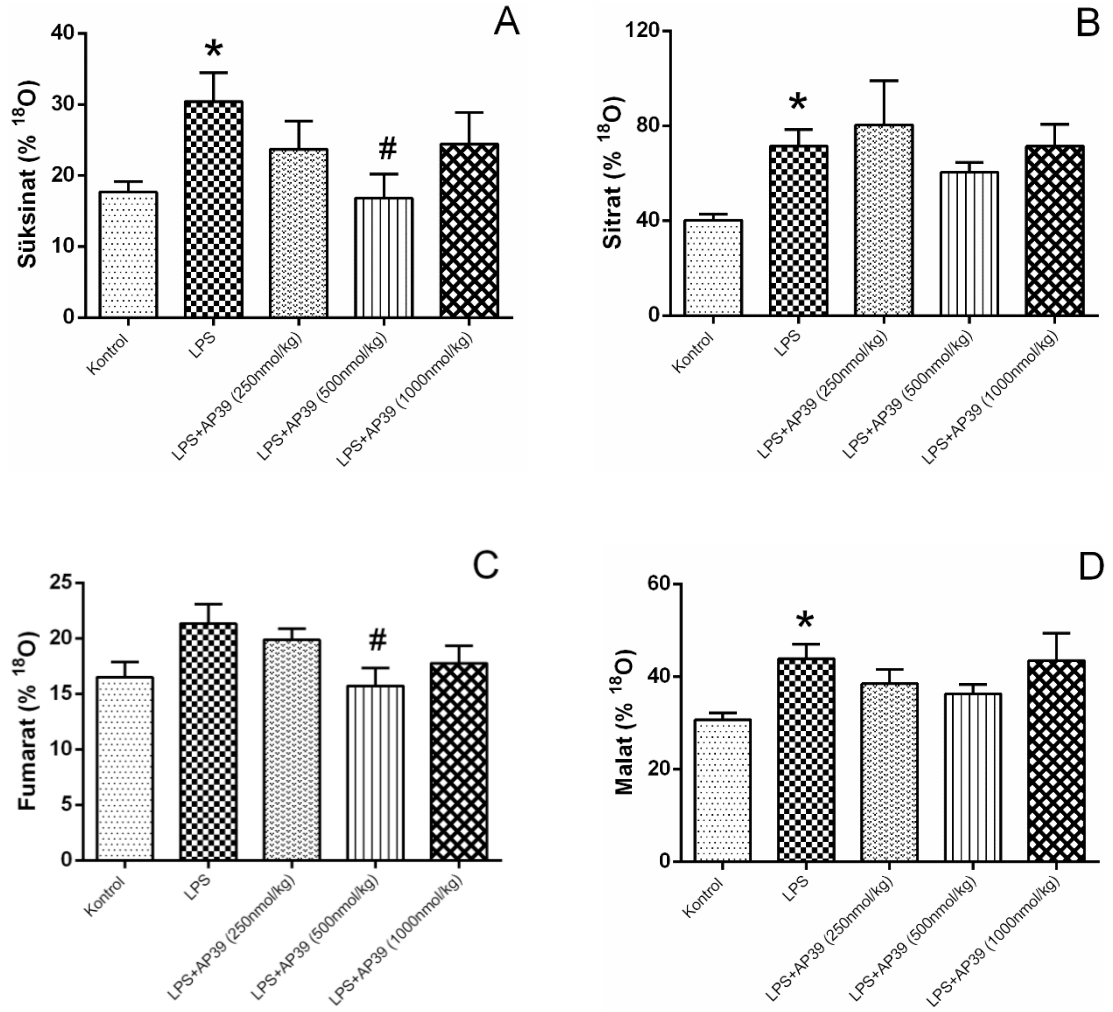
**Şekil 4.27.** Kontrol (A), LPS (B), 250 nmol/kg (C), 500 nmol/kg (D) ve 1000 nmol/kg (E) tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer örneklerinin histolojik kesitleri (hematoksilen eozin boyaması, 20X büyütme oranı ile sunulmuştur).

### 4.3.5. Mitokondri Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

Kontrol ve LPS grubu farelerden izole edilerek  $^{18}\text{O}$  ile işaretlenen akciğer dokularında Krebs döngüsü metabolik ara ürünlerinin düzeyi ölçüldü. Krebs döngüsünün metabolik ara ürünlerinden süksinat düzeyi, LPS grubunda ( $30,43 \pm 4,01$ ;  $n=6$ ) kontrol grubuna ( $17,65 \pm 1,47$ ;  $n=6$ ) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdi ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.28A ve Tablo 4.10). Sitrat düzeyi, LPS grubunda ( $71,42 \pm 6,90$ ;  $n=6$ ) kontrol grubu ( $40,16 \pm 2,68$ ;  $n=6$ ) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.28B ve Tablo 4.10). Malat düzeyleri LPS grubunda  $41,97 \pm 3,16$  ( $n=6$ ) iken kontrol grubunda  $30,65 \pm 1,55$  ( $n=6$ ) olarak bulundu ve karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.28D ve Tablo 4.10). Fumarat düzeyi LPS grubunda ( $21,32 \pm 1,77$ ;  $n=6$ ) artış eğilimi göstermesine rağmen kontrol grubundan ( $16,51 \pm 1,36$ ;  $n=6$ ) farklı bulunmadı ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.28C ve Tablo 4.10).

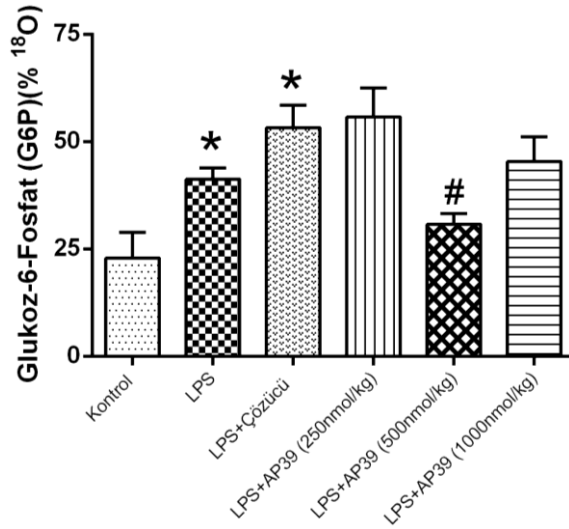
LPS grubu farelerden izole edilen akciğer örneklerinde  $^{18}\text{O}$  ile işaretlenmiş glukoz-6-fosfat (G6P) düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdi ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.29 ve Tablo 4.10).

LPS grubu farelerden izole edilen akciğer örneklerinde AP39 (250-1000 nmol/kg) tedavisinin mitokondri fonksiyonunun göstergesi olarak Krebs döngüsü üzerine etkileri incelendi. LPS uygulamasına bağlı olarak ortaya çıkan süksinat düzeyindeki artışı, 250 ve 1000 nmol/kg dozlarda AP39 tedavisi etkilemezken; 500 nmol/kg AP39 önledi ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.28A ve Tablo 4.10). Fumarat düzeyi, 500 nmol/kg dozda AP39 ile tedavi edilen LPS grubunda azaldı ve AP39 ile tedavi edilmeyen LPS grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.28C ve Tablo 4.10). AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.) tedavisi LPS grubunda artmış olan sitrat ve malat düzeylerini ise etkilemedi ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.28 B, D ve Tablo 4.10).



**Şekil 4.28.** Kontrol (n=6), LPS (0,1 mg/ml, n=6) ve AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.; n=6) tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında <sup>18</sup>O ile işaretlenmiş süksinat (A), sitrat (B), fumarat (C) ve malat (D) miktarları. Değerler ortalama ± SH olarak sunuldu. \*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

LPS grubu farelere AP39'un çözücüsünün intranasal olarak uygulanması LPS'e bağlı olarak meydana gelen glukoz-6-fosfat düzeyindeki artışın şiddetlenmesine neden oldu. LPS grubunda 500 nmol/kg dozda AP39 tedavisi, glukoz-6-fosfat düzeyindeki artışı çözücü uygulanan LPS grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde önledi ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.29 ve Tablo 4.10).



**Şekil 4.29.** Kontrol (n=4), LPS (0,1 mg/ml, n=6), AP39 (250-1000 nmol/kg, i.n.; n=6) tedavisi uygulanan LPS ve çözücü uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında <sup>18</sup>O ile işaretlenmiş glukoz-6-fosfat (G6P) miktarları. Değerler ortalama ± SH olarak sunuldu. \* Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, #AP39 çözücüsü uygulanan LPS grubunun değerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

**Tablo 4.10.** Kontrol, LPS (0,1 mg/ml), AP39 (250-1000 nmol/kg; i.n.) tedavisi uygulanan LPS ve AP39 çözücüsü uygulanan LPS grubu farelerden elde edilen akciğer örneklerindeki glikoliz ve Krebs döngüsü metabolik ara ürün düzeyleri. Değerler <sup>18</sup>O işaretlenme yüzdesi olarak verildi ve ortalama ± SH olarak sunuldu.

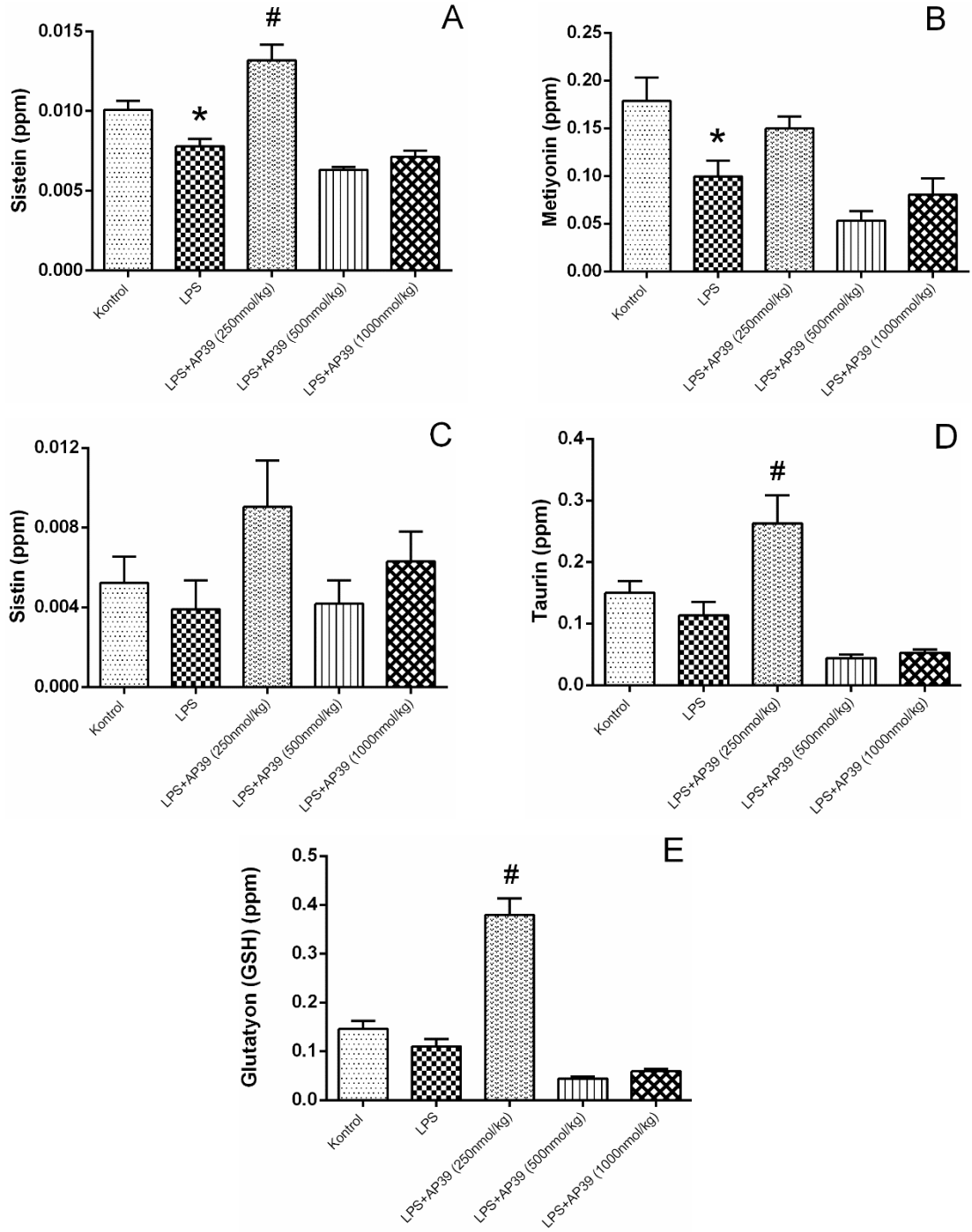
	Kontrol (%)	LPS (%)	LPS+AP39 (250nmol/kg) (%)	LPS+AP39 (500nmol/kg) (%)	LPS+AP39 (1000nmol/kg) (%)	LPS+çözücü (%)
Süksinat	17,65±1,47 n=6	30,43±4,01* n=6	23,67±4,00 n=6	16,79±3,39 <sup>#</sup> n=6	24,43±4,67 n=6	30,41±2,88* n=6
Sitrat	40,16±2,68 n=6	71,42±6,90* n=6	80,34±18,76 n=6	60,42±4,12 n=6	71,42±9,27 n=6	75,70±7,70* n=6
Fumarat	16,51±1,36 n=6	21,32±1,77 n=6	19,87±1,01 n=6	14,57±1,42 <sup>#</sup> n=6	17,77±1,56 n=6	23,06±3,26 n=6
Malat	30,65±1,55 n=6	41,97±3,16* n=6	38,53±3,04 n=6	36,26±2,02 n=6	43,51±5,91 n=6	48,76±4,16* n=5
G6P	22,92±5,98 n=4	41,30±2,63* n=6	55,78±6,70 n=6	30,79±2,42 <sup>§</sup> n=6	45,32±5,84 n=6	53,29±5,20* n=5

\* Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, <sup>#</sup>LPS grubunun değerinden anlamlı olarak farklıdır, <sup>§</sup>AP39 çözücüsü uygulanan LPS grubunun değerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

#### 4.3.6. Sülfür Metabolizmasına Ait Metabolitlerin Miktar Tayini

Kontrol ve LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında, kükürt grubu taşıyan amino asitler ve glutatyon (GSH) düzeylerinde LPS uygulamasına bağlı meydana gelen değişiklikler değerlendirildi. LPS uygulaması akciğer dokularında sistein ( $0,00778 \pm 0,00048$  ppm, n=6) ve metiyonin ( $0,09949 \pm 0,01662$  ppm, n=6) düzeylerini kontrol grubu ( $0,01007 \pm 0,00056$  ppm,  $0,17883 \pm 0,02442$  ppm, n=6; sırasıyla) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı ( $P < 0,05$ ) (Şekil 4.30A ve B). Sistin, taurin ve GSH düzeyleri ise LPS grubunda ( $0,00389 \pm 0,00147$  ppm;  $0,11348 \pm 0,02163$  ppm ve  $0,10969 \pm 0,01565$  ppm, n=6; sırasıyla) kontrol grubuna göre ( $0,00521 \pm 0,00134$  ppm;  $0,14991 \pm 0,01922$  ppm ve  $0,14605 \pm 0,01609$  ppm, n=6; sırasıyla) değişiklik göstermedi ve kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı bulunmadı ( $P > 0,05$ ) (Şekil 4.30 C, D ve E).

LPS grubu farelerde izole edilen akciğer örneklerinde AP39 (250-1000 nmol/kg) tedavisinin kükürt grubu taşıyan amino asitler ve bu amino asit döngüsünün ürünü olan GSH üzerine etkileri incelendi. 250 nmol/kg dozda AP39 tedavisi, LPS uygulamasına bağlı sistein düzeyindeki azalmayı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde engellerken ( $P < 0,05$ ), 500 ve 1000 nmol/kg dozlarda etkisiz bulundu ( $P > 0,05$ ) (Şekil 4.30A). LPS grubunda AP39 tedavisi 250 nmol/kg dozda metiyonin düzeyinde LPS'e bağlı azalmayı artırma eğiliminde olmasına rağmen AP39 tedavisi uygulanmayan LPS grubundan farklı bulunmadı ve 500 ve 1000 nmol/kg dozlarda da metiyonin düzeyini değiştirmede ( $P > 0,05$ ) (Şekil 4.30B). LPS grubunda AP39 250 nmol/kg dozda taurin ve GSH düzeylerini artırdı ve AP39 tedavisi uygulanmayan LPS grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ( $P < 0,05$ ) (Şekil 4.30D ve E).

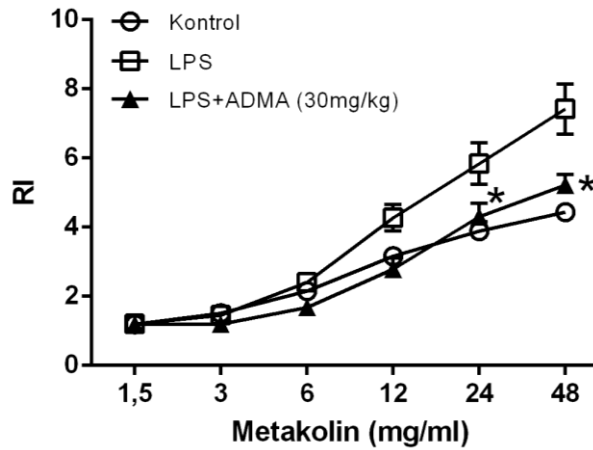


**Şekil 4.30.** Kontrol (n=6), LPS (0,1 mg/ml, n=6) ve AP39 (250-1000nmol/kg, i.n.; n=6) tedavisi uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında sistein (A), metiyonin (B), sistin (C), taurin (D) ve glutatyon (GSH) (E) düzeyleri. Değerler ortalama  $\pm$  SH olarak sunuldu. \*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

#### 4.4. Farelerde LPS ile İndüklenen *in vivo* Solunum Yolu İnflamasyonunda İntranazal ADMA Uygulamasının Etkileri

##### 4.4.1. *In vivo* Bronşiyal Reaktivitenin Değerlendirilmesi

ADMA uygulamasının bronşiyal hiperreaktivite üzerine etkisi LPS grubu farelerde *in vivo* solunum yolu direncinin ölçülmesi ile değerlendirildi. LPS grubunda ADMA (30 mg/kg, i.n.) uygulaması metakolin ile elde edilen doz-yanıt eğrisinde LPS uygulamasına bağlı artışı önledi ve doz yanıt eğrileri ADMA uygulanmayan LPS grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.31).

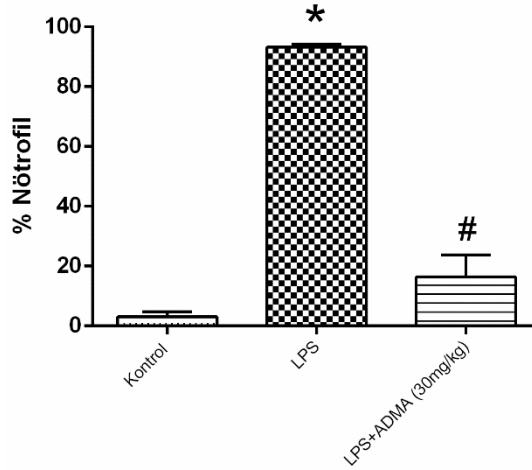


**Şekil 4.31.** Kontrol (n=14), LPS (0,1 mg/ml, n=16) ve ADMA (30mg/kg, i.n.; n=6) uygulaması yapılan LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin (1,5 – 48 mg/ml) ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu direnci (RI) yanıtları. Değerler PBS nebulizasyonu sonrası ölçülen bazal değere göre normalize edilerek sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*LPS grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

##### 4.4.2. BAL Sıvısı Örneklerinde Hücre Sayımı

LPS ile indüklenen *in vivo* solunum yolu inflamasyonunda farelerden elde edilen BAL sıvılarındaki inflamatuvar hücre sayıları üzerine ADMA (30 mg/kg, i.n.) uygulamasının etkileri değerlendirildi. LPS grubunda ADMA (30 mg/kg, i.n.) BAL sıvısında nötrofil sayısındaki LPS uygulamasına bağlı artışı önledi ve ADMA verilmeyen LPS grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.32).



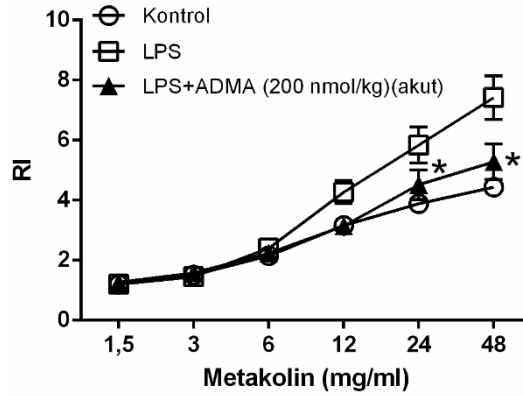


**Şekil 4.32.** Kontrol (n=5), LPS (0,1 mg/ml, n=5) ve ADMA (30 mg/kg, i.n.; n=4) uygulaması yapılan LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında nötrofil hücre sayısı. Değerler toplam hücre sayısının %'si olarak sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır, #LPS grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

#### 4.5. Farelerde LPS ile İndüklenen *in vivo* Solunum Yolu İnflamasyonunda Akut ADMA Uygulaması

##### 4.5.1. *In vivo* Bronşiyal Reaktivite Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Kontrol ve LPS grubu fareler anesteziye edilip trakeaları kanüle edilerek ventilatöre bağlandıktan sonra PBS veya ADMA nebülize ettirildi ve 15 dakika sonra doz bağımlı metakolin yanıtı alınarak solunum yolu direnci değerlendirildi. Kontrol ve LPS grubu farelerin solunum yollarına PBS uygulanmasından sonra metakolin uygulaması solunum yolu direncinde bir değişikliğe yol açmadı (Tablo 4.11). LPS grubunda farelerin solunum yollarına ADMA (200 nmol/kg) uygulaması ise metakolin ile elde edilen solunum yolu direncindeki artışı önledi ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.33 ve Tablo 4.11).



**Şekil 4.33.** Kontrol (n=14), LPS (0,1 mg/ml, n=16) ve metakolin yanıtından 15 dakika önce akut olarak ADMA (200 nmol/kg, n=11) uygulanan LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin (1,5 – 48 mg/ml) ile elde edilen doz bağımlı solunum yolu direnci (RI) yanıtları. Değerler PBS nebulizasyonu sonrası ölçülen bazal değere göre normalize edilerek sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*LPS grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

**Tablo 4.11.** Metakolin yanıtından 15 dakika önce akut olarak solunum yollarına PBS uygulanan kontrol ve LPS (0,1 mg/ml) grupları ile ADMA (200 nmol/kg) uygulanan LPS grubu farelerde intratrakeal metakolin (1,5 – 48 mg/ml) ile ölçülen maksimum solunum yolu direnci yanıtları. Değerler PBS nebulizasyonu sonrası ölçülen bazal değere göre normalize edilerek sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi.

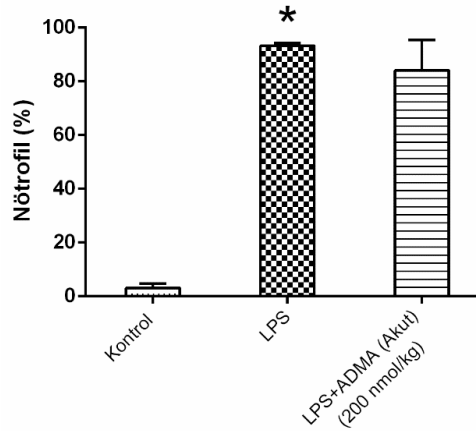
Gruplar	$E_{maks}$	n
Kontrol	4,44 $\pm$ 0,25	14
Kontrol (akut PBS uygulanan)	3,76 $\pm$ 0,31	3
LPS	7,42 $\pm$ 0,73*	16
LPS (akut PBS uygulanan)	7,70 $\pm$ 0,94*	6
LPS+ADMA (200 nmol/kg) (akut uygulanan)	5,28 $\pm$ 0,59 <sup>#</sup>	11

\*Kontrol grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır, <sup>#</sup>LPS grubunun yanıtından anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

#### 4.5.2. BAL Sıvısı Örneklerinde Hücre Sayımı

LPS ile indüklenen *in vivo* solunum yolu inflamasyonunda, solunum yolu direncinin ölçümünde metakolin yanıtından önce ADMA (200 nmol/kg, i.t.) uygulamasının farelerden deney sonunda elde edilen BAL sıvılarındaki nötrofil hücre sayıları üzerine etkileri değerlendirildi. LPS grubunda ADMA (200 nmol/kg, i.t.) uygulaması BAL sıvısında nötrofil sayısındaki LPS uygulamasına bağlı artışı

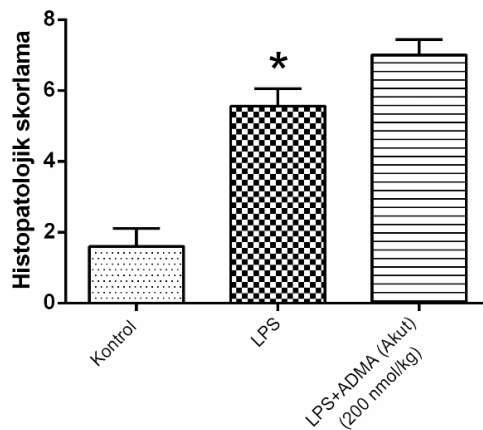
önlemedi ve ADMA uygulanmayan LPS grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulunmadı ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.34).



**Şekil 4.34.** Kontrol (n=5), LPS (n=5) ve metakolin yanıtından 15 dakika önce akut olarak ADMA (200 nmol/kg, n=4) uygulanan LPS grubu farelerden elde edilen BAL sıvılarında nötrofil hücre sayısı. Değerler toplam hücre sayısının %'si olarak sunuldu ve ortalama  $\pm$  SH olarak verildi. \*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

#### 4.5.3. Histopatolojik Değerlendirme

LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularındaki parankimal ve peribronşiyal inflamasyon üzerine ADMA (200 nmol/kg, i.t.) uygulaması etki göstermedi ve LPS grubu farelerin akciğerlerinin histopatolojik skorlarında gözlenen artışı önlemedi ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.35).



**Şekil 4.35.** Kontrol (n=5), LPS (0,1 mg/ml, n=9) ve metakolin yanıtından 15 dakika önce akut olarak ADMA (200 nmol/kg, n=7) uygulanan LPS grubu farelerden izole edilen akciğer dokularında histopatolojik skor. Değerler ortalama  $\pm$  SH olarak sunuldu. \*Kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak farklıdır ( $P<0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Doku Kültüründe Lipopolisakkarit (LPS) İnkübasyonu ile Oluşturulan *in vitro* Kronik Solunum Yolu İnflamasyonu

Doku kültürü yöntemi hem çalışılan maddelerin doku üzerindeki direkt etkilerini, hem de *in vivo* modellere göre daha kısa bir sürede kronik maruziyet etkilerini değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. İnsan bronşiyal halka segmentlerinin kültür ortamında 6 güne kadar fonksiyonel, biyokimyasal ve morfolojik özelliklerini sürdürdükleri, düz kasta alfa-aktin, miyozin hafif zincir ekspresyonlarının değişmediği ve kasılma mekanizmalarının bozulmadığı gösterilmiştir (137). Bu yöntem ile yapılan çalışmalarda fare trakea segmentlerinin otuz iki güne kadar kültür süresi boyunca canlılıklarını korudukları gösterilmiştir. Trakea segmentleri dört günlük kültür süresi sonunda KCl ve karbakol ile indüklenen kasılma yanıtları ve izoprenalin ile indüklenen gevşeme yanıtlarını sürdürmektedir (21). Solunum yolu hiperreaktivitesi ve *remodeling*'ine katkı sağlayan mediyatörlerin uzun süreli maruziyette solunum yolu düz kası üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için doku kültürü yönteminin temel oluşturabileceği bildirilmiştir (21, 137).

LPS deneysel inflamasyon oluşturulması için sıklıkla kullanılan araçlardan biridir. Solunum yollarına LPS uygulaması ile oluşturulan inflamasyon modelinin hava kirliliği, sigara dumanı gibi çevresel etkenlere uzun süre maruziyette gelişen akciğer inflamasyonunun ve astım, KOAH gibi solunum yollarının inflamatuvar hastalıklarında Gram negatif bakteri enfeksiyonlarına bağlı görülen hastalığın şiddetlenme dönemlerini yansıttığı düşünülmektedir (9). LPS, TLR4 ligandıdır ve inflamatuvar hücreler (eozinofiller, nötrofiller, makrofajlar, mast hücreler, monositler, B-hücreler, T-hücreler), epitel hücreleri ve düz kas hücrelerinde bulunan TLR4'leri aktive ederek doğal bağışıklığı stimüle eder (138, 139) ve solunum yollarına uygulanması inflamasyon ve hiperreaktivite gelişmesine neden olur. Bu tez çalışmasında farelerden izole edilen trakea halkalarının doku kültüründe LPS ile inkübasyonuna bağlı trakeal reaktivite değişiklikleri, karbakol, 5-HT ve bradikinin ile indüklenen kasılma yanıtları ve izoprenalin ile indüklenen gevşeme yanıtları üzerinden incelenmiştir. Bulgularımıza göre doku kültüründe LPS ile indüklenen *in vitro*

solunum yolu inflamasyonunda karbakol ile indüklenen kasılma ve izoprenalin ile indüklenen gevşeme yanıtları değişmezken, 5-HT ve bradikinin ile indüklenen kasılma yanıtları artmıştır. Literatürdeki çalışmalarda doku kültüründe izole fare trakealarının LPS veya IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerle inkübe edilmesinin karbakol kasılma yanıtlarını değiştirmediği gösterilmiştir ve çalışmamızda karbakol ile elde ettiğimiz bulgular da bu çalışmaları destekler niteliktedir (21, 28, 140-142).

5-HT solunum yolları epitelindeki nöroendokrin hücreler ve trombositlerden salıverilir (42, 143) ve solunum yolu düz kasındaki 5-HT reseptörlerini uyararak direkt yoldan ve kolinerjik sinir uçlarındaki 5-HT reseptörleri aracılığı ile asetilkolin salıverilmesini uyararak indirekt yoldan kasılma yanıtını indükler (44, 45, 47, 144). İnflamatuvar solunum yolu hastalıklarında plazma 5-HT seviyelerinin yükseldiği (48, 49) ve deney hayvanlarında farklı solunum yolu inflamasyonu modellerinde 5-HT ile indüklenen kasılma yanıtlarının arttığı gösterilmiştir (50, 51, 145, 146). Bu tez çalışmasında da fare trakea halkalarının doku kültüründe LPS ile inkübasyonu 5-HT hiperreaktivitesine yol açmıştır. Solunum yolu inflamasyonunda ortaya çıkan 5-HT hiperreaktivitesinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen 5-HT reseptörleri veya reseptör sonrası olayların etkilendiği düşünülmektedir. Doku kültüründe fare trakea halkalarının IL-1 $\beta$  ile inkübasyonu 5-HT hiperreaktivitesine neden olmuş ancak 5-HT<sub>2A</sub> reseptör ekspresyonunun değişmediği bildirilmiştir. IL-1 $\beta$  inkübasyonuna bağlı 5-HT reseptör aktivitesindeki artışın MAPK inhibitörü ile ortadan kalkması, hiperreaktivitede MAPK yolağındaki değişikliklerin rolü olabileceğini düşündürmüştür (140). Çeşitli dokularda 5-HT<sub>2A</sub> reseptörleri ile indüklenen kasılma yanıtlarında MAPK ERK1/2 (ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz) yolağının katkısı olduğu bilinmektedir (147-150).

Çalışmamızda ayrıca doku kültüründe LPS ile indüklenen *in vitro* solunum yolu inflamasyonu modelinde bradikinin ile indüklenen kasılma yanıtları incelenmiştir. Bradikinin solunum yollarında önemli bir kasıcı ajandır (142) ve solunum yolu inflamasyonu patogenezinde önemli rol oynamaktadır (151). Bradikininin solunum yolunda ödem oluşumunu, mukus sekresyonunu, düz kas kasılmasını artırdığı, prostaglandinler, NO ve taşikininlerin sentezini uyardığı gösterilmiştir (151). İzole insan bronş dokusunda bradikinin zayıf bir kasılma indüklerken, astım hastalarında güçlü bir bronkokonstriktör ajandır (141) ve astım

hastalarına inhalasyonla uygulanması hiperreaktiviteye yol açmaktadır (152). Deneysel solunum yolu inflamasyonu modellerinde de bradikinin hiperreaktivitesi geliştiği bildirilmiştir (28, 153). Doku kültüründe izole fare trakeasının LPS ve TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  gibi sitokinlerle inkübasyonunun bradikinin ile indüklenen kasılma yanıtını artırdığı gösterilmiştir (28, 141, 142). Çalışmamızda izole fare trakealarının LPS ile inkübasyonu bradikinin hiperreaktivitesine yol açmıştır ve bu bulgu önceki araştırmaları desteklemektedir.

LPS uygulaması, TLR4 aktivasyonu ve NF- $\kappa$ B yolağı ile IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinler, IL-8, ICAM-1 gibi kemokinlerin salıverilmesine yol açarak solunum yollarında inflamasyon gelişmesine neden olur (28, 154). Çalışmamızda, izole fare akciğer dokularının doku kültüründe LPS ile inkübasyonu IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerinde artışa yol açmıştır. Deneysel solunum yolu inflamasyonu modelleri ve klinik çalışmalar astım patogenezinde sitokinlerin önemli rol oynadığını göstermektedir (155). Astım ve KOAH'lı hastaların balgam ve BAL sıvısı örneklerinde IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerinin artmış olduğu bildirilmiştir (156). Düzeyi artan sitokinler solunum yolu inflamasyonunda görülen solunum yolu düz kasının kasıcı ajanlara verdiği artmış yanıtın sebeplerinden biri olarak görülmektedir (18, 34). IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  gibi pro-inflamatuar sitokinlerin solunum yolu düz kasını direkt olarak etkileyerek kasılma yanıtını artırdığı bildirilmiştir (18). İnsan (38), kobay (157), fare (21, 28, 140-142) gibi farklı türlerin solunum yollarının TNF- $\alpha$  veya IL-1 $\beta$  ile inkübe edilmesi 5-HT ve bradikinin ile indüklenen kasılma yanıtını artırmıştır. Literatürdeki bu bulgular doğrultusunda çalışmamızda LPS uygulamasına bağlı olarak düzeyleri artan pro-inflamatuar sitokinlerin, trakeal 5-HT ve bradikinin hiperreaktivitesinin gelişmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

### **5.1.1. Doku Kültüründe Lipopolisakkarit (LPS) İnkübasyonu ile Oluşturulan *in vitro* Kronik Solunum Yolu İnflamasyonunda AP39'un Etkileri**

H<sub>2</sub>S endojen bir gaz mediyatördür ve solunum yollarında önemli fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonlara aracılık ettiği ortaya konulmuştur (83, 158). Astım ve KOAH hastalarının serumlarında endojen H<sub>2</sub>S düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (6, 159). Deney hayvanlarında ovalbumin ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda

akciğer dokularında H<sub>2</sub>S düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (98, 158). H<sub>2</sub>S'nin ekzojen olarak uygulanmasına bağlı etkileri H<sub>2</sub>S salıveren bileşikler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (3). Çalışmamızda izole fare trakea halkaları doku kültüründe mitokondriye hedeflendirilmiş yavaş H<sub>2</sub>S salıveren donör AP39 ile inkübe edilmiştir. AP39 inkübasyonu doku kültüründe LPS ile indüklenen *in vitro* solunum yolu inflamasyonunda gelişen trakeal 5-HT hiperreaktivitesini 30 nM konsantrasyonda önlemiş, daha yüksek konsantrasyonlara (100-300 nM) çıkıldığında ise bu koruyucu etkisi ortadan kalkmıştır.

AP39 inkübasyonu LPS uygulamasına bağlı olarak gelişen bradikinin hiperreaktivitesi üzerinde ise etkisiz bulunmuştur. Zhang ve diğ., doku kültüründe izole fare trakealarında yürüttükleri çalışmalarda TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  inkübasyonunun bradikinin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> reseptörlerinin mRNA düzeylerini artırdığını göstermiş ve bradikinin ile indüklenen kasılma yanıtlarındaki artışın bu reseptörlerin transkripsiyonunun artmış olmasından kaynaklandığını öne sürmüştür (141, 142). Bu literatür bilgisi doğrultusunda çalışmamızda AP39 inkübasyonunun LPS ile indüklenen bradikinin hiperreaktivitesi üzerinde etkisiz kalması, bradikinin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> reseptörlerinin transkripsiyonundaki artışı değiştirmemesinden kaynaklanabilir.

Bu tez çalışmasında, izole fare akciğer dokularının doku kültüründe AP39 ile inkübasyonunun, LPS uygulamasına bağlı olarak artan pro-inflamatuar sitokin düzeyleri üzerine etkisi incelenmiştir. AP39 inkübasyonu trakeal 5-HT hiperreaktivitesini önlediği konsantrasyonda (30 nM) ve hiperreaktiviteyi önleyici etkisinin ortadan kalktığı yüksek konsantrasyonda (300 nM) gerçekleştirilmiştir. AP39; uygulandığı her iki konsantrasyonda da LPS grubunda artmış olan IL-1 $\beta$  düzeyini etkilemezken, TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerindeki artışı inhibe etmiştir. Bu bulgularla AP39'un 5-HT hiperreaktivitesini önleyici etkisinde TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinin artışı önleyerek anti-inflamatuar etki göstermesi rol oynayabilir. Bu sitokinlerin solunum yolu düz kasını direkt olarak etkileyerek solunum yolu hiperreaktivitesine yol açtığı bilinmektedir (18, 33, 34, 38). Solunum yolu inflamasyonunda gelişen 5-HT hiperreaktivitesinde 5-HT reseptör sonrası olaylardaki değişikliklerin rolü olduğu da bildirilmektedir (51, 140) ve AP39 reseptör sonrası olaylar üzerinden de trakeal hiperreaktiviteyi önleyebilir. AP39 denendiği yüksek konsantrasyonda (300 nM) TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerini azaltmış olmasına rağmen 5-

HT hiperreaktivitesini engellememiştir. Araştırmalarda H<sub>2</sub>S'nin etkileri uygulanan doza/konsantrasyona bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (3, 160). H<sub>2</sub>S'nin konsantrasyonuna bağlı olarak pro-inflamatuar/anti-inflamatuar, pro-oksidan/antioksidan, sitotoksik/sitoprotektif etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur (84). H<sub>2</sub>S'nin yüksek konsantrasyonda mitokondride sitokrom C oksidazı (kompleks IV) direkt etkisi ile inhibe ederek elektron transportunu bozduğu gösterilmiştir (84). AP39'un düşük konsantrasyonda mitokondriyal elektron transportunu uyararak hücrel biyoenerjetik fonksiyonları geliştirdiği halde yüksek konsantrasyonda inhibe ettiği bildirilmiştir (84, 161, 162). Bizim çalışmamızda AP39'un trakeal 5-HT hiperreaktivitesi üzerindeki önleyici etkilerinin yüksek konsantrasyonlarda ortadan kalkmasının mitokondrideki elektron transportu üzerine inhibitor etkilerinin ortaya çıkması nedeniyle gerçekleştiği ileri sürülebilir. Bu anlamda bulgularımız literatür ile uyum göstermektedir ve trakeal hiperreaktivitenin önlenmesi konusunda uygulanacak AP39 konsantrasyonu kritik görünmektedir.

### **5.1.2. Doku Kültüründe Lipopolisakkarit (LPS) İnkübasyonu ile Oluşturulan *in vitro* Kronik Solunum Yolu İnflamasyonunda ADMA'nın Etkileri**

ADMA, vücutta NO düzeyinin regülasyonunda önemli rol oynayan, endojen bir NOS inhibitörüdür ve NOS izoformlarının üçünü (nNOS, eNOS, ve iNOS) de inhibe eder. Çalışmamızda kontrol grubu izole fare trakea halkaları, doku kültürü ortamında ADMA ile inkübe edilmiştir. Trakea halkalarının 3 µM ADMA ile inkübasyonu, 5-HT'nin  $3 \times 10^{-6}$  M ve bradikininin  $10^{-8}$ - $10^{-7}$  M, konsantrasyonlarındaki kasılma yanıtlarında artışa yol açarken, 30 ve 100 µM ADMA, 5-HT ve bradikinin ile indüklenen kasılma yanıtlarında değişikliğe neden olmadı. Araştırmalarda endojen NO'nun solunum yolunda gevşetici etkileri olduğu ve bu etkinin NOS inhibitörleri ile ortadan kalktığı bildirilmiştir (115, 163). Non-selektif NOS inhibitörü N<sup>W</sup>-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) ile yapılan çalışmalarda solunum yolunda agonistler ile indüklenen kasılmaların arttığı *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir (163-165). Scott ve diğ., solunum yolu direnci ölçümünde metakolinden 15 dakika önce ADMA uygulamasının solunum yolu direncini artırdığını, akciğer homojenatında nitrit düzeyini düşürdüğünü göstermiştir (126). Farelerde ozmotik minipompa implante



edilerek ADMA düzeyinin yükseltilmesi iki hafta sonunda solunum yolu direncinde artış, kompliyansında azalma ve nitrit düzeyinde azalma ile sonuçlanmıştır (127). Çalışmamızda da kontrol grubunda 3  $\mu$ M ADMA inkübasyonu ile ortaya çıkan 5-HT ve bradikinin kasılma yanıtlarındaki artış yapısal NOS izoformlarının inhibisyonu ile NO'nun solunum yolu düz kası tonusu üzerindeki etkisinin azalmasına bağlı olarak geliştiği ileri sürülebilir.

Doku kültüründe LPS grubu trakea halkalarının ADMA ile inkübasyonu ise 3  $\mu$ M konsantrasyonda etkisiz bulunurken 30 ve 100  $\mu$ M konsantrasyonlarda trakeal 5-HT hiperreaktivitesini önlemiştir. LPS ve pro-inflamatuar sitokinler; makrofajlar, nötrofiller ve solunum yolu epitelinde iNOS enziminin ekspresyonunu indükler ve indüklenen enzim aktivite göstermeye başlar (107). iNOS ekspresyonu ile fizyolojik konsantrasyonların oldukça üzerinde NO üretilmeye başlar ve NO'nun düzenleyici etkinliği ortadan kalkar (105). Alveolar makrofaj hücrelerinin LPS ile uyarılmasının iNOS ekspresyonu ve nitrit konsantrasyonunda artışa yol açtığı; LPS ile eş zamanlı olarak makrofajların ADMA ile inkübe edilmesinin ise nitrit düzeyinde konsantrasyon-bağımlı bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada ADMA'nın NF- $\kappa$ B aktivitesini ve yüksek konsantrasyonda iNOS ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (132). Sıçan aort düz kas hücre kültüründe IL-1 $\beta$  inkübasyonu iNOS ekspresyonunda ve NO konsantrasyonunda doz-bağımlı artışa yol açarken, ADMA inkübasyonu iNOS ekspresyonunu etkilemeden NO seviyesini azaltmıştır (113). Akciğer epiteli hücre kültüründe de ADMA inkübasyonu nitrit/nitrat düzeylerini düşürmüştür (166). iNOS aktivasyonu ile aşırı miktarda artan NO'nun nitroztatif stres, toksik bileşik peroksinitrit oluşumunu artırdığı bilinmektedir (114). Tüm bu literatür bilgileri ışığında çalışmamızda ADMA'nın 5-HT hiperreaktivitesini önlemesinde, LPS'e bağlı olarak indüklenen iNOS enzimini inhibe ederek NO düzeyindeki artışı önlemesinin etkili olduğu ileri sürülebilir.

## **5.2. LPS ile İndüklenen Deneysel *in vivo* Solunum Yolu İnflamasyonu**

Çalışmamızda *in vivo* deneysel solunum yolu inflamasyonu modeli de kullanılmış; farelere intranazal LPS uygulaması ile solunum yolu inflamasyonu oluşturulmuştur. Bu farelerin solunum yolu fonksiyonları, BAL sıvısı örneklerinde nötrofil hücre sayıları ve pro-inflamatuar sitokin (TNF- $\alpha$  ve IL-6) düzeyleri,

akciğerdeki histopatolojik değişiklikler, mitokondri fonksiyonları, kükürt grubu içeren amino asitler ve glutasyon düzeyleri araştırılmıştır. LPS uygulanan farelerde bronşiyal hiperreaktivite geliştiği, intratrakeal metakoline verilen solunum yolu direncindeki artış ölçülerek *in vivo* gösterilmiştir. Solunum yollarında parasempatik sinir sistemi düz kas tonusunun düzenlemesinden sorumlu ana sistem ve asetilkolin ana nörotransmitterdir (167). Histamin, prostaglandin D<sub>2</sub> gibi çeşitli inflamatuvar mediyatörler kolinerjik aşırımı artırarak solunum yollarında bronşiyal hiperreaktiviteyi indüklerler (167). Kolinerjik sinir uçlarında bulunan muskarinik M<sub>2</sub> otoreseptörler sinir uçlarından aşırı asetilkolin salıverilmesini engelleyen inhibitör mekanizma olarak yer almaktadır (168). Deneysel solunum yolu inflamasyonu modellerinde bu otoinhibitör muskarinik M<sub>2</sub> reseptörlerin fonksiyonlarının bozulduğu, aşırı asetilkolin salıverilmesi ile kolinerjik uyarımın arttığı ve bronşiyal hiperreaktivite gelişmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (169-171). Solunum yolu inflamasyonu ile ilişkili bronşiyal hiperreaktivitede post-sinaptik muskarinik M<sub>2</sub> ve M<sub>3</sub> reseptör ekspresyonunun değişmediği ancak muskarinik agonistler ile indüklenen düz kas kasılmasında rol alan sinyal moleküllerinin ekspresyonlarının ve fonksiyonlarının arttığı bildirilmiştir (167). IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-13 ve IFN- $\gamma$  gibi sitokinlerin muskarinik agonistlerin neden olduğu Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonundaki artışı potansiyalize ettiği gösterilmiştir (172-175). Deneysel solunum yolu inflamasyonu modellerinde metakoline karşı *in vivo* hiperreaktivite geliştiği bildirilmiştir (176-178). Bu bilgiler ışığında; solunum yolu inflamasyonunda; nöronal asetilkolin salıverilmesinin artması ve G $\alpha_q$  proteini ve muskarinik reseptör sinyal yolağında yer alan moleküllerin ekspresyon ve fonksiyonlarının artması, hücre içi depodan Ca<sup>+2</sup> salıverilmesinin artması kolinerjik hiperreaktiviteye neden olur (167). Bu anlamda çalışmamızda intranazal LPS uygulaması sonrası metakoline verilen solunum yolu direncindeki artışı gösteren bulgumuz literatür ile uyumludur.

LPS uygulaması ile oluşturulan solunum yolu inflamasyonunda nötrofiller önemli role sahiptir. Nötrofiller, inflamasyon bölgesine ilk ulaşan lökositlerdir ve salıverdikleri proteazlar ve inflamatuvar mediyatörler ile inflamasyon cevabının şiddetlenmesine (179) ve diğer inflamatuvar hücrelerin aktive olmasına neden olurlar (180). Araştırmalar kortikosteroid tedavisine duyarsız, kontrol altına alınamayan, şiddetli astımda veya astımın akut alevlenmesinde nötrofilik solunum yolu

inflamasyonunun olduğunu göstermiştir (180). Solunum yollarına LPS uygulamasının BAL sıvısında nötrofil hücre sayısının artışına yol açtığı gösterilmiştir (24, 176, 181, 182). LPS, makrofaj ve bronş epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD14'ler aracılığı ile TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi sitokinlerin salıverilmesine ve nötrofilik inflamasyona neden olur (24, 183). Çalışmamızda da LPS uygulaması BAL sıvısında nötrofil hücre sayısını, TNF- $\alpha$  ve IL-6 konsantrasyonunu artırmış ve akciğer dokularında parankima ve peribronşiyal bölgede inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmiştir.

Solunum yolu inflamasyonunda mitokondride yapısal değişiklikler ve fonksiyonunda farklılıklar ortaya çıkmaktadır (59, 72). Hücrelerin inflamasyon sırasında enfeksiyona veya doku hasarına cevap verebilmesinde gerekli olan proteinler, lipitler, nükleik asitlerin biyosentezi için enerji ihtiyacı artar. İnflamasyon durumunda hücrenin artan enerji ihtiyacının karşılanması amacıyla glukoz alımının, glikoliz oranının artması gibi metabolik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Krebs döngüsündeki kırılmalar nedeniyle oksidatif fosforilasyon bozulmaktadır. LPS ile aktive edilmiş makrofajlarda glikolizin arttığı ve glukoz-6-fosfat biriktiği gösterilmiştir (184). LPS ile uyarılmış makrofajlarda Krebs döngüsünde meydana gelen kırılmalar nedeniyle süksinat, sitrat, fumarat, malat gibi ara ürünlerin biriktiği bildirilmiştir (61, 62). Çalışmamızda glikoliz ve mitokondri fonksiyonları Krebs döngüsünde yer alan metabolik ara ürünlerin döngü hızlarının <sup>18</sup>O ile zenginleştirilmiş su ile işaretlenmeleri ile değerlendirilmiştir. Literatür ile uyumlu olarak LPS uygulaması ile glukoz-6-fosfat, süksinat, sitrat ve malat düzeylerinde artış gözlenmiştir. Glukoz-6-fosfat ve süksinatın IL- $\beta$  üretimini artırdığı, sitratın asetil-KoA'ya dönüştürülerek membran fosfolipidlerinin ve onlardan prostaglandinler gibi inflamatuvar mediyatörlerin sentezini artırdığı gösterilmiştir (62, 64, 67). LPS'e bağlı olarak ortaya çıkan bu metabolik değişikliklerin LPS ile indüklenen inflamasyona katkı sağladığı düşünülmektedir (64).

Çalışmamızda kükürt grubu taşıyan amino asitlerin düzeylerinde LPS uygulamasına bağlı değişiklikler değerlendirildi ve LPS'in, sistein ve metiyonin düzeylerinde azalmaya yol açtığı gösterildi. Metiyoninden önce S-adenozil metiyonin ardından S-adenozil homosistein oluşur ve homosisteine dönüşür. Homosistein, CBS ve CSE enzimleri ile sisteine dönüştürülür (185). Sistein üç farklı yolakla glutatyon, H<sub>2</sub>S ve hipotaurin ve ondan oluşan taurin biyosentezine katılır (185, 186).

Modelimizde LPS uygulaması sonucu ortaya çıkan sistein düzeyindeki azalma metiyonin düzeyindeki azalma ile ilişkilendirilebilir. LPS grubunda glutasyon ve taurin düzeyleri ise kontrol grubundan farklı bulunmamış ancak azalma yönünde eğilim göstermiştir. Çalışmamızda H<sub>2</sub>S düzeyi ölçülmemiştir; ancak H<sub>2</sub>S sentezinde prekürsör amino asit olan sistein düzeyinin LPS uygulamasına bağlı olarak azalmış olması endojen H<sub>2</sub>S düzeyinin de azalmış olabileceğini düşündürmektedir.

### **5.2.1. LPS ile İndüklenen Deneysel *in vivo* Solunum Yolu İnflamasyonunda İntranazal AP39 Tedavisinin Etkileri**

Çalışmamızda LPS ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda bronşiyal hiperreaktivite, BAL sıvısı örneklerindeki nötrofil hücre sayısı, pro-inflamatuar sitokin düzeyleri, akciğerdeki histopatolojik değişiklikler, glikoliz ve Krebs döngüsündeki değişiklikler ve kükürt grubu taşıyan amino asit düzeyleri üzerine intranazal AP39 tedavisinin etkileri incelenmiştir. AP39; 250, 500 ve 1000 nmol/kg olmak üzere üç farklı dozda uygulanmış ve her üç dozda da bronşiyal hiperreaktiviteyi önlemiştir. BAL sıvısında nötrofil sayısındaki artışı sadece 1000 nmol/kg dozda önlemiş, TNF- $\alpha$  konsantrasyonundaki artışı ise 250 ve 500 nmol/kg dozlarda önlerken 1000 nmol/kg dozda etkisiz bulunmuştur. IL-6 konsantrasyonunu uygulandığı her üç dozda da azaltmıştır. Diğer taraftan, AP39, LPS grubu farelerin akciğer dokularında nötrofil infiltrasyonunu önleyememiş, parankimal ve peribronşiyal inflamasyon üzerinde etkisiz bulunmuştur. H<sub>2</sub>S donörlerinin inflamatuvar süreçler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Faller ve diğ., LPS inhalasyonu ile indüklenen akut akciğer hasarı modelinde GYY4137 tedavisinin akciğer dokusunda IL-1 $\beta$  düzeylerini, nötrofil migrasyonunu ve akciğer hasarını azalttığını göstermiştir (100). Ovalbumin ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda NaHS tedavisinin IL-5, IL-13 düzeylerini azalttığı (158), endojen antioksidan savunma mekanizmalarını artırarak akciğerdeki inflamasyonu önlediği gösterilmiştir (187). Farede ozon inhalasyonu ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda da NaHS tedavisinin TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 düzeylerini, BAL sıvısında makrofaj ve nötrofil hücre sayısını azalttığı bildirilmiştir (101). Grubumuz tarafından yürütülen bir çalışmada, GYY4137 tedavisinin LPS'e bağlı meydana gelen trakeal 5-HT hiperreaktivitesini, BAL sıvısında nötrofil ve IL-1 $\beta$  artışı, NaHS tedavisinin ise nötrofil ve IL-1 $\beta$  artışı ve akciğerdeki histopatolojik

değişiklikleri önlediği gösterilmiştir (51). AP39'un da inflamasyon üzerinde etkilerini bildiren çalışmalar mevcuttur. Yanık modelinde akciğer dokusunda (103), böbrek iskemi/reperfüzyon hasarı modelinde böbrek dokusunda MPO düzeyini azaltmış ve nötrofil infiltrasyonunu önlemiştir (85). Hemorajik şok modelinde plazma IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18 düzeylerini, akciğer dokusunda iNOS ekspresyonunu azaltmıştır (104). Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularımız literatürdeki önceki çalışmalar ile birlikte, solunum yolu inflamasyonunda AP39'un inflamatuvar hücreleri ve pro-inflamatuvar sitokinleri azalttığını göstermekte ve AP39'un bu etkileri ile inflamasyon ile ilişkili solunum yolu hiperreaktivitesini önlediğini ileri sürmektedir. Ancak AP39'un bu parametreler üzerine etkilerinde doz farklılıkları görülmüştür. AP39'un yalnızca uygulandığı en yüksek dozda (1000 nmol/kg) solunum yoluna infiltre olan nötrofil sayısını azaltması ve inflamasyona bağlı nötrofil akümüülasyonunu önlemesi, nötrofillere etkinin H<sub>2</sub>S'in ancak yüksek konsantrasyonunda sağlandığını düşündürmektedir. Bunun aksine ise TNF- $\alpha$  düzeyindeki artışı önleyici etkinin küçük dozlarda görülürken, yüksek dozda (1000 nmol/kg) görülmemesi de bu etkide AP39'un mitokondriye hedefli donör olması ve mitokondride yüksek H<sub>2</sub>S konsantrasyonu sağlayarak elektron transportunu inhibe etmesi ile ilişkilendirilebilir (84). Sonuçta inflamasyon üzerindeki etkileri için doz kritik görünse de, AP39 solunum yolları inflamasyonunu azaltmakta ve bronşiyal hiperreaktiviteyi önlemektedir.

Çalışmamızda AP39 tedavisi, LPS'e bağlı olarak glikoliz ve mitokondride Krebs döngüsünde meydana gelen değişiklikler üzerine etkili bulunmuştur. 500 nmol/kg dozda AP39 tedavisi, glukoz-6-fosfat ve süksinat düzeylerindeki LPS'e bağlı artışı inhibe etmiştir. Hipertrofik kardiyomyositlerde NaHS uygulamasının süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesini artırarak mitokondride Krebs döngüsünün verimliliğini artırdığı gösterilmiştir (188). H<sub>2</sub>S'nin sıçanda homosistein ile indüklenen myokardiyal hasarı önleyici (189), adenin ile indüklenen vasküler kalsifikasyonda beyni koruyucu etkilerinde süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesini artırmasının rolü olduğu ileri sürülmüştür (190). Glukoz-6-fosfat ve süksinatın pro-inflamatuvar etkileri olduğu gösterilmiştir (62, 64). Çalışmamızda AP39'un 500 nmol/kg dozda LPS'e bağlı glukoz-6-fosfat ve süksinat düzeyindeki artışı azaltmasının pro-inflamatuvar sitokin düzeylerindeki artışı önleyici etkisine katkıda bulunduğu ileri

sürülebilir. LPS varlığında Krebs döngüsündeki kırılma nedeniyle süksinattan fumarat oluşumunda aksaklık olduğu ve Krebs döngüsünün bu noktada sekteye uğradığı bilinmektedir (61, 62). Fumarat oluşumundaki bu sektenin telafi edilerek Krebs döngüsünün devamının sağlanabilmesi için aspartat-arjinosüksinat hattı devreye girer ve bu hattan oluşan fumarat döngüye katılır. LPS uygulamasında bu hattın aktive olması ile fumarat birikimi olmaktadır. Aspartat-arjinosüksinat hattının NO ve IL-6 üretimini artırdığı bilinmektedir (62). Bulgularımıza göre, AP39'un 500 nmol/kg dozda süksinat düzeyindeki birikimi engellemesi, fumarat birikimini de engellemiş ve bu durumun aspartat-arjinosüksinat hattının aktivitesini azaltarak IL-6 düzeyindeki artışın engellenmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda LPS grubunda AP39 tedavisinin kükürt grubu taşıyan amino asitlerin düzeyleri üzerine etkileri incelendi. Kükürt grubu taşıyan amino asitlerin döngüsü sonunda vücudun önemli antioksidan savunma mekanizmalarından biri olan glutatyon üretilmektedir (185). Çalışmamızda AP39 tedavisi 250 nmol/kg dozda LPS'e bağlı sistein düzeyindeki azalmayı önledi ve glutatyon ve taurin düzeylerini artırdı. Diyabetik sıçanlarda sisteinin inflamasyonu önlediği, inflamatuvar barsak hastalığı modelinde glutatyon üretimi ile oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (191, 192). Yüksek sistein içeren yemle beslenen domuzların LPS ile indüklenen barsak hasarına karşı korunmuş oldukları gösterilmiş ve bu koruyucu etkide TNF- $\alpha$ , IL-6 düzeyini azaltması, glutatyon düzeyini artırmasının rolü olduğu bildirilmiştir (193). LPS'in süperoksit oluşumunu ve oksidatif stresi artırdığı bilinmektedir; ancak farelerde LPS ile indüklenen akut akciğer hasarı modelinde süperoksit oluşumunun LPS uygulamasından 2 ve 4 saat sonra yüksek olduğu, 12 saat sonra ise yüksek seyretmeye devam etmediği gösterilmiştir (125). Modelimizde LPS uygulamasına bağlı olarak glutatyon düzeyinde anlamlı bir azalma görülmemesinin nedeni LPS uygulamasının akut döneminden sonra oksidatif stresin yüksek seviyede kalmaması ile ilişkilendirilebilir. Bulgularımıza göre 250 nmol/kg AP39 kükürt grubu taşıyan bir amino asit olan taurin düzeylerini de artırmıştır. Taurinin akciğer, kalp ve nötrofillerde yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir. Taurin antioksidan ve makrofajlardan NO ve TNF- $\alpha$  salıverilmesini azaltarak anti-inflamatuvar etkiler gösteren bir amino asittir. Ozon, nitrojen dioksit veya bleomisin ile indüklenen akciğer hasarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (194). Taurin ile yapılan bir haftalık tedavinin, aralarında IL-1 $\beta$ ,

TNF- $\alpha$ , IL-6'nın da bulunduğu 17 sitokin düzeyini düşürdüğü ve travmatik beyin hasarına karşı beyni koruduğu gösterilmiştir (186). Bulgularımız, literatürle birlikte değerlendirildiğinde AP39'un 250 nmol/kg dozda sistein, glutatyon ve taurin düzeylerini artırmasının hiperreaktivite ve inflamasyon üzerindeki önleyici etkilerinde rolü olabileceğini düşündürmektedir.

AP39'un sistein, glutatyon ve taurin düzeylerini 250 nmol/kg dozda yükseltirken daha yüksek dozlarda artırmaması, hatta glutatyon ve taurin düzeylerini azaltma eğiliminde olması H<sub>2</sub>S'nin yüksek konsantrasyonda oksidatif stresi artırmasının bir göstergesi olarak düşünülmektedir. H<sub>2</sub>S'nin yüksek konsantrasyonda mitokondride elektron transport sisteminin son basamağı olan sitokrom C (kompleks IV)'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (84, 195, 196). Sitokrom c inhibisyonu ile oksidatif fosforilasyon bozulmakta ve ROS üretimi artmaktadır (195). AP39 500 nmol/kg dozda Krebs döngüsünde LPS'e bağlı gelişen fonksiyonel değişiklikleri önlemesine rağmen glutatyon düzeyindeki azalmayı önlememiştir. Bu bilgiler ışığında; bu durumun nedeni olarak AP39'un Krebs döngüsünün devamındaki elektron transport sisteminde sitokrom C inhibisyonu yaparak ROS oluşumunu artırması olduğu düşünülmektedir.

### **5.2.2. LPS ile İndüklenen Deneysel *in vivo* Solunum Yolu İnflamasyonunda ADMA'nın Etkileri**

LPS ile indüklenen *in vivo* solunum yolu inflamasyonu üzerine ADMA'nın etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda farelere intranasal ADMA (30 mg/kg) uygulaması inflamasyona bağlı olarak gelişen bronşiyal hiperreaktiviteyi ve BAL sıvısında nötrofil artışını önlemiştir. Aynı zamanda farelere intratrakeal ADMA'nın solunum yolu direnci ölçümü sırasında akut olarak nebülize edilmesi de bronşiyal hiperreaktiviteyi önlemiş ancak beklendiği şekilde BAL sıvısındaki nötrofil sayısını ve akciğerdeki histopatolojik değişiklikleri etkilememiştir. Bulgularımız ADMA'nın bronşiyal hiperreaktiviteyi önleyici etkisinin, LPS ile indüklenen iNOS'u inhibe etmesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde bulgularımızı destekleyen veya karşı olan çalışmalar vardır. Alerjik astım (129), sigara dumanı maruziyeti (130), LPS uygulaması (197) gibi çeşitli solunum yolu inflamasyonu modellerinde ADMA'nın BAL sıvısında nitrit/nitrat düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir. Kobaylarda ovalbumin ile indüklenen allerjik solunum yolu

inflamasyonunda selektif olmayan NOS inhibitörü L-NAME bronşiyal reaktivite ve kolajen birikimini artırırken, selektif iNOS inhibitörü 1400W [N-(3-aminometil)benzilasetamidin] solunum yolu direncini, eozinofil infiltrasyonunu, kolajen birikimini azaltmıştır (164). Her üç NOS geni de silinmiş *n/eNOSs<sup>-/-</sup>* farelerde ovalbumin ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda eozinofil infiltrasyonu, IL-4, IL-5, IL-13, eotaksin seviyeleri azalmıştır (198). Farede viral enfeksiyonlar ile ilişkili astım alevlenmesini taklit eden solunum yolu inflamasyonu modelinde iNOS geninin silinmesi ile nötrofilik inflamasyonun baskılandığı gösterilmiş ve iNOS' un önemine dikkat çekilmiştir (199). Diğer taraftan Bratt ve diğ., iNOS geni silinmiş farelerde ovalbumin ile BAL sıvısında inflamatuvar hücre infiltrasyonu, solunum yolu direncinde artış, kompliyansında azalmanın daha da arttığını, iNOS geninin silinmesinin fareleri alerjik inflamasyona daha duyarlı hale getirdiğini rapor etmiştir (200). NOS inhibisyonunun solunum yolu inflamasyonu üzerine etkilerine dair yürütülen çalışmalarda modele, türe, suşa göre farklılıklar gözlenmektedir. NOS inhibitörlerinin seçiciliği, geni silinmiş hayvanlarda, NO düzeyini sağlamak için diğer NOS izoformları arasındaki kompensatuvar mekanizmaların devreye girmesi gibi sınırlamalar NO'nun ve NOS izoformlarının solunum yolu inflamasyonundaki etkilerinin anlaşılmasını kısıtlamaktadır.

Literatürde endojen ADMA'nın metabolizması üzerinden solunum yolu inflamasyonundaki rolünü gösteren çalışmalar ile de farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sigara dumanı inhalasyonu ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda DDAH-1, LPS ile indüklenen akut akciğer hasarı modelinde ise DDAH-2 enzimlerinin aşırı ifadesi ile artmış olan ADMA düzeyinin düşürülmesinin solunum yolu inflamasyonunu azalttığı bildirilmiştir (131). Ancak bu yolakta yer alan diğer ara ürünler veya ADMA metabolizma ürünlerinin etkileri değerlendirilmemiştir. Diğer bir çalışmada ise farede ovalbumin ile indüklenen solunum yolu inflamasyonu modelinde ozmotik pompa implante edilerek ADMA düzeyinin yükseltilmesi solunum yoluna infiltre olan eozinofil ve nötrofil sayısını, alveolar inflamasyonu artırmıştır (129). Bu çalışmada ADMA düzeyi ozmotik pompa ile sistemik olarak iki hafta boyunca yükseltilmiş, bizim çalışmamızda ise ADMA solunum yollarına lokal olarak ve yalnızca iki kez uygulanmıştır. Bu farklılıklar solunum yolu inflamasyonunda ADMA'nın farklı etkiler göstermesinin nedenleri olabilir.



Bulgularımız ve literatür bilgileri doğrultusunda NO-ADMA-DDAH yolağının solunum yolunda NO düzeyinin kontrolünde ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı ileri sürülebilir. Dolayısıyla, solunum yolunun inflamatuvar hastalıklarında NO-ADMA-DDAH yolağını hedefleyen tedavi stratejilerinin yararlı olabileceği ve bu konuda kapsamlı araştırmaların gerektiği düşünölmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında *in vitro* ve *in vivo* olarak deneysel solunum yolu inflamasyonu oluşturuldu. Farelerden izole edilen trakea halkaları ve akciğer dokularının doku kültüründe LPS ile inkübe edilmesi ile oluşturulan modelde trakea halkalarında 5-HT ve bradikinin ile indüklenen kasılma yanıtları arttı, akciğer dokularında IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinde artış meydana geldi. Farelere intranazal LPS uygulanarak oluşturulan *in vivo* deneysel solunum yolu inflamasyonunda ise bronşiyal hiperreaktivite, BAL sıvısında nötrofil sayısında, TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinde artış, akciğer dokusunda parankimal ve peribronşiyal inflamasyon, glukoz-6-fosfat, süksinat, sitrat, malat birikimi ve sistein, metiyonin düzeylerinde azalma meydana geldi.

H<sub>2</sub>S'nin solunum yolu inflamasyonu üzerindeki etkileri farklı deneysel modeller ile araştırılmış olmasına rağmen mitokondride H<sub>2</sub>S'nin hedeflendirilerek salıverilmesinin solunum yolu inflamasyonu ve bronşiyal hiperreaktivite üzerine etkileri incelenmemiştir. Çalışmamızda LPS ile indüklenen solunum yolu inflamasyonu üzerine mitokondriye hedeflendirilmiş H<sub>2</sub>S'yi yavaş salıveren donör AP39 tedavisinin etkileri incelendi. Doku kültüründe 30 nM AP39 inkübasyonu, LPS'e bağlı 5-HT hiperreaktivitesini önledi, daha yüksek konsantrasyonlarında inkübasyon ise bu etkisini ortadan kaldırdı. Akciğer dokularının AP39 (30, 300 nM) ile inkübasyonu LPS'e bağlı TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeyindeki artışı önledi. *In vivo* deneysel solunum yolu inflamasyonunda ise AP39 tedavisi 250, 500 ve 1000 nmol/kg olmak üzere üç farklı dozda intranazal yoldan uygulandı. AP39 tedavisi bronşiyal hiperreaktiviteyi ve IL-6 düzeyindeki artışı uygulandığı üç dozda da önledi. 250 ve 500 nmol/kg dozlarda TNF- $\alpha$  düzeyindeki artışı; 1000 nmol/kg dozda BAL sıvısında nötrofil sayısındaki artışı önlerken; akciğerdeki parankimal ve peribronşiyal inflamasyonu etkilemedi. AP39 tedavisi 500 nmol/kg dozda glukoz-6-fosfat ve mitokondride Krebs döngüsünde LPS'e bağlı meydana gelen değişiklikler sonucu oluşan süksinat birikimini engelledi. 250 nmol/kg AP39, sistein düzeyindeki LPS'e bağlı azalmayı önledi ve taurin ve glutatyon düzeylerini yükseltti.

Bulgularımız mitokondriye hedeflendirilmiş H<sub>2</sub>S'i yavaş salıveren donör AP39 tedavisinin solunum yolu inflamasyonu ile ilişkili bronşiyal hiperreaktiviteyi

önlediğini göstermiştir. AP39'un bu etkisinde akciğerde pro-inflamatuar sitokin düzeylerini düşürmesi, glikolizdeki artışı önlemesi, mitokondride Krebs döngüsündeki düzenleyici etkisi, sistein düzeyindeki azalmayı önleyerek önemli antioksidan bileşik glutasyon, antioksidan ve anti-inflamatuar etkili amino asit taurin düzeylerini artırıcı etkileri rol oynayabilir. Ancak; AP39 tedavisinin sayılan bu parametreler üzerindeki koruyucu etkilerinin ortaya çıktığı dozlar birbirinden farklılık göstermektedir. H<sub>2</sub>S dokularda, hücrelerde yaygın olarak dağılmakta ve birçok molekül, protein ile etkileşerek fizyolojik etkiler oluşturmaktadır. H<sub>2</sub>S konsantrasyonu aracılık ettiği etkilerin ortaya çıkmasında önemlidir. Hücrelerde H<sub>2</sub>S konsantrasyonu fizyolojik seviyelerin üzerine çıktığında oluşturduğu etkiler tam tersi yönde değişebilmektedir. Çalışmamızda AP39'un 5-HT hiperreaktivitesi, TNF- $\alpha$ , sistein, glutasyon, taurin, süksinat, glukoz-6-fosfat düzeyleri üzerinde düşük dozda gösterdiği etkiler, yüksek dozları ile ortadan kalktı. Çalışmamızdan elde edilen verilere göre, uygulanacak doz kritik olsa da AP39 solunum yolu inflamasyonunu azaltmakta ve bronşiyal hiperreaktiviteyi önlemektedir. Solunum yollarının inflamatuvar hastalıklarının tedavisinde mitokondride stabil H<sub>2</sub>S konsantrasyonu sağlayan ve lokal olarak kullanılabilen bileşiklerin geliştirilmesinin önemli olabileceği önerilebilir.

Solunum yolu inflamasyonunda endojen bir NOS inhibitörü olan ADMA'nın düzeylerinin arttığı bilinmektedir. Ancak, literatürde ADMA'nın solunum yolu inflamasyonundaki rolü üzerine yapılan araştırmalarda birbiriyle çelişen sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda LPS ile indüklenen *in vitro* solunum yolu inflamasyonunda trakea halkalarının uzun süreli olarak ADMA'ya maruz bırakılmasının ve solunum yollarında lokal olarak ADMA düzeyinin yükseltilmesinin etkileri araştırılmıştır. Doku kültüründe farelerden izole edilen trakea halkalarının 3  $\mu$ M ADMA ile inkübe edilmesi 5-HT ve bradikinin ile indüklenen kasılma yanıtlarında artışa yol açtı. Literatür verilerine de dayanarak ADMA'nın kasılma yanıtları üzerindeki artırıcı etkisinin, yapısal NOS inhibisyonu ile NO'nun solunum yolu düz kası tonusunun düzenlenmesindeki etkilerinin inhibe olmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir. Trakea halkalarının LPS varlığında 30 ve 100  $\mu$ M konsantrasyonda ADMA ile inkübe edilmesi ise 5-HT hiperreaktivitesini önledi. *In vivo* solunum yolu inflamasyonu modelinde, intranazal yoldan ADMA (30 mg/kg) verilmesi LPS'e bağlı bronşiyal hiperreaktiviteyi ve BAL sıvısındaki nötrofil artışını engelledi; ADMA (200

nmol/kg)'nın solunum yolu fonksiyonunun ölçümü sırasında akut olarak intratrakeal uygulanması da bronşiyal hiperreaktiviteyi önledi. ADMA'nın hiperreaktiviteyi önleyici etkisi, inflamasyon durumunda ekspresyonu artan iNOS enziminin inhibisyonundan kaynaklanabilir. Solunum yolu inflamasyonunda ADMA düzeylerinin iNOS aktivitesi sonrasında artan NO düzeyinin düşürülmesi için kompensatuvar bir mekanizma olarak yükseldiği düşünülmektedir. Bulgularımıza göre ADMA solunum yolu fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol almaktadır ve ADMA'nın solunum yolu inflamasyonundaki etkilerinin anlaşılabilmesi için ileri araştırmalar gerekmektedir. Solunum yollarının inflamatuvar hastalıklarında NO-ADMA-DDAH yolağını hedefleyerek endojen ADMA düzeylerinin kontrolünün önemli bir tedavi stratejisi olabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(6):872-97.
2. Prakash YS, Pabelick CM, Sieck GC. Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest*. 2017;152(3):618-26.
3. Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:169-87.
4. Beauchamp RO, Jr., Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 1984;13(1):25-97.
5. Wang P, Zhang G, Wondimu T, Ross B, Wang R. Hydrogen sulfide and asthma. *Exp Physiol*. 2011;96(9):847-52.
6. Chen Y, Wang R. The message in the air: hydrogen sulfide metabolism in chronic respiratory diseases. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012;184(2):130-8.
7. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl*. 2003;4(4):33-40.
8. Scott JA, Grasemann H. Arginine metabolism in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(4):767-75.
9. Kharitonov SA, Sjobring U. Lipopolysaccharide challenge of humans as a model for chronic obstructive lung disease exacerbations. *Contrib Microbiol*. 2007;14:83-100.
10. Ezegbunam W, Foronjy R. Posttranscriptional control of airway inflammation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018;9(1).
11. Folkerts G, Henricks PA, Slootweg PJ, Nijkamp FP. Endotoxin-induced inflammation and injury of the guinea pig respiratory airways cause bronchial hyporeactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137(6):1441-8.
12. Lemanske RF, Jr. Mechanisms of airway inflammation. *Chest*. 1992;101(6 Suppl):372S-7S.
13. Aghasafari P, George U, Pidaparti R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflamm Res*. 2019;68(1):59-74.
14. Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev*. 1998;50(4):515-96.
15. O'Byrne PM, Inman MD. Airway hyperresponsiveness. *Chest*. 2003;123(3 Suppl):411S-6S.
16. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(3):551-9; quiz 60-1.
17. Gunst SJ, Panettieri RA, Jr. Point: alterations in airway smooth muscle phenotype do/do not cause airway hyperresponsiveness in asthma. *J Appl Physiol* (1985). 2012;113(5):837-9.

18. Shore SA, Moore PE. Effects of cytokines on contractile and dilator responses of airway smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(10):859-66.
19. Chiba Y, Nakazawa S, Todoroki M, Shinozaki K, Sakai H, Misawa M. Interleukin-13 augments bronchial smooth muscle contractility with an up-regulation of RhoA protein. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;40(2):159-67.
20. Grunstein MM, Hakonarson H, Leiter J, Chen M, Whelan R, Grunstein JS, et al. IL-13-dependent autocrine signaling mediates altered responsiveness of IgE-sensitized airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(3):L520-8.
21. Adner M, Rose AC, Zhang Y, Sward K, Benson M, Uddman R, et al. An assay to evaluate the long-term effects of inflammatory mediators on murine airway smooth muscle: evidence that TNFalpha up-regulates 5-HT(2A)-mediated contraction. *Br J Pharmacol*. 2002;137(7):971-82.
22. Lommatzsch M. Airway hyperresponsiveness: new insights into the pathogenesis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012;33(6):579-87.
23. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:635-700.
24. Starkhammar M, Kumlien Georen S, Swedin L, Dahlen SE, Adner M, Cardell LO. Intranasal administration of poly(I:C) and LPS in BALB/c mice induces airway hyperresponsiveness and inflammation via different pathways. *PLoS One*. 2012;7(2):e32110.
25. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*. 2001;7(3):167-202.
26. Savov JD, Gavett SH, Brass DM, Costa DL, Schwartz DA. Neutrophils play a critical role in development of LPS-induced airway disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(5):L952-62.
27. Stenger S, Rollinghoff M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Ann Rheum Dis*. 2001;60 Suppl 3:iii43-6.
28. Bachar O, Adner M, Uddman R, Cardell LO. Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NF-kappa B signaling pathways. *Eur J Immunol*. 2004;34(4):1196-207.
29. Luo SF, Wang CC, Chiu CT, Chien CS, Hsiao LD, Lin CH, et al. Lipopolysaccharide enhances bradykinin-induced signal transduction via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK in canine tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2000;130(8):1799-808.
30. Babu KS, Davies DE, Holgate ST. Role of tumor necrosis factor alpha in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004;24(4):583-97, v-vi.
31. Godding V, Stark JM, Sedgwick JB, Busse WW. Adhesion of activated eosinophils to respiratory epithelial cells is enhanced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;13(5):555-62.

32. Borish L, Mascali JJ, Dishuck J, Beam WR, Martin RJ, Rosenwasser LJ. Detection of alveolar macrophage-derived IL-1 beta in asthma. Inhibition with corticosteroids. *J Immunol*. 1992;149(9):3078-82.
33. Barnes PJ. Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(5 Pt 2):S42-9.
34. Hakonarson H, Grunstein MM. Autocrine regulation of airway smooth muscle responsiveness. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003;137(2-3):263-76.
35. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3546-56.
36. Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(1):76-80.
37. Kips JC, Tavernier J, Pauwels RA. Tumor necrosis factor causes bronchial hyperresponsiveness in rats. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(2 Pt 1):332-6.
38. Sukkar MB, Hughes JM, Armour CL, Johnson PR. Tumour necrosis factor-alpha potentiates contraction of human bronchus in vitro. *Respirology*. 2001;6(3):199-203.
39. Garth J, Barnes JW, Krick S. Targeting Cytokines as Evolving Treatment Strategies in Chronic Inflammatory Airway Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11).
40. Filip M, Bader M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep*. 2009;61(5):761-77.
41. Cordoba-Rodriguez G, Vargas MH, Ruiz V, Carbajal V, Campos-Bedolla P, Mercadillo-Herrera P, et al. Allergic sensitization modifies the pulmonary expression of 5-hydroxytryptamine receptors in guinea pigs. *Respir Physiol Neurobiol*. 2016;223:9-15.
42. Cazzola I, Matera MG. 5-HT modifiers as a potential treatment of asthma. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(1):13-6.
43. Larsson-Callerfelt AK, Dahlen SE, Kuhl AR, Lex D, Uhlig S, Martin C. Modulation of antigen-induced responses by serotonin and prostaglandin E2 via EP1 and EP4 receptors in the peripheral rat lung. *Eur J Pharmacol*. 2013;699(1-3):141-9.
44. Eum SY, Norel X, Lefort J, Labat C, Vargaftig BB, Brink C. Anaphylactic bronchoconstriction in BP2 mice: interactions between serotonin and acetylcholine. *Br J Pharmacol*. 1999;126(1):312-6.
45. Weigand LA, Myers AC, Meeker S, Undem BJ. Mast cell-cholinergic nerve interaction in mouse airways. *J Physiol*. 2009;587(Pt 13):3355-62.
46. Takahashi T, Ward JK, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Barnes PJ, Belvisi MG. 5-Hydroxytryptamine facilitates cholinergic bronchoconstriction in human and guinea pig airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(1):377-80.
47. Moffatt JD, Cocks TM, Page CP. Role of the epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea. *Br J Pharmacol*. 2004;141(7):1159-66.

48. Lechin F, van der Dijs B, Orozco B, Lechin M, Lechin AE. Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1996;77(3):245-53.
49. Lau WK, Chan-Yeung MM, Yip BH, Cheung AH, Ip MS, Mak JC, et al. The role of circulating serotonin in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2012;7(2):e31617.
50. Dupont LL, Bracke KR, De Maeyer JH, Compan V, Joos GF, Lefebvre RA, et al. Investigation of 5-HT<sub>4</sub> receptors in bronchial hyperresponsiveness in cigarette smoke-exposed mice. *Pulm Pharmacol Ther.* 2014;28(1):60-7.
51. Kaya-Yasar Y, Karaman Y, Bozkurt TE, Onder SC, Sahin-Erdemli I. Effects of intranasal treatment with slow (GYY4137) and rapid (NaHS) donors of hydrogen sulfide in lipopolysaccharide-induced airway inflammation in mice. *Pulm Pharmacol Ther.* 2017;45:170-80.
52. Moura CT, Bezerra FC, de Moraes IM, Magalhaes PJ, Capaz FR. Increased responsiveness to 5-hydroxytryptamine after antigenic challenge is inhibited by nifedipine and niflumic acid in rat trachea in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32(12):1119-23.
53. Fuller RW, Dixon CM, Cuss FM, Barnes PJ. Bradykinin-induced bronchoconstriction in humans. Mode of action. *Am Rev Respir Dis.* 1987;135(1):176-80.
54. Ricciardolo FL, Petecchia L, Sorbello V, Di Stefano A, Usai C, Massaglia GM, et al. Bradykinin B<sub>2</sub> receptor expression in the bronchial mucosa of allergic asthmatics: the role of NF- $\kappa$ B. *Clin Exp Allergy.* 2016;46(3):428-38.
55. Ricciardolo FLM, Folkerts G, Folino A, Mognetti B. Bradykinin in asthma: Modulation of airway inflammation and remodelling. *Eur J Pharmacol.* 2018;827:181-8.
56. Koyama S, Rennard SI, Robbins RA. Bradykinin stimulates bronchial epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *Am J Physiol.* 1995;269(1 Pt 1):L38-44.
57. Sato E, Koyama S, Nomura H, Kubo K, Sekiguchi M. Bradykinin stimulates alveolar macrophages to release neutrophil, monocyte, and eosinophil chemotactic activity. *J Immunol.* 1996;157(7):3122-9.
58. Gurusamy M, Nasser S, Lee H, Jung B, Lee D, Khang G, et al. Kinin B<sub>1</sub> receptor antagonist BII13823 reduces allergen-induced airway inflammation and mucus secretion in mice. *Pharmacol Res.* 2016;104:132-9.
59. Pan S, Conaway S, Jr., Deshpande DA. Mitochondrial regulation of airway smooth muscle functions in health and pulmonary diseases. *Arch Biochem Biophys.* 2019;663:109-19.
60. Delmotte P, Sieck GC. Interaction between endoplasmic/sarcoplasmic reticulum stress (ER/SR stress), mitochondrial signaling and Ca<sup>2+</sup> regulation in airway smooth muscle (ASM). *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;93(2):97-110.



61. Patil NK, Bohannon JK, Hernandez A, Patil TK, Sherwood ER. Regulation of leukocyte function by citric acid cycle intermediates. *J Leukoc Biol.* 2019;106(1):105-17.
62. Mills EL, Kelly B, O'Neill LAJ. Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat Immunol.* 2017;18(5):488-98.
63. Kelly B, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.* 2015;25(7):771-84.
64. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature.* 2013;496(7444):238-42.
65. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature.* 2014;515(7527):431-5.
66. Hakak Y, Lehmann-Bruinsma K, Phillips S, Le T, Liaw C, Connolly DT, et al. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2009;85(5):837-43.
67. Williams NC, O'Neill LAJ. A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation. *Front Immunol.* 2018;9:141.
68. Infantino V, Convertini P, Cucci L, Panaro MA, Di Noia MA, Calvello R, et al. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochem J.* 2011;438(3):433-6.
69. McGuire VA, Ruiz-Zorrilla Diez T, Emmerich CH, Strickson S, Ritorto MS, Sutavani RV, et al. Dimethyl fumarate blocks pro-inflammatory cytokine production via inhibition of TLR induced M1 and K63 ubiquitin chain formation. *Sci Rep.* 2016;6:31159.
70. Ashrafian H, Czibik G, Bellahcene M, Aksentijevic D, Smith AC, Mitchell SJ, et al. Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Cell Metab.* 2012;15(3):361-71.
71. Rodriguez-Prados JC, Traves PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, Martín-Sanz P, et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol.* 2010;185(1):605-14.
72. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood.* 2010;115(23):4742-9.
73. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, Ghosh D, et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med.* 2007;204(13):3173-81.
74. Leishangthem GD, Mabalirajan U, Singh VP, Agrawal A, Ghosh B, Dinda AK. Ultrastructural changes of airway in murine models of allergy and diet-induced metabolic syndrome. *ISRN Allergy.* 2013;2013:261297.

75. Aguilera-Aguirre L, Bacsi A, Saavedra-Molina A, Kurosky A, Sur S, Boldogh I. Mitochondrial dysfunction increases allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2009;183(8):5379-87.
76. Dada LA, Sznajder JI. Mitochondrial Ca(2)+ and ROS take center stage to orchestrate TNF-alpha-mediated inflammatory responses. *J Clin Invest.* 2011;121(5):1683-5.
77. Rowlands DJ, Islam MN, Das SR, Huertas A, Quadri SK, Horiuchi K, et al. Activation of TNFR1 ectodomain shedding by mitochondrial Ca<sup>2+</sup> determines the severity of inflammation in mouse lung microvessels. *J Clin Invest.* 2011;121(5):1986-99.
78. Delmotte P, Zavaletta VA, Thompson MA, Prakash YS, Sieck GC. TNFalpha decreases mitochondrial movement in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017;313(1):L166-L76.
79. Delmotte P, Yang B, Thompson MA, Pabelick CM, Prakash YS, Sieck GC. Inflammation alters regional mitochondrial Ca(2)+ in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;303(3):C244-56.
80. Mabalirajan U, Ahmad T, Leishangthem GD, Dinda AK, Agrawal A, Ghosh B. L-arginine reduces mitochondrial dysfunction and airway injury in murine allergic airway inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2010;10(12):1514-9.
81. Jaffer OA, Carter AB, Sanders PN, Dibbern ME, Winters CJ, Murthy S, et al. Mitochondrial-targeted antioxidant therapy decreases transforming growth factor-beta-mediated collagen production in a murine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;52(1):106-15.
82. Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem Pharmacol.* 2018;149:110-23.
83. Martelli A, Testai L, Breschi MC, Blandizzi C, Viridis A, Taddei S, et al. Hydrogen sulphide: novel opportunity for drug discovery. *Med Res Rev.* 2012;32(6):1093-130.
84. Szczesny B, Modis K, Yanagi K, Coletta C, Le Trionnaire S, Perry A, et al. AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. *Nitric Oxide.* 2014;41:120-30.
85. Ahmad A, Olah G, Szczesny B, Wood ME, Whiteman M, Szabo C. AP39, A Mitochondrially Targeted Hydrogen Sulfide Donor, Exerts Protective Effects in Renal Epithelial Cells Subjected to Oxidative Stress in Vitro and in Acute Renal Injury in Vivo. *Shock.* 2016;45(1):88-97.
86. Smith RAJ, Murphy MP. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann Ny Acad Sci.* 2010;1201:96-103.
87. Millard M, Gallagher JD, Olenyuk BZ, Neamati N. A Selective Mitochondrial-Targeted Chlorambucil with Remarkable Cytotoxicity in Breast and Pancreatic Cancers. *J Med Chem.* 2013;56(22):9170-9.

88. Constant-Urban C, Charif M, Goffin E, Van Heugen JC, Elmoualij B, Chiap P, et al. Triphenylphosphonium salts of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides related to diazoxide targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(21):5878-81.
89. Horinouchi T, Nakagawa H, Suzuki T, Fukuhara K, Miyata N. A novel mitochondria-localizing nitrobenzene derivative as a donor for photo-uncaging of nitric oxide. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(7):2000-2.
90. Perry MM, Hui CK, Whiteman M, Wood ME, Adcock I, Kirkham P, et al. Hydrogen sulfide inhibits proliferation and release of IL-8 from human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(4):746-52.
91. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001;20(21):6008-16.
92. Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, Kawabata A. Hydrogen sulfide causes relaxation in mouse bronchial smooth muscle. *J Pharmacol Sci*. 2007;104(4):392-6.
93. Chen YH, Wang PP, Wang XM, He YJ, Yao WZ, Qi YF, et al. Involvement of endogenous hydrogen sulfide in cigarette smoke-induced changes in airway responsiveness and inflammation of rat lung. *Cytokine*. 2011;53(3):334-41.
94. Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(10):1147-54.
95. Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, et al. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J*. 2005;19(9):1196-8.
96. Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Moochhala SM, Moore PK. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J*. 2005;19(6):623-5.
97. Mok YY, Atan MS, Yoke Ping C, Zhong Jing W, Bhatia M, Moochhala S, et al. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *Br J Pharmacol*. 2004;143(7):881-9.
98. Chen YH, Wu R, Geng B, Qi YF, Wang PP, Yao WZ, et al. Endogenous hydrogen sulfide reduces airway inflammation and remodeling in a rat model of asthma. *Cytokine*. 2009;45(2):117-23.
99. Roviezzo F, Bertolino A, Sorrentino R, Terlizzi M, Matteis M, Calderone V, et al. Hydrogen sulfide inhalation ameliorates allergen induced airway hyperactivity by modulating mast cell activation. *Pharmacol Res*. 2015;100:85-92.
100. Faller S, Hausler F, Goeft A, von Itter MA, Gyllenram V, Hoetzel A, et al. Hydrogen sulfide limits neutrophil transmigration, inflammation, and oxidative burst in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Sci Rep*. 2018;8(1):14676.
101. Zhang P, Li F, Wiegman CH, Zhang M, Hong Y, Gong J, et al. Inhibitory effect of hydrogen sulfide on ozone-induced airway inflammation, oxidative stress, and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;52(1):129-37.

102. Ivanciuc T, Sbrana E, Ansar M, Bazhanov N, Szabo C, Casola A, et al. Hydrogen Sulfide Is an Antiviral and Antiinflammatory Endogenous Gasotransmitter in the Airways. Role in Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55(5):684-96.
103. Ahmad A, Szabo C. Both the H<sub>2</sub>S biosynthesis inhibitor aminooxyacetic acid and the mitochondrially targeted H<sub>2</sub>S donor AP39 exert protective effects in a mouse model of burn injury. *Pharmacol Res*. 2016;113(Pt A):348-55.
104. Wepler M, Merz T, Wachter U, Vogt J, Calzia E, Scheuerle A, et al. The Mitochondria-Targeted H<sub>2</sub>S-Donor AP39 in a Murine Model of Combined Hemorrhagic Shock and Blunt Chest Trauma. *Shock*. 2019;52(2):230-9.
105. Antosova M, Mokra D, Pepucha L, Plevkova J, Buday T, Sterusky M, et al. Physiology of nitric oxide in the respiratory system. *Physiol Res*. 2017;66(Supplementum 2):S159-S72.
106. Silkoff PE, Robbins RA, Gaston B, Lundberg JO, Townley RG. Endogenous nitric oxide in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(3):438-48.
107. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*. 2004;84(3):731-65.
108. Pechkovsky DV, Zissel G, Goldmann T, Einhaus M, Taube C, Magnussen H, et al. Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(4):L684-92.
109. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:707-36.
110. Gilchrist M, Savoie M, Nohara O, Wills FL, Wallace JL, Befus AD. Nitric oxide synthase and nitric oxide production in in vivo-derived mast cells. *J Leukoc Biol*. 2002;71(4):618-24.
111. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.
112. Blackford JA, Jr., Antonini JM, Castranova V, Dey RD. Intratracheal instillation of silica up-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and increases nitric oxide production in alveolar macrophages and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;11(4):426-31.
113. Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, et al. Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res*. 2003;92(2):226-33.
114. Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24(9):450-5.
115. Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*. 2003;58(2):175-82.

116. Gruetter CA, Childers CE, Bosserman MK, Lemke SM, Ball JG, Valentovic MA. Comparison of relaxation induced by glyceryl trinitrate, isosorbide dinitrate, and sodium nitroprusside in bovine airways. *Am Rev Respir Dis.* 1989;139(5):1192-7.
117. Di Maria GU, Spicuzza L, Mistretta A, Mazzarella G. Role of endogenous nitric oxide in asthma. *Allergy.* 2000;55 Suppl 61:31-5.
118. Dupuy PM, Shore SA, Drazen JM, Frostell C, Hill WA, Zapol WM. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *J Clin Invest.* 1992;90(2):421-8.
119. Hogman M, Wei SZ, Frostell C, Arnberg H, Hedenstierna G. Effects of inhaled nitric oxide on methacholine-induced bronchoconstriction: a concentration response study in rabbits. *Eur Respir J.* 1994;7(4):698-702.
120. Feletou M, Lonchampt M, Coge F, Galizzi JP, Bassoullet C, Merial C, et al. Regulation of murine airway responsiveness by endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(1):L258-67.
121. Ten Broeke R, De Crom R, Van Haperen R, Verweij V, Leusink-Muis T, Van Ark I, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase suppresses features of allergic asthma in mice. *Respir Res.* 2006;7:58.
122. Beltowski J, Kedra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep.* 2006;58(2):159-78.
123. De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, Ferrario P, Morelli F, Pascale W, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Med Sci Monit.* 2009;15(4):RA91-101.
124. Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med.* 2005;10 Suppl 1:S73-81.
125. Sharma S, Smith A, Kumar S, Aggarwal S, Rehmani I, Snead C, et al. Mechanisms of nitric oxide synthase uncoupling in endotoxin-induced acute lung injury: role of asymmetric dimethylarginine. *Vascul Pharmacol.* 2010;52(5-6):182-90.
126. Scott JA, North ML, Rafii M, Huang H, Pencharz P, Subbarao P, et al. Asymmetric dimethylarginine is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(7):779-85.
127. Wells SM, Buford MC, Migliaccio CT, Holian A. Elevated asymmetric dimethylarginine alters lung function and induces collagen deposition in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40(2):179-88.
128. Ahmad T, Mabalirajan U, Ghosh B, Agrawal A. Altered asymmetric dimethyl arginine metabolism in allergically inflamed mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(1):3-8.
129. Klein E, Weigel J, Buford MC, Holian A, Wells SM. Asymmetric dimethylarginine potentiates lung inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;299(6):L816-25.

130. Staab EB, Weigel J, Xiao F, Madayiputhiya N, Wyatt TA, Wells SM. Asymmetric dimethyl-arginine metabolism in a murine model of cigarette smoke-mediated lung inflammation. *J Immunotoxicol*. 2015;12(3):273-82.
131. Aggarwal S, Gross CM, Kumar S, Dimitropoulou C, Sharma S, Gorshkov BA, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase II overexpression attenuates LPS-mediated lung leak in acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(3):614-25.
132. Pekarova M, Kubala L, Martiskova H, Bino L, Twarogova M, Klinke A, et al. Asymmetric dimethylarginine regulates the lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages by suppressing the activation of NF-kappaB and iNOS expression. *Eur J Pharmacol*. 2013;713(1-3):68-77.
133. Huang S, Xu Y, Peng WF, Cheng J, Li HH, Shen LS, et al. Asymmetric dimethylarginine targets MAPK pathway to regulate insulin resistance in liver by activating inflammation factors. *J Cell Biochem*. 2018.
134. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 1999;99(24):3092-5.
135. Eid HM, Lyberg T, Arnesen H, Seljeflot I. Insulin and adiponectin inhibit the TNFalpha-induced ADMA accumulation in human endothelial cells: the role of DDAH. *Atherosclerosis*. 2007;194(2):e1-8.
136. Pattnaik B, Bodas M, Bhatraju NK, Ahmad T, Pant R, Guleria R, et al. IL-4 promotes asymmetric dimethylarginine accumulation, oxo-nitrative stress, and hypoxic response-induced mitochondrial loss in airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):130-41 e9.
137. Moir LM, Ward JP, Hirst SJ. Contractility and phenotype of human bronchiole smooth muscle after prolonged fetal bovine serum exposure. *Exp Lung Res*. 2003;29(6):339-59.
138. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*. 2002;196(12):1645-51.
139. Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Couillin I, Maillet I, Bihl F, et al. TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced acute respiratory inflammation. *J Leukoc Biol*. 2006;80(3):451-7.
140. Zhang Y, Cardell LO, Adner M. IL-1beta induces murine airway 5-HT2A receptor hyperresponsiveness via a non-transcriptional MAPK-dependent mechanism. *Respir Res*. 2007;8:29.
141. Zhang Y, Adner M, Cardell LO. Up-regulation of bradykinin receptors in a murine in-vitro model of chronic airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2004;489(1-2):117-26.
142. Zhang Y, Adner M, Cardell LO. IL-1beta-induced transcriptional up-regulation of bradykinin B1 and B2 receptors in murine airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36(6):697-705.

143. Livermore S, Zhou Y, Pan J, Yeger H, Nurse CA, Cutz E. Pulmonary neuroepithelial bodies are polymodal airway sensors: evidence for CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> sensing. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(8):L807-15.
144. Dupont LJ, Pype JL, Demedts MG, De Leyn P, Deneffe G, Verleden GM. The effects of 5-HT on cholinergic contraction in human airways in vitro. *Eur Respir J*. 1999;14(3):642-9.
145. Bozkurt TE, Kaya Y, Durlu-Kandilci NT, Onder S, Sahin-Erdemli I. The effect of cannabinoids on dinitrofluorobenzene-induced experimental asthma in mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2016;231:7-13.
146. Long JW, Yang XD, Cao L, Lu SM, Cao YX. Alteration of airway responsiveness mediated by receptors in ovalbumin-induced asthmatic E3 rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30(7):965-72.
147. Cao YX, He LC, Xu CB, Luo GG, Edvinsson L. Enhanced transcription of contractile 5-hydroxytryptamine 2A receptors via extracellular signal-regulated kinase 1/2 after organ culture of rat mesenteric artery. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005;96(4):282-8.
148. Banes A, Florian JA, Watts SW. Mechanisms of 5-hydroxytryptamine(2A) receptor activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291(3):1179-87.
149. Pearce WJ, Williams JM, Chang MM, Gerthoffer WT. ERK inhibition attenuates 5-HT-induced contractions in fetal and adult ovine carotid arteries. *Arch Physiol Biochem*. 2003;111(1):36-44.
150. Xu J, Jian B, Chu R, Lu Z, Li Q, Dunlop J, et al. Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT<sub>2</sub> receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol*. 2002;161(6):2209-18.
151. Sainz IM, Pixley RA, Colman RW. Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb Haemost*. 2007;98(1):77-83.
152. Polosa R, Holgate ST. Comparative airway response to inhaled bradykinin, kallidin, and [des-Arg<sup>9</sup>]bradykinin in normal and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(6 Pt 1):1367-71.
153. Ellis KM, Cannet C, Mazzoni L, Fozard JR. Airway hyperresponsiveness to bradykinin induced by allergen challenge in actively sensitised Brown Norway rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004;369(2):166-78.
154. Shan X, Hu A, Veler H, Fatma S, Grunstein JS, Chuang S, et al. Regulation of Toll-like receptor 4-induced proasthmatic changes in airway smooth muscle function by opposing actions of ERK1/2 and p38 MAPK signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(3):L324-33.
155. Thomas PS. Tumour necrosis factor-alpha: The role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol*. 2001;79(2):132-40.
156. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(11):3546-56.

157. Makwana R, Gozzard N, Spina D, Page C. TNF-alpha-induces airway hyperresponsiveness to cholinergic stimulation in guinea pig airways. *Br J Pharmacol.* 2012;165(6):1978-91.
158. Zhang G, Wang P, Yang G, Cao Q, Wang R. The inhibitory role of hydrogen sulfide in airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of asthma. *Am J Pathol.* 2013;182(4):1188-95.
159. Tian M, Wang Y, Lu YQ, Yan M, Jiang YH, Zhao DY. Correlation between serum H<sub>2</sub>S and pulmonary function in children with bronchial asthma. *Mol Med Rep.* 2012;6(2):335-8.
160. Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation.* 2008;117(18):2351-60.
161. Ikeda K, Marutani E, Hirai S, Wood ME, Whiteman M, Ichinose F. Mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor AP39 improves neurological outcomes after cardiac arrest in mice. *Nitric Oxide.* 2015;49:90-6.
162. Zhao FL, Fang F, Qiao PF, Yan N, Gao D, Yan Y. AP39, a Mitochondria-Targeted Hydrogen Sulfide Donor, Supports Cellular Bioenergetics and Protects against Alzheimer's Disease by Preserving Mitochondrial Function in APP/PS1 Mice and Neurons. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:8360738.
163. Nijkamp FP, van der Linde HJ, Folkerts G. Nitric oxide synthesis inhibitors induce airway hyperresponsiveness in the guinea pig in vivo and in vitro. Role of the epithelium. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(3):727-34.
164. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, et al. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;35(4):457-65.
165. de Boer J, Meurs H, Coers W, Koopal M, Bottone AE, Visser AC, et al. Deficiency of nitric oxide in allergen-induced airway hyperreactivity to contractile agonists after the early asthmatic reaction: an ex vivo study. *Br J Pharmacol.* 1996;119(6):1109-16.
166. Wells SM, Holian A. Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;36(5):520-8.
167. Meurs H, Gosens R, Zaagsma J. Airway hyperresponsiveness in asthma: lessons from in vitro model systems and animal models. *Eur Respir J.* 2008;32(2):487-502.
168. ten Berge RE, Weening EC, Roffel AF, Zaagsma J. Differences in the prejunctional effects of methacholine and pilocarpine on the release of endogenous acetylcholine from guinea-pig trachea. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996;354(5):606-11.
169. Coulson FR, Fryer AD. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther.* 2003;98(1):59-69.



170. Santing RE, Pasma Y, Olymulder CG, Roffel AF, Meurs H, Zaagsma J. Contribution of a cholinergic reflex mechanism to allergen-induced bronchial hyperreactivity in permanently instrumented, unrestrained guinea-pigs. *Br J Pharmacol.* 1995;114(2):414-8.
171. Ten Berge RE, Santing RE, Hamstra JJ, Roffel AF, Zaagsma J. Dysfunction of muscarinic M2 receptors after the early allergic reaction: possible contribution to bronchial hyperresponsiveness in allergic guinea-pigs. *Br J Pharmacol.* 1995;114(4):881-7.
172. Deshpande DA, Walseth TF, Panettieri RA, Kannan MS. CD38/cyclic ADP-ribose-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling contributes to airway smooth muscle hyperresponsiveness. *FASEB J.* 2003;17(3):452-4.
173. Tliba O, Panettieri RA, Jr., Tliba S, Walseth TF, Amrani Y. Tumor necrosis factor-alpha differentially regulates the expression of proinflammatory genes in human airway smooth muscle cells by activation of interferon-beta-dependent CD38 pathway. *Mol Pharmacol.* 2004;66(2):322-9.
174. Deshpande DA, Dogan S, Walseth TF, Miller SM, Amrani Y, Panettieri RA, et al. Modulation of calcium signaling by interleukin-13 in human airway smooth muscle: role of CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31(1):36-42.
175. Tliba O, Cidlowski JA, Amrani Y. CD38 expression is insensitive to steroid action in cells treated with tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by a mechanism involving the up-regulation of the glucocorticoid receptor beta isoform. *Mol Pharmacol.* 2006;69(2):588-96.
176. Starkhammar M, Larsson O, Kumlien Georen S, Leino M, Dahlen SE, Adner M, et al. Toll-like receptor ligands LPS and poly (I:C) exacerbate airway hyperresponsiveness in a model of airway allergy in mice, independently of inflammation. *PLoS One.* 2014;9(8):e104114.
177. Mac Sharry J, Shalaby KH, Marchica C, Farahnak S, Chieh-Li T, Lapthorne S, et al. Concomitant exposure to ovalbumin and endotoxin augments airway inflammation but not airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *PLoS One.* 2014;9(6):e98648.
178. Schwartz DA, Christ WJ, Kleeberger SR, Wohlford-Lenane CL. Inhibition of LPS-induced airway hyperresponsiveness and airway inflammation by LPS antagonists. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(4):L771-8.
179. Hart PH. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunol Cell Biol.* 2001;79(2):149-53.
180. Gao H, Ying S, Dai Y. Pathological Roles of Neutrophil-Mediated Inflammation in Asthma and Its Potential for Therapy as a Target. *J Immunol Res.* 2017;2017:3743048.
181. Spond J, Billah MM, Chapman RW, Egan RW, Hey JA, House A, et al. The role of neutrophils in LPS-induced changes in pulmonary function in conscious rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 2004;17(3):133-40.

182. Jiang H, Qu J, He L, Pan J, Chen X, Li L, et al. Airway hyperresponsiveness induced by repetitive intraperitoneal injection of lipopolysaccharide and the involvement of inflammation and nitric oxide in guinea pigs. *Inflamm Res*. 2006;55(7):286-92.
183. Tliba O, Panettieri RA, Jr. Regulation of inflammation by airway smooth muscle. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008;8(3):262-8.
184. Palsson-McDermott EM, Curtis AM, Goel G, Lauterbach MA, Sheedy FJ, Gleeson LE, et al. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1alpha activity and IL-1beta induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab*. 2015;21(1):65-80.
185. Deplancke B, Gaskins HR. Redox control of the transsulfuration and glutathione biosynthesis pathways. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(1):85-92.
186. Jakaria M, Azam S, Haque ME, Jo SH, Uddin MS, Kim IS, et al. Taurine and its analogs in neurological disorders: Focus on therapeutic potential and molecular mechanisms. *Redox Biol*. 2019;24:101223.
187. Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL, et al. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. *Eur J Pharmacol*. 2013;698(1-3):463-9.
188. Liang M, Jin S, Wu DD, Wang MJ, Zhu YC. Hydrogen sulfide improves glucose metabolism and prevents hypertrophy in cardiomyocytes. *Nitric Oxide*. 2015;46:114-22.
189. Chang L, Geng B, Yu F, Zhao J, Jiang H, Du J, et al. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino Acids*. 2008;34(4):573-85.
190. Subhash N, Sriram R, Kurian GA. Sodium thiosulfate protects brain in rat model of adenine induced vascular calcification. *Neurochem Int*. 2015;90:193-203.
191. Salman ZK, Refaat R, Selima E, El Sarha A, Ismail MA. The combined effect of metformin and L-cysteine on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Eur J Pharmacol*. 2013;714(1-3):448-55.
192. Oz HS, Chen TS, Nagasawa H. Comparative efficacies of 2 cysteine prodrugs and a glutathione delivery agent in a colitis model. *Transl Res*. 2007;150(2):122-9.
193. Song Z, Tong G, Xiao K, Jiao le F, Ke Y, Hu C. L-cysteine protects intestinal integrity, attenuates intestinal inflammation and oxidant stress, and modulates NF-kappaB and Nrf2 pathways in weaned piglets after LPS challenge. *Innate Immun*. 2016;22(3):152-61.
194. Santangelo F. The regulation of sulphurated amino acid junctions: fact or fiction in the field of inflammation? *Amino Acids*. 2002;23(4):359-65.
195. Raza H, John A, Shafarin J. Potentiation of LPS-Induced Apoptotic Cell Death in Human Hepatoma HepG2 Cells by Aspirin via ROS and Mitochondrial Dysfunction: Protection by N-Acetyl Cysteine. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159750.

196. Khan AA, Schuler MM, Prior MG, Yong S, Coppock RW, Florence LZ, et al. Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990;103(3):482-90.
197. Wells SM, Holian A. Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells. *Am J Resp Cell Mol.* 2007;36(5):520-8.
198. Akata K, Yatera K, Wang KY, Naito K, Ogoshi T, Noguchi S, et al. Decreased Bronchial Eosinophilic Inflammation and Mucus Hypersecretion in Asthmatic Mice Lacking All Nitric Oxide Synthase Isoforms. *Lung.* 2016;194(1):121-4.
199. Shin TS, Lee BJ, Tae YM, Kim YS, Jeon SG, Gho YS, et al. Role of inducible nitric oxide synthase on the development of virus-associated asthma exacerbation which is dependent on Th1 and Th17 cell responses. *Exp Mol Med.* 2010;42(10):721-30.
200. Bratt JM, Franzi LM, Linderholm AL, Last MS, Kenyon NJ, Last JA. Arginase enzymes in isolated airways from normal and nitric oxide synthase 2-knockout mice exposed to ovalbumin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;234(3):273-80.

## 8. EKLER

### EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

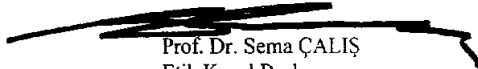
Sayı : 52338575 -21

#### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

<b>TOPLANTI TARİHİ</b>	: 21.02.2017 (SALI)
<b>TOPLANTI SAYISI</b>	: 2017/02
<b>DOSYA KAYIT NUMARASI</b>	: 2017/16
<b>KARAR NUMARASI</b>	: 2017/16 -8
<b>ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ</b>	: Prof. Dr. İnci ERDEMLİ
<b>HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI</b>	: Ecz. Yasemin KARAMAN, Dr. Ecz. Yeşim Kaya YAŞAR, Doç. Dr. T. Emrah BOZKURT
<b>YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR</b>	: Ecz. Yasemin KARAMAN, Dr. Ecz. Yeşim Kaya YAŞAR, Doç. Dr. T. Emrah BOZKURT, Doç. Dr. Sevgen ÖNDER
<b>ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI</b>	: 144 Adet Balb-c Fare (10-12 Hafta)

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. İnci ERDEMLİ' nin araştırma yürütücüsü olduğu 2017/16 kayıt numaralı "*Farelerde Lipopolisakkarit İle İndüklenen Solunum Yolu İnflamasyonunda Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA)' nın Rolünün ve in vivo Hidrojen Sülfür Tedavisinin Etkilerinin Araştırılması*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi' ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.

  
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı

**EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri**

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 ~ 44

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI**

<b>TOPLANTI TARİHİ</b>	: 28.03.2017 (SALI)
<b>TOPLANTI SAYISI</b>	: 2017/03
<b>DOSYA KAYIT NUMARASI</b>	: 2017/16
<b>KARAR NUMARASI</b>	: 2017/16 -9
<b>ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ</b>	: Prof. Dr. İnci ERDEMÜLÜ
<b>HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI</b>	: Ecz. Yasemin KARAMAN, Dr. Ecz. Yeşim Kaya YAŞAR, Doç. Dr. T. Emrah BOZKURT
<b>YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR</b>	: Ecz. Yasemin KARAMAN, Dr. Ecz. Yeşim Kaya YAŞAR, Doç. Dr. T. Emrah BOZKURT, Doç. Dr. Sevgen Çelik ÖNDER, Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU
<b>ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI</b>	: 144 Adet Balb-c Fare (10-12 Hafta)

Kurulumuzun 21.02.2017 tarihli toplantısında onaylanmış olan 2017/16 kayıt numaralı *“Farelerde Lipopolisakkarit İle İndüklenen Solunum Yolu İnflamasyonunda Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA)’nın Rolünün ve in vivo Hidrojen Sülfür Tedavisinin Etkilerinin Araştırılması”* isimli projenizde yapacağı katkı nedeni ile Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU’ nun araştırma ekibine katılmasını içeren 20.03.2017 tarihli dilekçeniz Kurulumuzun 28.03.2017 tarihli toplantısında değerlendirilerek **uygun bulunmuş** ve kayıtlarımıza eklenmiştir.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı

## EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu

### FARELERDE LİPOPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENEN SOLUNUM YOLU İNFLAMASYONUNDA MİTOKONDRIYE HEDEFLENDİRİLMİŞ YAVAŞ HİDROJEN SÜLFÜR SALIVEREN AP39'UN VE NİTRİK OKSİT SENTAZ İNHİBİTÖRÜ ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN

#### ORIJINALLIK RAPORU

<b>%5</b>	<b>%4</b>	<b>%2</b>	<b>%4</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>istanbulsaglik.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>2</b>	<b>Submitted to Istanbul University</b> Öğrenci Ödevi	<b>%1</b>
<b>3</b>	<b>Submitted to The Scientific &amp; Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)</b> Öğrenci Ödevi	<b>&lt;%1</b>
<b>4</b>	<b>d-nb.info</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>5</b>	<b>Submitted to Marmara University</b> Öğrenci Ödevi	<b>&lt;%1</b>
<b>6</b>	<b>Submitted to Mersin Üniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	<b>&lt;%1</b>
<b>7</b>	<b>adudspace.adu.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>

**EK-2: Dijital Makbuz**

## Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Yasemin Karaman Kutluay  
 Ödev başlığı: FARELERDE LIPOPOLISAKKARİT İ..  
 Gönderi Başlığı: FARELERDE LIPOPOLISAKKARİT İ..  
 Dosya adı: Tez\_13122019.docx  
 Dosya boyutu: 7.01M  
 Sayfa sayısı: 102  
 Kelime sayısı: 23,768  
 Karakter sayısı: 162,016  
 Gönderim Tarihi: 15-Ara-2019 09:53PM (UTC+0300)  
 Gönderim Numarası: 1234866956



### **EK-3: Tez çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar**

#### **1. Revizyon Aşamasında Olan Yayınlar**

**Karaman-Kutluay, Y., Kaya-Yasar, Y., Bozkurt T.E., Onder, S.C., Sahin-Erdemli I.** Hydrogen sulfide donors prevent lipopolysaccharide-induced airway hyperreactivity in an *in vitro* model of chronic inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology* (Manuscript Number: EJP-49974).

#### **2. Bildiriler**

**Karaman-Kutluay, Y., Kaya-Yasar, Y., Bozkurt T.E., Sahin-Erdemli I.** Hydrogen sulphide donors prevent hyperreactivity of mice tracheas in an *in vitro* lipopolysaccharide-induced inflammation model. European Respiratory Society International Congress 2018, 15-19 Eylül 2018, Paris, Fransa (sözlü sunum).

**Karaman-Kutluay, Y., Kaya-Yasar, Y., Bozkurt T.E., Onder, S.C., Sahin-Erdemli I.** Intranasal treatment with the mitochondria-targeted slow hydrogen sulphide releasing donor AP39 prevents inflammation-induced airway hyperreactivity in mice. European Respiratory Society International Congress 2019, 28 Eylül-2 Ekim 2019, Madrid, İspanya (poster sunumu).

**Karaman-Kutluay, Y., Kaya-Yasar, Y., Bozkurt, T.E., Sahin-Erdemli, I.** (2017). Doku Kültüründe Fare Trakeasının Lipopolisakkarit İle İnkübasyonu İle Gelişen Hiperreaktivite Üzerine Hızlı (NaHS) Ve Yavaş (GY4137) Salıveren H<sub>2</sub>S Donörlerinin Etkileri. Türk Farmakoloji Derneği 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon, Sözlü Sunum No: S012.

**Karaman-Kutluay, Y., Kaya-Yasar, Y., Bozkurt T.E., Onder, S.C., Sahin-Erdemli I.** Mitokondriye Hedeflendirilmiş Yavaş Salıveren Hidrojen Sülfür Donörünün (AP39) Farede Lipopolisakkarit İle Oluşturulan Solunum Yolu İnflamasyonu Üzerine Etkileri. Türk Farmakoloji Derneği 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7 Kasım 2019, Kuşadası, Sözlü Sunum No: SS-01.



## 9. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

**Adı Soyadı:** Yasemin KARAMAN KUTLUAY

**Doğum yeri:** Ankara

**Doğum tarihi:** 23.02.1990

### Eğitimi

**2014-** **Doktora**  
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara

**2008-2013** **Lisans**  
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara, 3.27 / 4

**2004-2008** **Lise**  
Gazi Anadolu Lisesi, Ankara 88 / 100

### Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler

Türk Farmakoloji Derneği (2014- )

Türk Toraks Derneği (2018- )

European Respiratory Society (2019- )

### Burslar

TÜBİTAK ARDEB 3001 – Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamında yürütülen 315S289 numaralı “Hidrojen Sülfür'ün Farede Lipopolisakkarit ile Oluşturulan Deneysel Solunum Yolu İnflamasyonu Üzerine Etkileri” başlıklı proje bursiyeri (2016-2018)

YÖK 100/2000 Doktora Bursu (2017- )

### Görev Alınan Projeler

1. Lipopolisakkarit ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda 5-hidroksitriptamin (5-HT) hiperreaktivitesinin mekanizmasının incelenmesi. Prof. Dr. İnci Şahin-Erdemli (Proje Yöneticisi), Doç. Dr. Turgut Emrah Bozkurt, Yeşim Kaya, **Yasemin Karaman**.

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Hızlı Destek Projesi, Proje No: THD-2016-9383 (2016-2016).

2. Hidrojen sülfür'ün farede lipopolisakkarit ile oluşturulan deneysel solunum yolu inflamasyonu üzerine etkileri. Doç. Dr. Turgut Emrah Bozkurt (Proje Yöneticisi), Prof. Dr. İnci Şahin-Erdemli, Doç. Dr. Sevgen Önder, Yeşim Kaya, **Yasemin Karaman**.

TÜBİTAK, 3001 Başlangıç AR-GE Projeleri Destekleme Programı, Proje No: 315S289 (2016-2018).

3. Farelerde lipopolisakkarit ile indüklenen solunum yolu inflamasyonunda asimetric dimetil arjinin (ADMA)'nın rolünün ve *in vivo* hidrojen sülfür tedavisinin etkilerinin araştırılması. Doç. Dr. Turgut Emrah Bozkurt (Proje Yöneticisi), Prof. Dr. İnci Erdemli, Doç. Dr. Sevgen Önder, Doç. Dr. Emirhan Nemutlu Dr. Öğr. Üyesi Yeşim Kaya Yaşar, **Yasemin Karaman**.

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Kapsamlı Araştırma Projesi, Proje No: TSA-2017-14475. (2017- ).

## YAYINLAR

### Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI, SSCI, Arts and Humanities)

1. Kaya-Yasar, Y., **Karaman, Y.**, Bozkurt T.E., Onder, S.C., Sahin-Erdemli I. (2017). Effects of intranasal treatment with slow (GYY4137) and rapid (NaHS) donors of hydrogen sulfide in lipopolysaccharide-induced airway inflammation in mice. *Pulm Pharmacol Ther.* 45:170-180.

### Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan özet türünden makaleler (SCI, SSCI, Arts and Humanities)

1. **Karaman-Kutluay, Y.**, Kaya-Yasar, Y., Bozkurt T.E., Sahin-Erdemli I. (2018). Hydrogen sulphide donors prevent hyperreactivity of mice tracheas in an *in vitro* lipopolysaccharide-induced inflammation model. *European Respiratory Journal*, 52: Supp. 62, OA1942.

**2. Karaman-Kutluay, Y.,** Kaya-Yasar, Y., Bozkurt T.E., Onder, S.C., Sahin-Erdemli I. Intranasal treatment with the mitochondria-targeted slow hydrogen sulphide releasing donor AP39 prevents inflammation-induced airway hyperreactivity in mice. *European Respiratory Journal*, 54: Supp. 63, PA3879.

#### **Uluslararası hakemli dergiye gönderilmiş ve revizyon aşamasında olan makaleler**

**1. Karaman-Kutluay, Y.,** Kaya-Yasar, Y., Bozkurt T.E., Onder, S.C., Sahin-Erdemli I. Hydrogen sulfide donors prevent lipopolysaccharide-induced airway hyperreactivity in an *in vitro* model of chronic inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology* (Manuscript Number: EJP-49974).

#### **Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan/Dergi Özel Sayılarında Yayımlanmış Bildiriler**

**1.** Kaya Y., **Karaman, Y.,** Bozkurt, T.E., Sahin-Erdemli, I. Evaluation of the mechanism of tracheal hyperreactivity to 5-hydroxytryptamine in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. 7<sup>th</sup> European Congress of Pharmacology (EPHAR 2016), 26-30 Haziran, 2016, İstanbul, Türkiye (poster sunumu).

**2. Karaman-Kutluay, Y.,** Kaya-Yasar, Y., Bozkurt T.E., Sahin-Erdemli I. Hydrogen sulphide donors prevent hyperreactivity of mice tracheas in an *in vitro* lipopolysaccharide-induced inflammation model. European Respiratory Society International Congress 2018, 15-19 Eylül 2018, Paris, Fransa (sözlü sunum).

**3. Karaman-Kutluay, Y.,** Kaya-Yasar, Y., Bozkurt T.E., Onder, S.C., Sahin-Erdemli I. Intranasal treatment with the mitochondria-targeted slow hydrogen sulphide releasing donor AP39 prevents inflammation-induced airway hyperreactivity in mice. European Respiratory Society International Congress 2019, 28 Eylül-2 Ekim 2019, Madrid, İspanya (poster sunumu).

#### **Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:**

**1. Karaman-Kutluay, Y.,** Kaya-Yasar, Y., Bozkurt, T.E., Sahin-Erdemli, I. (2017). Doku Kültüründe Fare Trakeasının Lipopolisakkarit İle İnkübasyonu İle Gelişen Hiperreaktivite Üzerine Hızlı (NaHS) Ve Yavaş (GYY4137) Salıveren H<sub>2</sub>S Donörlerinin Etkileri. Türk Farmakoloji Derneği 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon, Sözlü Sunum No: S012.

**2. Karaman-Kutluay, Y., Kaya-Yasar, Y., Bozkurt T.E., Onder, S.C., Sahin-Erdemli I.** Mitokondriye Hedeflendirilmiş Yavaş Salıveren Hidrojen Sülfür Donörünün (AP39) Farede Lipopolisakkarit İle Oluşturulan Solunum Yolu İnflamasyonu Üzerine Etkileri. Türk Farmakoloji Derneği 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7 Kasım 2019, Kuşadası, Sözlü Sunum.