

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL ALERJİK ASTIM MODELİNDE MİTOKONDİRİ HEDEFLİ
HİDROJEN SÜLFÜR DONÖRÜ AP39 TEDAVİSİNİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Ecz. Bartu ALTIPARMAK

Farmakoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL ALERJİK ASTIM MODELİNDE MİTOKONDİRİ HEDEFLİ
HİDROJEN SÜLFÜR DONÖRÜ AP39 TEDAVİSİNİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Ecz. Bartu ALTIPARMAK

Farmakoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Turgut Emrah BOZKURT

ANKARA

2023

ONAY SAYFASI

**DENEYSEL ALERJİK ASTİM MODELİNDE MİTOKONDRİ HEDEFLİ HİDROJEN SÜLFÜR
DONÖRÜ AP39 TEDAVİSİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI****ÖĞRENCİ: Bartu ALTIPARMAK****Danışman: Prof. Dr. Turgut Emrah BOZKURT**

Bu tez çalışması 4 Ağustos 2023 tarihinde jürimiz tarafından "Farmakoloji Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Arif Tanju ÖZÇELİKAY*
(Ankara Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Turgut Emrah BOZKURT*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Nezahat Tuğba KANDİLCİ*
(Hacettepe Üniversitesi)

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

9 Ağustos 2023

*Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN***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 izni 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.

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

04 / 08 / 2023

Ecz. Bartu Altıparmak

i

ⁱ“**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 metotların kullanıldığı, 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 tezlere 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 zgn olduğunu, Prof. Dr. Turgut Emrah BOZKURT danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Bartu ALTIPARMAK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans yolculuğuna başladığım ilk günden beri beni bilimsel ve manevi olarak her zaman destekleyen, tez çalışması ve meslek hayatıyla ilgili çok kıymetli bilgiler veren, özveri ve samimiyetiyle bana sürekli katkı sağlamaya çalışan, eğitimimi en iyi şekilde kurgulamak için vaktini ayıran ve imkanları zorlayan çok sevgili ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Turgut Emrah BOZKURT'a

Bize uygun laboratuvar şartlarının oluşmasını sağlayan ve çalışmalarımızı destekleyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nezahat Tuğba KANDİLCİ'ye

Laboratuvar çalışmaları ve proje ile ilgili her şeyi çekinmeden sorduğum, bana bilmem gereken bütün bilgileri öğreten ve içtenlikle tecrübelerini aktaran, çalışmalarımı bitirebilmemde çok büyük emeği olan sevgili Öğr. Gör. Dr. Ecz. Yasemin KARAMAN'a

Tez çalışmamın histopatolojik incelemelerindeki kıymetli katkıları için Sayın Doç. Dr. Sevgen Çelik ÖNDER'e ve Öğr. Gör. Dr. Olcay KURTULAN'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca kıymetli tecrübelerini aktaran, gelişimimde büyük katkıları olan, Farmakoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli hocalarına,

Laboratuvarda ve hayvan bakım odalarında çalışmalarımıza destek veren, hayvanların barındırılması ve deney sürecinde önemli yardımları olan personel abilerime,

Yüksek lisans programı süresince, laboratuvar ve teorik eğitimlerde her zaman yanımda olan, samimi ve eğlenceli bir çalışma ortamı oluşturan, deney günlerini güzelleştiren tüm çalışma arkadaşlarıma,

En büyük destekçilerim olan, bu süreçte bana güç veren, mutluluk kaynağım çok sevgili aileme ve sevgilime

Tüm kalbimle teşekkür ediyorum ve şükranlarımı sunuyorum.

ÖZET

Altıparmak, B., Deneysel Alerjik Astım Modelinde Mitokondri Hedefli Hidrojen Sülfür Donörü AP39 Tedavisinin Etkisinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Bu tez çalışmasında farelerde ovalbumin (OVA) ile indüklenen alerjik astım modelinde mitokondriye hedeflendirilmiş yavaş hidrojen sülfür (H₂S) salıveren donör AP39'un etkileri incelendi. Bu modelde fareler, intraperitoneal OVA uygulamasıyla duyarlı hale getirildikten sonra intranasal (i.n.) OVA uygulanması ile deneysel alerjik solunum yolu inflamasyonu oluşturuldu ve bu farelerde i.n. 250 ve 1000 nmol/kg dozlarında AP39 tedavisi uygulandı. AP39 tedavisi, farelerde OVA'nın neden olduğu bronşiyal hiperreaktiviteyi önemli ölçüde önledi. OVA uygulaması farelerin bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvılarında lenfosit ve eozinofil sayısında da artışa neden oldu ve bu artışlar AP39 tedavisinin 1000 nmol/kg dozu ile engellendi. Yüksek doz AP39 (1000 nmol/kg) tedavisi, BAL'daki artmış olan IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokin düzeylerini de baskımlarken, düşük AP39 dozu (250 nmol/kg) bu sitokinlerin düzeylerini etkilemedi. OVA uygulamasına bağlı olarak akciğer dokusunda meydana gelen histopatolojik değişiklikler de yüksek doz AP39 tedavisi ile azaldı. Bu sonuçlara dayanarak AP39, alerjik astımın klinik bulguları olan bronşiyal hiperreaktive ve solunum yolu inflamasyonu oluşumunu azaltmıştır. Solunum yolu düz kas hücrelerinde hidrojen sülfürün mitokondriyal fonksiyonları koruması ile alerjik astım oluşumunun engellenmesi ilişkilendirilmiştir. AP39 uygulama dozu ve süresi dahil olmak üzere AP39 tedavi stratejisinin terapötik etkinliğini optimize etmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuç olarak AP39, bir hidrojen sülfür donörü olarak solunum yolu hastalıklarında umut verici bir terapötik potansiyel göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: AP39, hidrojen sülfür, ovalbumin, solunum yolu inflamasyonu, alerjik astım

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (HUBAP) tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2022-20189).

ABSTRACT

Altiparmak, B., Investigation of the Effect of Mitochondria-targeted Hydrogen Sulfide Donor AP39 Treatment in an Experimental Model of Allergic Asthma, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Master of Science in Pharmacology Thesis, Ankara, 2023. In this thesis, the effect of AP39, which is a mitochondria targeted slow releasing hydrogen sulfide (H₂S) donor, were investigated in a mouse model of ovalbumin (OVA)-induced allergic asthma. In this model, experimental allergic airway inflammation was induced by intranasal (i.n.) OVA administration after sensitization of mice by intraperitoneal administration of OVA. AP39 treatment was applied in these mice at doses of 250 and 1000 nmol/kg. AP39 treatment significantly prevented OVA-induced bronchial hyperreactivity in mice. OVA administration also increased lymphocyte and eosinophil cells in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluids of mice, and these increases were inhibited by the 1000 nmol/kg dose of AP39 treatment. While higher dose of AP39 (1000 nmol/kg) treatment suppressed IL-4, IL-5 and IL-13 cytokine levels which increased in BAL, lower dose of AP39 (250 nmol/kg) had no affect on these cytokine levels. OVA-induced histopathological changes in the lung tissue were also reduced with higher dose AP39 treatment. Based on these results, AP39 reduced the occurrence of bronchial hyperreactivity and airway inflammation, which are clinical signs of allergic asthma. This is associated with the effect of hydrogen sulfide in airway smooth muscle cells to preserve mitochondrial function and therefore prevention of the allergic asthma. Further studies are needed to optimize the therapeutic efficacy of the AP39 treatment strategy including the dose and duration of the AP39 application. In conclusion, AP39, as a hydrogen sulfide donor, shows a promising therapeutic potential in respiratory diseases.

Keywords: AP39, hydrogen sulfide, ovalbumin, airway inflammation, allergic asthma

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: TYL-2022-20189).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Astım ve Solunum Yolu İnflamasyonu	2
2.1.1. Bronşiyal Hiperreaktivite	3
2.1.2. Solunum Yolu İnflamasyonunda İnflamatuar Hücreler ve Pro-İnflamatuar Sitokinler	4
2.1.3. Ovalbumin ile Solunum Yolu İnflamasyonu Oluşturma	5
2.2. Mitokondri	5
2.2.1. Solunum Yolu İnflamasyonunda Mitokondrinin Rolü	6
2.3. Hidrojen Sülfür (H ₂ S)	6
2.3.1. Solunum Sisteminde H ₂ S	8
2.3.2. H ₂ S'nin Solunum Yolunda Anti-İnflamatuar Etkinliği	8
2.3.3. Mitokondriye Hedeflendirilmiş Yavaş H ₂ S Salıveren Donör AP39	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1. Hayvanlar ve Barındırılma Şekli	11
3.2. Deney Protokolü	11
3.2.1. Deneysel Solunum Yolu İnflamasyonu	11
3.2.2. Deneysel Solunum Yolu İnflamasyonunda İntranazal H ₂ S Donörü Tedavisi	12

3.3. Solunum Yolu İnflamasyonunun Değerlendirilmesi	12
3.3.1. Solunum Yolu Fonksiyonunun <i>in vivo</i> Olarak Değerlendirilmesi	12
3.3.2. Bronkoalveoler Lavaj (BAL) Sıvısı Örneklerinde İnflamatuvar Hücre Sayımı ve İnflamatuvar Sitokin Düzeyi Ölçümü	14
3.3.3. Histopatolojik Değerlendirme	15
3.4. Bulguların Sunuluşu ve İstatiksel Analizi	15
4. BULGULAR	17
4.1. Solunum Yolu İnflamasyonun Fonksiyonel Olarak Değerlendirilmesi	17
4.2. Bronkoalveoler Lavaj (BAL) Sıvısı Örnekleri İçerisindeki İnflamatuvar Hücrelerin Tayini	20
4.3. Bronkoalveoler Lavaj (BAL) Sıvısı Örnekleri İçerisindeki Sitokin Düzeylerinin Tayini	22
4.4. Histopatolojik Değerlendirme	24
5. TARTIŞMA	28
5.1. OVA ile Oluşturulan <i>in vivo</i> Solunum Yolu İnflamasyonu	28
5.2. OVA ile Oluşturulan Solunum Yolu İnflamasyonunda AP39 Tedavisinin Etkileri	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
7. KAYNAKLAR	36
8. EKLER	44
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzini	
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-3: Dijital Makbuz	

SİMGELER ve KISALTMALAR

3-MST	3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz
AERD	Aspirinle kötüleşen akciğer hastalığı
APC	Antijen sunan hücre
ATP	Adenozin trifosfat
BAL	Bronkoalveoler lavaj
BHR	Bronşiyal hiperreaktivite
Ca⁺²	Kalsiyum
CBS	Sistasyonin-β-sentetaz
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i> (Farklılaşma Kümesi 4)
C_{dyn}	Akciğer kompliyansı
CO	Karbon Monoksit
CSE	Sistasyonin-γ-liyaz
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E_{maks}	Maksimum etki
ETZ	Elektron taşıma zinciri
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FeNO	Fraksiyonel eksalasyon Nitrik Oksit
H₂S	Hidrojen sülfür
i.n.	İntranazal
i.p.	İntraperitoneal
i.t.	İntratrakeal
IgE	İmmünoglobulin E
IL	İnterlökin
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i> (Doğuştan gelen lenfoid hücre)
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LTE4	Lökotrien E4

MMP-9	Matriks metalloproteinaz 9
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NaHS	Sodyum Hidrojen Sülfür
NCOA4	Nükleer reseptör koaktivatörü 4
NLRP3	<i>NOD like receptor</i> (NOD benzeri reseptör)
NO	Nitrik Oksit
Nrf2	Nükleer faktör-eritroid 2 ilgili faktör 2
OVA	Ovalbumin
PBS	Fosfat tamponlu serum fizyolojik
PPAR-γ	Peroksizom proliferatör aktive edici reseptörü-gama
RI	Solunum yolu direnci
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türevleri
SH	Standart hata
Th	T helper
TNF-α	Tümör nekroz faktörü-alfa
TPP⁺	Trifenil fosfonyumdan
TSLP	Timik stromal lenfopietin

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
2.1.	AP39'un kimyasal yapısı.	10
3.1.	Farelerde mikropipet kullanılarak intranasal yolla ilaç uygulaması.	12
3.2.	Farelerin trakealarının kanüle edilmesi.	13
3.3.	Farelerde solunum yolu direncinde meydana gelen değişikliklerin ölçümü.	14
4.1.	Buxco Finepoint Resistance and Compliance System cihazında okunan solunum yolu direncinde (RI) ve kompliyansda (C_{dyn}) metakolin dozuna göre değişen fonksiyonel yanıtın ifadesi.	17
4.2.	Kontrol, OVA ve AP39 tedavisi uygulanan gruplardaki farelerden intratrakeal metakolin ile doza bağımlı olarak elde edilen solunum yolu direnci (RI) yanıtları.	18
4.3.	Kontrol, OVA ve AP39 tedavisi uygulanan gruplardaki farelerden intratrakeal metakolin ile doza bağımlı olarak elde edilen kompliyans (C_{dyn}) yanıtları.	20
4.4.	Kontrol grubu, OVA grubu ve OVA + AP39 tedavisi alan grupların BAL sıvılarındaki lenfosit sayısının toplam hücre sayısındaki yüzdesi.	20
4.5.	Kontrol grubu, OVA grubu ve OVA + AP39 tedavisi alan grupların BAL sıvılarındaki eozinofil sayısının toplam hücre sayısındaki yüzdesi.	21
4.6.	Kontrol grubu, OVA grubu ve OVA + AP39 tedavisi alan grupların BAL sıvılarındaki IL-4 konsantrasyonları.	22
4.7.	Kontrol grubu, OVA grubu ve OVA + AP39 tedavisi alan grupların BAL sıvılarındaki IL-5 konsantrasyonları.	23
4.8.	Kontrol grubu, OVA grubu ve OVA + AP39 tedavisi alan grupların BAL sıvılarındaki IL-13 konsantrasyonları.	23
4.9.	Kontrol grubu, OVA grubu ve OVA + AP39 tedavisi alan grupların akciğer dokularındaki inflamasyon skorları.	25
4.10.	A) Kontrol, B) OVA, C) OVA + AP39 250 nmol/kg, D) OVA + AP39 1000 nmol/kg gruplarının hematoksilen eozin ile boyanmış akciğer doku kesitlerinde bronşiyal dokuların fotoğrafları	26
4.11.	A) Kontrol, B) OVA, C) OVA + AP39 250 nmol/kg, D) OVA + AP39 1000 nmol/kg gruplarının hematoksilen eozin ile boyanmış akciğer doku kesitlerinde parankim dokuların fotoğrafları.	27

TABLULAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Akciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesi için yarı kantitatif skorlama sistemi.	15
4.1.	Kontrol, OVA, OVA + AP39 tedavi ve OVA + çözücü gruplarının intratrakeal metakoline karşı oluşturduğu maksimum solunum yolu direnci yanıtları.	19
4.2.	Kontrol, OVA, OVA + AP39 ve OVA + çözücü gruplarının BAL sıvılarındaki lenfosit ve eozinofil hücre sayısı yüzdeleri.	21
4.3.	Kontrol, OVA ve OVA + AP39 gruplarının BAL sıvılarındaki inflamatuvar sitokin düzeyleri.	24
4.4.	Kontrol, OVA, OVA + AP39 ve OVA + çözücü gruplarının akciğer dokularındaki inflamasyon skorları.	25

1. GİRİŞ

Astım, her yaşta başlayabilen ve toplumun önemli bir kısmını etkileyen solunum yolunun kronik bir inflamatuvar hastalığıdır (1, 2). Astımın, günümüzde radikal bir tedavisi bulunmamakla birlikte, kortikosteroidler, β_2 -adrenerjik reseptör agonistleri, lökotrien reseptör antagonistleri gibi bazı ilaçlar ile hastalığın semptomlarını baskılamak ve ilerlemesini engellemeye yönelik ilaçlar kullanılmaktadır (3, 4). Bu nedenle yeni tedavi yaklaşımlarının gerekliliği ve bu amaçla yapılan çalışmalar günden güne artmaktadır. Hücresel düzeydeki çalışmalarda birçok hastalıkta olduğu gibi solunum yolu hastalıklarının patofizyolojisinde de mitokondri yapı ve fonksiyonlarının bozulmasının katkısı gösterilmiştir. Bu doğrultuda mitokondri fonksiyonlarını düzeltmeye yönelik yaklaşımlar solunum yolu hastalıklarının tedavisinde denenmektedir (5, 6).

Hidrojen sülfür (H_2S), nitrik oksit ve karbon monoksit gibi önemli fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonları olduğu gösterilmiş olan bir endojen gaz mediyatördür (7). H_2S sentezleyen enzimler solunum sisteminde yüksek oranda eksprese edilir ve H_2S 'nin solunum sisteminin fonksiyonlarında ciddi rol oynadığı düşünülmektedir. Fizyolojik ortama H_2S salıveren bileşiklerin deneysel tedavi modellerinde solunum yolundaki inflamasyona olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (8). Ancak literatürde mitokondriye hedeflendirilmiş H_2S salıveren yeni bileşiklerin solunum yolu inflamasyonuna etkilerine ait veri bulunmamaktadır.

Ovalbumin (OVA), farelerde alerjik astım modeli geliştirmek amacıyla en sık kullanılan alerjendir (9). Bu tez çalışmasında farelerde OVA ile indüklenen *in vivo* deneysel solunum yolu inflamasyonu modelinde, fizyolojik ortamda H_2S 'i yavaş salıveren ve mitokondriye hedeflendirilmiş bir donör olan AP39 tedavisinin etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Astım ve Solunum Yolu İnflamasyonu

Astım, 18 yaşın altında %5,8 ve yetişkinlerde %8,4-10 görülme oranı ve 1,3/100.000 ölüm oranıyla solunum sisteminin multifaktöriyel kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. Astım tipik olarak hırıltılı soluma, nefes darlığı, öksürük ve göğüste sıkışma hissi gibi semptomları içeren, solunum yollarındaki daralmaya bağlı, hava akımının kısıtlanmasıyla karakterize bir tablodur (10, 11). Mevcut tablo toz, akar, polen, kimyasal maruziyetleri gibi dış tetikleyici bir etkenin tekrarlayan maruziyetiyle solunum yollarında hiperreaktivite oluşumu ile başlar. Hastalığın immünopatogenezi; etioloji, patojenik mekanizmalar, semptomlar ve hastalık şiddeti açısından farklılık göstermektedir. Solunum yolu inflamasyonuna göre astım, tip 2 (T2-yüksek, alerjik astım), tip 2 olmayan (T2-düşük, alerjik olmayan astım) şeklinde ikiye ayrılır. Alerjik astım daha yaygın olarak görülmektedir (12-14).

Alerjik astım kendi içerisinde 3 fenotipte incelenebilir:

1. Atopik fenotip iyi tanımlanmış, erken yaşta başlayan, steroide iyi yanıt veren bir fenotiptir ve altta yatan immün moleküler mekanizma alerjik sensitizasyondur. Kan ve balgamda eozinofil hücre artışı, serumda alerjene spesifik (İmmünoglobulin E) IgE varlığı ve FeNO (Nitrik Oksit'in fraksiyonel atılımı) yüksekliği ile karakterizedir. Sıklıkla akciğer fonksiyonlarında azalma yaratmaz. Kolaylıkla tanınabilir ve tedaviye yanıtı çok iyidir.
2. Geç başlangıçlı fenotip ise kronik rinosinüzit ve nazal polip ile seyreden, steroide düşük yanıtı ya da yanıtızsız, *Staphylococcus aureus* enterotoksinine sekonder gelişen IgE ve IL-5, kan/balgam eozinofil sayısı artmış, yüksek FeNO ile karakterize şiddetli ve sık atak tablosu yaratan fenotiptir.
3. AERD (Aspirinle kötüleşen akciğer hastalığı) ise araşidonik asit metabolizmasında disregülasyonla karakterizedir. Bu tipte de kan/balgam eozinofil sayıları artar ve idrarda LTE4 (Lökotrien E4) izlenir. Bu tabloda da şiddetli hastalık aktivitesi ilk zamanlarda dahi görülür ve sık ataklı seyretmektedir (15-17).

Alerjik olmayan solunum yolu inflamasyonu da alt fenotiplere ayrılır. Non-atopik (pauci- granulositik/nötrofilik) fenotipi; NLRP3/IL-1B varlığı, değişmiş mikro-RNA ekspresyonu ve Th17 inflamasyonu ile karakterizedir. Bu tipte balgamda nötrofil artışı izlenir. Bronkoalveolar lavaj sıvısında artmış matris metalloproteinaz 9 (MMP-9) tespit edilebilir. Kliniğin şiddeti ve ilaca yanıt değişkendir. Diğer bir fenotip sigara içen yaşlı popülasyonda görülen tiptir. Oksidatif stres, sık tekrarlayan ataklar ve akciğer kapasitesinde azalış görülür. Bir diğer fenotipi obeziteyle ilişkili daha çok kadınlarda karşılaşılan, nötrofil hakim inflamasyonun olduğu, serum IL-6 düzeylerinde artış, şiddetli semptomlar ve oksidatif stres görülen ama nispeten korunmuş akciğer fonksiyonlarıyla karakterize formudur. Son olarak da yaşlı popülasyonda Th1/Th17 aracılı inflamasyon da; balgam nötrofil artışı ve steroide dirençle izlenen bir form olarak karşımıza çıkar (15, 17).

2.1.1. Bronşiyal Hiperreaktivite

Bronşiyal hiperreaktivite (BHR), bronkokonstriksiyona yol açabilecek çeşitli dış uyaranlara karşı oluşan aşırı bir yanıttır (18). Astımın önemli bir özelliği olan BHR, sadece astıma özgü olmayıp, viral solunum yolu enfeksiyonları, tütün kullanımı, atopi, bronşiektazi, kistik fibrozis, duman inhalasyonu, bronkopulmoner displazi gibi durumlarda da görülmektedir (19, 20). Atopik olan bireylerde çocukluk döneminden yetişkinliğe geçişte BHR daha da belirginleşebilir. Ayrıca BHR derecesiyle, bireylerin serum IgE düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon mevcuttur. Dolayısıyla bu durum sayesinde astım tanısında da BHR olması yol göstericidir (20).

BHR' nin mekanizması net olmasa da ortaya konulan veriler ışığında; düz kasta kontraktilite artışı, düz kas bronşiyal duvar kalınlığının artışı, solunum yolunun otonomik kontrolünde ve solunum yolu epitelindeki değişikliklere bağlı olarak BHR gelişebilir. BHR, kronik ve/veya akut inflamatuvar durumlarda görülmektedir. Bu yanıtta birden çok mekanizma ve farklı yolları uyaran inflamatuvar hücreler ve moleküller rol oynamaktadır. Bu sebeple de, yukarıda bahsedilmiş olan farklı solunum yolu inflamasyonu fenotipleri görülmektedir (21, 22).

2.1.2. Solunum Yolu İnflamasyonunda İnflamatuvar Hücreler ve Pro-İnflamatuvar Sitokinler

Solunum yolu inflamasyonunun endotiplenmesine ilişkin ilk görüşler CD4⁺ T-hücre yanıtıyla ilişkiliydi. Astımdaki CD4⁺ T-hücre yanıtları oldukça çeşitli ve inflamasyonun alt tipine göre ilişkili immün yolakları gösteren çok sayıda alt-grup içermekteydi (23). CD4⁺ T hücre alt gruplarının (Th1 ve Th2) keşfedilmesinden bu yana, Th2 hücrelerinin IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokin yanıtlarına sekonder olarak eozinofilik solunum yolu inflamasyonunun başlıca itici gücü olduğu fark edilmişti (24, 25). Kortikosteroid bağımlı solunum yolu inflamasyonunun sınıflandırılması eozinofil hücrelerinin varlığına göre Th2-yüksek ve Th2-düşük diye ayrılmasından sonra immün hücre ve moleküllerin bu karmaşık patolojideki rolü gösterilmeye başlanmıştır (23). Buna örnek, grup 2 doğuştan gelen lenfoid hücrelerin (ILC2'ler) patogeneizde kritik bir rol oynadığıdır. ILC'ler, T ve B lenfositlerden farklı olarak klasik alerjenlere özgü aktivasyona katılmayan, naif doğal lenfosit ailesini oluşturur (25-27). ILC2'ler özellikle hava yolu epitelinde yüksek oranda bulunur ve inflamasyona (epitel hücrelerinden salınan aracı alarminlere) yanıt olarak büyük miktarlarda IL-5 ve IL-13 üretirler (27).

Alarminler ise timik stromal lenfopietin (TSLP), IL-25 ve IL-33 dahil olmak üzere epitelden türetilen araçlardır. Bunlar, enfeksiyona ve alerjen kaynaklı inflamasyona yanıt olarak çoklu tip 2 sinyal yollarını başlatan (ana transkripsiyon faktörü GATA3' tür) sitokin araçlarıdır (28). IL-25 ve IL-33 esas olarak ILC2'leri aktive ederken; TSLP, T ve B hücreleriyle tip 2 bağışıklığı aktive etmek adına dendritik hücreler tarafından oluşturulan antijen sunan hücreleri (APC) hazırlar (28-30). IL-33, kendisi ve reseptörü ST2'nin genetik varyantlarının atopik astımla ilişkisi nedeniyle tip 2 bağışıklıkta vurgulanan IL-1 sitokin ailesinin bir üyesidir (27, 30). IL-25 ve IL-33'ün benzer immün fonksiyonları olmasının yanında, IL-33-ST2, T2- yüksek astım için kritik bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir (29). Astım patogenezindeki rollerini göstermek için, ilgili alerjene maruz kalan hastalardan alınan akciğer biyopsilerinde bu sitokinlerin hava yolu dokusunda artan transkripsiyonu gösterilmiştir (30).

2.1.3. Ovalbumin ile Solunum Yolu İnflamasyonu Oluşturma

Ovalbumin (OVA), yumurta beyazında bulunan ana proteindir ve yumurta proteinin yaklaşık %55'ini oluşturur (31). İşlevi tam bilinmemekle beraber depo protein olarak kabul edilmektedir (32). OVA modeli genellikle 'klasik' fare alerjik astım modeli olarak tanımlanır ancak standart bir OVA modeli yoktur. Protokoldeki dozlamalar duyarlılaştırma ve yükleme olarak iki aşamaya ayrılabilir. OVA, intraperitoneal (i.p.), intranasal (i.n.) veya intratrakeal (i.t.) yol ile fareye uygulanır. Dozlama sayıları, dozlama miktarları ve protokol süreleri deneyler arası oldukça farklıdır (9).

OVA maruziyeti sonrası fareler; serumda alerjene özgü IgE düzeylerinin artması, solunum yolunda eozinofil ve Th2 hücre infiltrasyonu, aşırı mukus üretimi ve solunum yolunun yeniden şekillenmesi ile kolajen birikimi dahil olmak üzere klinik alerjik astımın temel özelliklerini gösterir. Ayrıca bu farelerde metakolin ile BHR oluşma şiddeti artar (33).

2.2. Mitokondri

Mitokondri, hücrede enerji döngüsü için çok kritik bir hücre içi organelidir. Oksidatif fosforilasyon ile hücresel enerji kaynağı olan adenosin trifosfat (ATP), mitokondride üretilir. Bu olaya aerobik solunum denir. Mitokondri, solunum yolu düz kas hücrelerinde yüksek oranda bulunmaktadır ve kalsiyum (Ca^{+2}) homeostazında kritik rolü vardır (34). Mitokondrideki kalsiyum konsantrasyonu, ATP üretiminin önemli bir düzenleyicisidir. Mitokondri matrisindeki kalsiyum bağımlı dehidrogenazlar, kalsiyum artışına bağlı olarak nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) ve flavin adenin dinükleotidi (FAD) indirgerler (35). Mitokondri, kalsiyumunu hızla içine alabilir, salıverebilir ve içinde depolayabilir. Bu özellikleriyle hücresel kalsiyum homeostazını sağlar (34).

Reaktif oksijen türevleri (ROS), ikincil mesajcı olarak fizyolojik sinyal yollarında rol almaktadır. Ancak ROS, aynı zamanda DNA (deoksiribo nükleik asit) ve proteinlerin hasar görmesine yol açan ve hücre ölümüne neden olan bir maddedir.

Mitokondride gerçekleşen ETZ (elektron taşıma zinciri) olayında açığa çıkan elektronlar, oksijenle reaksiyona girer ve ROS'un ana yapısı olan süperoksit anyonunu oluşturur (34, 36).

ATP sentezi, kalsiyum homeostazı ve ROS düzeyi; hücrenin ve genel organizmanın fonksiyonlarını sağlıklı yürütebilmesi için çok önemlidir. Birçok hücrede önemli olduğu gibi solunum yolu düz kası fizyolojisi için de mitokondri yapısının ve fonksiyonun korunması gereklidir. Bu yüzden solunum yolu hastalıklarının tedavisinde mitokondriyi hedefleyen stratejiler gün geçtikçe önem kazanmaktadır (34, 37, 38).

2.2.1. Solunum Yolu İnflamasyonunda Mitokondrinin Rolü

ATP üretiminin azalması, kalsiyum homeostazının bozulması ve ROS düzeyinin artması mitokondriyal disfonksiyona işaret etmektedir. Astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) ve birçok solunum yolu hastalığının hücresel boyuttaki sebeplerinde mitokondriyal disfonksiyonun önemli olduğu düşünülmektedir. Solunum yolu inflamasyonunda da mitokondriyal disfonksiyon geliştiği gözlenmiştir (5). Alerjik astım hastalarında ve alerjik astım hayvan modellerinde, solunum yolu düz kas hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyon gözlemlenmiştir. ROS gibi inflamatuvar mediyatörler de mitokondriyal disfonksiyonlara sebep olabilir. İnflamatuvar mediyatörler, mitokondriyal kalsiyum transportunu bozarak sitoplazmadaki kalsiyum konsantrasyonunu değiştirebilirler. Bu da solunum yolu düz kasında normalden fazla kasılma meydana getirir (39, 40).

2.3. Hidrojen Sülfür (H₂S)

Hidrojen Sülfür (H₂S); yanıcı, suda çözünen, renksiz, çürük yumurta kokulu bir gazdır. H₂S, tarihi kayıtlarda ilk kez 1700'lü yıllarda İtalyan doktor Bernardino Ramazzini'nin, "De Morbis Artificum Diatriba" kitabında geçmiştir. Ramazzini, H₂S'yi lağım gazı olarak tarif etmiş, ağırlı göz tahrişine ve iltihaplanmasına yol açtığını gözlemlemiştir. 1770'li yıllarda bu gazın, H₂S olduğu bulunmuş ve ilk kez tanımlanmıştır (41). Daha sonrasında yüksek dozda H₂S maruziyetinin solunum yolu

felci sonucunda ölüme yol açtığı bulunmuştur. Bu öldürücü etkisinden dolayı savaş silahı ve intihar yöntemi olarak da kullanılmıştır. 2000'li yılların ortalarına kadar literatürün çoğu hidrojen sülfürü (H_2S), sadece bir çevresel toksin ve zehirli gaz olarak görmüştür. Bunlar hep toksikolojik etki biçimlerine odaklanılmış çalışmalardır (42-44).

H_2S 'nin endojen olarak üretildiği ve çeşitli biyolojik fonksiyonlarının olduğu yakın tarihlerde kabul edilmiştir. Mikrobiyoloji alanında, 1900'lerin başından itibaren bakteriyel bir ürün olarak kabul edilmiştir. H_2S 'nin bir memeli biyolojik ürünü olarak tanınması ilk olarak 1940'lardadır. Son yirmi yılda, Nitrik Oksit (NO) ve Karbon Monoksit (CO) ile son gaz mediyatör ve çoklu düzenleyici işlevlerinin olduğu kabul edilmeye başlanmıştır (45-48).

H_2S 'nin, endojen sentezi L-sistein amino asidinin hücre içerisinde enzimatik desülfürizasyon reaksiyonuyla gerçekleşmektedir. Bu sentezi katalizleyen üç enzim vardır. Bunlardan sistasyonin- γ -liyaz (CSE) ve sistasyonin- β -sentetaz (CBS) sitoplazmada, 3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz (3-MST) ise mitokondride bulunur (45, 48, 49).

Endojen H_2S , çok hızlı şekilde enzimatik ve enzimatik olmayan yolla üretilmekte ve yıkılmaktadır. Ekzojen H_2S 'nin dokular üzerindeki fizyolojik etkilerini araştırmak için fizyolojik pH'da H_2S salıveren donör bileşikler kullanılmaktadır. Bu donörler H_2S salıverme hızlarına göre ikiye ayrılır. Sülfür tuzları, H_2S 'i hızlı salıveren ve *in vitro* deneylerde en çok kullanılan bileşiklerdir. Bu tuzların prototipi Sodyum Hidrojen Sülfür'dür (NaHS). Birkaç saniyede yüksek konsantrasyonda H_2S salıvermesiyle dokularda anlık yüksek doz maruziyet görülür. Bu yüzden hızlı salıveren donörler ilaç olarak kullanılmaya uygun değildir. Sabit ve düşük H_2S konsantrasyonu sağlayabilmek adına sentetik bileşikler geliştirilmiştir. Bu bileşikler H_2S 'i yavaş şekilde salıverirler ve endojen H_2S üretimini daha iyi taklit edebilirler. Genellikle etkileri birkaç dakikada başlar ve saatlerce etki görülür (49, 50).

2.3.1. Solunum Sisteminde H₂S

H₂S sentezleyen enzimlerin canlı türlerine ve hücre tiplerine göre ekspresyonları değişiklik göstermektedir. İnsan akciğer dokusu ve solunum yolu düz kaslarında CSE ve CBS proteinleri bulunmuştur (51, 52). Fare akciğer dokularındaysa insana benzer olarak; pulmoner damar, endotel hücreler ve solunum yolu düz kasında CSE ve CBS enzimlerinin eksprese edildiği görülmüştür (53). Sıçan akciğer dokularında ise esas H₂S sentezleyen enzimin CSE olduğu bulunmuştur (54).

Bronşiyal düz kas hücrelerinde H₂S'nin gevşetici etkisi olduğu ispatlanmıştır (55, 56). Farelerde yapılan deneysel çalışmalarda H₂S salıveren bileşiklerin bronşları gevşettiği, inflamasyonu giderdiği, oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Astımlı sıçan modellerinde de NaHS uygulamasının benzer etkileri olduğu bildirilmiştir (50, 54, 57).

Endojen H₂S'nin, KOAH, akut akciğer hasarı, astım, akciğer kanseri, pnömoni, pulmoner ödem, pulmoner fibrozis, pulmoner hipertansiyon, uyku apnesi gibi solunum sisteminde görülen birçok hastalığın patofizyolojileriyle ilişkisi olduğu saptanmış ve bu etki mekanizmalarıyla ilgili çalışmalar artarak devam etmektedir (58).

2.3.2. H₂S'nin Solunum Yolunda Anti-İnflamatuar Etkinliği

İnsan solunum yolu düz kası hücresi üzerinde yapılan in vitro bir deneyde H₂S salıveren donör (GYY4137) ile sürekli inkübe edilerek inceleme yapılmıştır. Bu hücrelerde doza bağımlı olarak düz kas hücrelerinde gevşeme olduğu ve bu hücrelerde CSE ve K_{ATP} kanalı protein ifadelerinin de arttığı belirtilmiştir (59).

Farelerde ovalbumin (OVA) ile indüklenen CSE ekspresyonunun azaldığı ve pulmoner dokunun H₂S sentezini azalttığı görülmüştür. NaHS uygulaması, solunum yolu inflamasyonunu azaltmış ve artmış olan eozinofil ile nötrofil düzeyini düşürmüştür. NaHS ayrıca OVA ile indüklenen pulmoner iNOS aktivasyonunu zayıflatmış, solunum yolu yeniden modellemesini azaltmıştır (60). Sıçanlarda da ovalbumin ile yapılan solunum yolu inflamasyonu modelinde endojen H₂S düzeyini arttırmak için NaHS uygulanması eozinofil ve nötrofil sayılarını azaltarak anti-

inflatuar etki göstermiştir (54). Ovalbumin ile indüklenen diğer bir çalışmada ise NaHS uygulamasının, mast hücre aktivasyonu ile bronşiyal hiperreaktiviteyi önlediği bildirilmiştir (61).

Ovalbumin ile indüklenen farklı bir fare modelinde, metakolin uygulamasından 30 dakika önce ve 8 saat sonra NaHS uygulaması yapılmıştır. Solunum yolu aşırı duyarlılığı azaldığı; bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısında inflamatuvar hücrelerinin (eozinofil ve nötrofil) ve Th2 sitokin (IL-5, IL-13) seviyelerinin düştüğü görülmüştür (62).

Farelerde 2.5 µm'dan küçük parçacıklı madde (PM2.5) ile yapılan bir KOAH modelinde; H₂S, Nrf2 ve PPAR-γ sinyalini aktive ederek, NCOA4 aracılı ferritinofaji yolunu inhibe ederek, lipid peroksidasyonu aracılı ferroptotik yanıtı baskılayarak PM2.5 aracılı amfizemi ve solunum yolu inflamasyonunu etkili bir şekilde hafiflettiği gösterilmiştir (63). Sıçanda yapılan sigara dumanıyla indüklenen diğer bir KOAH modelinde NaHS uygulamasının; solunum yolu hiperreaktivitesini, IL-8 ve TNF-α konsantrasyonu ve akciğer histopatolojik skorunu azalttığı belirtilmiştir (64).

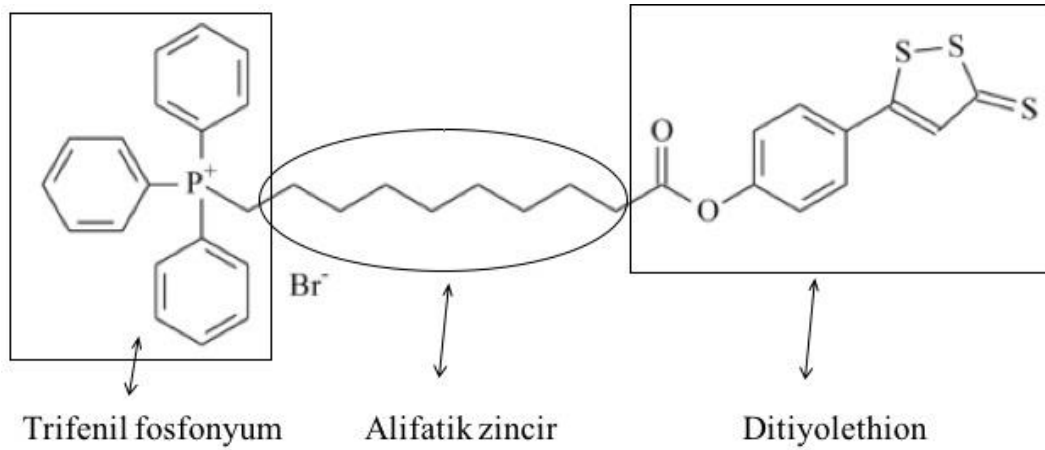
2.3.3. Mitokondriye Hedeflendirilmiş Yavaş H₂S Salveren Donör AP39

AP39, fizyolojik ortamda H₂S'i yavaş salveren ve mitokondriye hedeflendirilmiş ilk donördür. AP39'un, oksidatif koşullar altında antioksidan ve sitoprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu etkisi mitokondrinin bütünlüğünün korumasını sağlaması ve mitokondriyal ölüm sinyallerini azaltmasıyla açıklanmaktadır (65, 66). Mitokondriyal disfonksiyonlar birçok hastalığın patofizyolojik nedeni olduğu düşünüldüğü için mitokondriye hedeflendirilmiş AP39, birçok hastalık adına umut vadeden bir bileşik olarak son yıllarda dikkat çekmektedir (37).

AP39, H₂S salveren bir kısımdan (ditiyolethion), mitokondri hedeflemesini sağlayan trifenil fosfonyumdan (TPP⁺) ve bunları birbirine bağlayan alifatik zincirden oluşur (Şekil 2.1). Lipofilik yapıdaki TPP⁺ katyonu sitoplazmaya, hücrelerarası boşluğa göre 5-10 kat fazla; mitokondri membranına, sitoplazmaya göre 100-500 kat fazla geçerek birikme eğilimindedir. TPP⁺ katyonuna çeşitli bileşikler bağlayarak bileşiklerin

mitokondriye hedeflendirilmesi sağlanır. AP39 bu sayede mitokondriye hedeflenebilmektedir (65, 67).

AP39'un, farelerde miyokardiyal iske mi reperfüzyon hasarını azalttığı ve kalp fonksiyonlarını iyileştirdiği gösterilmiştir (68). İskemik inmelere (37) ve Alzheimer hastalığına karşı koruyucu etkileri olduğu da bulunmuştur (69). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada AP39'un böbrek epitel hücrelerini çeşitli iskemik ve toksik zararlardan koruyarak böbrek fonksiyonlarının sürdürülmesini sağladığı gösterilmiştir (70). İntranazal AP39 tedavisi solunum yolu inflamasyonunu hafifletmiş ve bronşiyal hiperreaktiviteyi önlemiştir (71).



Şekil 2.2. AP39'un kimyasal yapısı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

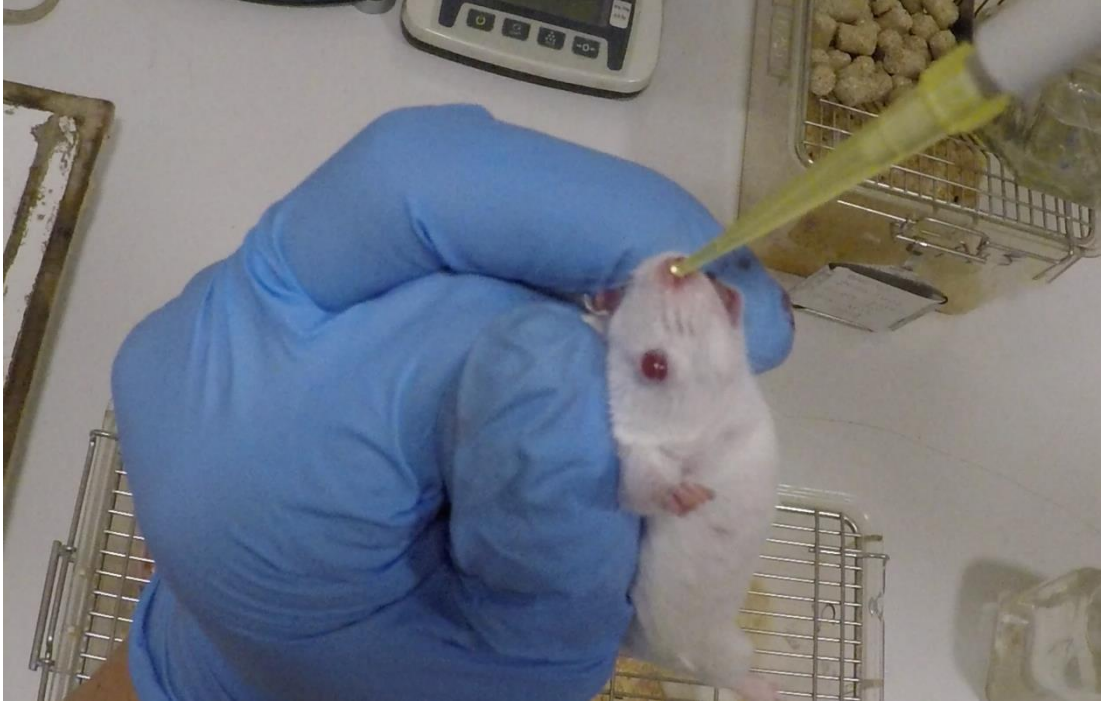
3.1. Hayvanlar ve Barındırılma Şekli

Deneyleerde dişi C57BL/6 fareler (8-12 haftalık), (18-25 g) kullanıldı. Hayvanlar, emici altlık materyali olan kafeslerde 12 saatlik yapay gün ışığı döngüsünde barındırıldı. Yiyecek ve su, ad libitum olarak sağlandı. Deney hayvanları üzerindeki çalışmalar için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Etik Kurul'undan onay alındı (Onay numarası: 2021/06-09).

3.2. Deney Protokolü

3.2.1. Deneysel Solunum Yolu İnflamasyonu

Farelerde *in vivo* solunum yolu inflamasyonu modeli oluşturmak için OVA modeli kullanıldı. Bu modelde duyarlılaştırma evresi için, 100 µg OVA, 200 µl fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) içerisinde çözündürüldü. Karışıma 10 mg Al(OH)₃ eklenerek 2 saat boyunca karıştırıcıda tutularak homojen bir süspansiyon olması sağlandı. 0., 7. ve 14. günlerde bu süspansiyon intraperitoneal (i.p.) yol ile farelere enjekte edildi. Kontrol grubuna ise aynı hacim ve yol ile PBS uygulandı. 20., 21. ve 22. günde ise 100 µg OVA, 25 µl PBS içerisinde çözündürülerek bir mikropipet ile intranasal (i.n.) yoldan uygulandı (Şekil 3.1). Kontrol grubuna ise aynı hacim ve yol ile PBS uygulandı. İ.n. uygulama için farelerin ense derisinden sıkıca tutularak kafası sabitlendi. Doz ayarlanabilen pipet ile solüsyon, tekli damlalar halinde burun deliklerine uygulanarak farenin spontan solunması sağlandı. 23. günde (24 saat sonra) fareler anesteziye edilerek solunum yolu fonksiyonları *in vivo* olarak değerlendirildi, Bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı izole edildi. Ayrıca akciğerleri histolojik değerlendirilmeler için izole edildi.



Şekil 3.1. Farelerde mikropipet kullanılarak intranazal yolla ilaç uygulaması.

3.2.2. Deneysel Solunum Yolu İnflamasyonda İtranazal H₂S Donörü Tedavisi

Farelerde OVA ile indüklenen *in vivo* solunum yolu inflamasyonunda H₂S tedavisinin etkisini değerlendirmek amacıyla 20., 21. ve 22. günde OVA uygulamasından 45 dk önce mitokondriye hedeflendirilmiş H₂S'i yavaş salıveren donör AP39, i.n. yol ile 250 ve 1000 nmol/kg dozunda uygulandı (Şekil 3.1). AP39, %0,2 DMSO (dimetilsülfoksit) içerisinde çözündürülüp PBS ile 25 µl hacime tamamlandı. Çözücünün (DMSO) solunum yolu inflamasyonunu azaltıcı etkisi olup olmadığını değerlendirmek için OVA ile indüklenen farelere AP39 içermeyen çözücü uygulaması aynı prosedür ile uygulandı.

3.3. Solunum Yolu İnflamasyonunun Değerlendirmesi

3.3.1. Solunum Yolu Fonksiyonunun *in vivo* Olarak Değerlendirilmesi

Fareler, son OVA veya PBS uygulamalarından 24 saat sonra solunum yolu fonksiyonlarının *in vivo* olarak değerlendirilmesi amacıyla ketamin (100 mg/kg) / ksilazin (10 mg/kg) ile i.p. yol ile anesteziye edildi. Anesteziyi takiben trakeostomi

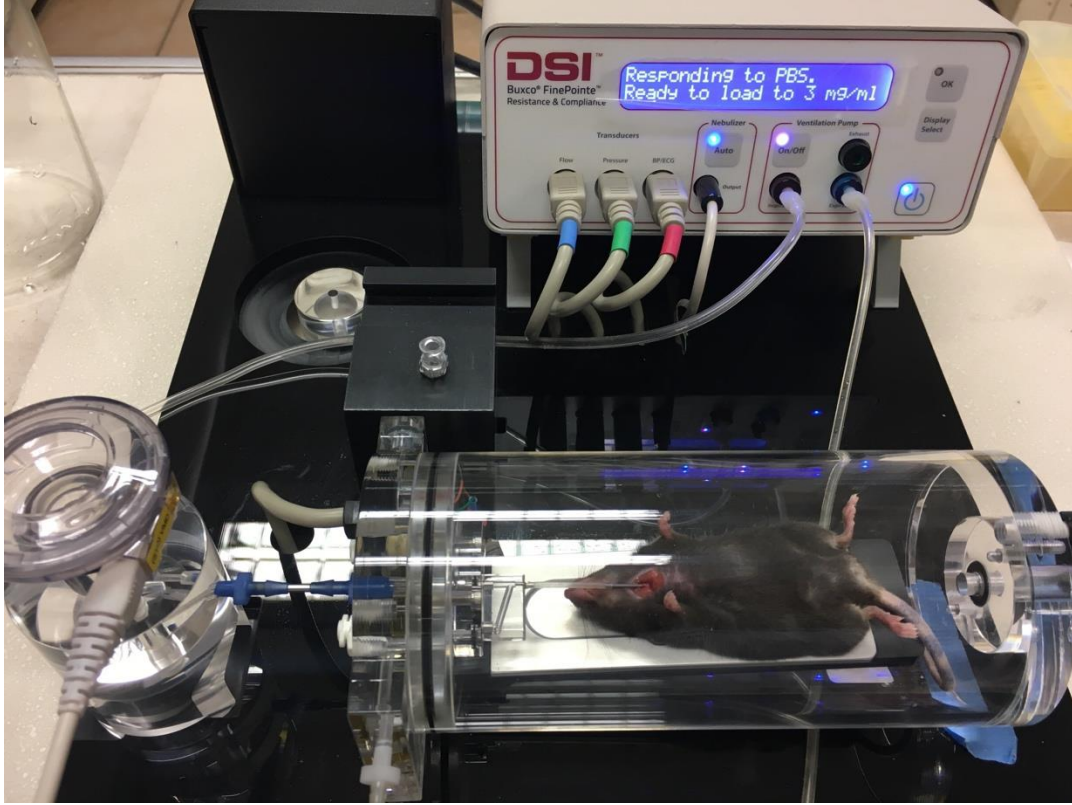
yapılarak farelerin trakeaları kanüle edildi. Hava sızıntısını önlemek ve kanülü sabitlemek amacıyla kanülün etrafı sütür iplik ile bağlandı (Şekil 3.2). Daha sonrasında fare vücut pletismograf haznesine yerleştirilerek trakeasındaki kanül ile ventilatöre bağlandı.



Şekil 3.2. Farelerin trakealarının kanüle edilmesi.

Solunum yolu direncinde (RI) meydana gelen değişiklik yanıtları “Buxco Finepoint Resistance and Compliance System” cihazı ile ölçüldü (Şekil 3.3). Farelerin akciğerleri; solunum hızı: 150/dk, tidal volüm 200 μ l, ekspirasyon sonu pozitif basınç: 2 cm H₂O olacak şekilde 3 dakika boyunca mekanik olarak ventile edilerek, bazal solunum yolu direnci ölçüldü. Ardından ilk olarak intratrakeal olarak PBS uygulandı ve solunum yolu direncinde meydana getirdiği değişiklik ölçüldü. Daha sonra intratrakeal olarak metakolin (3 – 48 mg/mL) uygulanarak farelerin *in vivo* solunum yolu direncinde meydana getirdiği doza bağımlı artış ve akciğer kompliyansındaki (C_{dyn}) doza bağımlı azalma ölçüldü. İntratrakeal uygulama için PBS ve metakolin dozları nebulizer başlığa 20 μ l olacak şekilde eklendi ve dozlar 30 saniye boyunca nebulize edilerek farelerin solunum yollarına gönderildi. PBS ve metakolin dozlarının

oluşturduğu yanıt 3 dakika boyunca ölçüldü. Bir sonraki metakolin dozu verilmeden önce solunum yolu direnci bazal değere geri dönmesi için 1 dakika beklenip sıradaki doz nebulize edildi. Solunum yolu direnci için her dozdan sonra ölçülen maksimum değer yanıt olarak alındı. Kompliyans için ortalama değer yanıt olarak kaydedildi.



Şekil 3.3. Farelerde solunum yolu direncinde meydana gelen değişikliklerin ölçümü.

3.3.2. Bronkoalveoler Lavaj (BAL) Sıvısı Örneklerinde İnflamatuar Hücre Sayımı ve İnflamatuar Sitokin Düzeyi Ölçümü

Solunum yolu fonksiyonunun ölçülmesinden sonra anestezi halindeki fareler, pletismograf haznesinden alındı ve trakealarındaki kanül çıkartılarak yerine intraket takıldı. İntraket ile 0,8 ml PBS, farelerin akciğerlerine yavaşça gönderildi ve geri çekildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Elde edilen BAL sıvısı örnekleri falkon tüplere alındı. Sıvı örneklerin yarısı +4 °C'de 1200 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar lizis tamponu ile 2 dakika inkübe edildi ve sonrasında PBS ile yıkanarak kırmızı kan hücrelerinin uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra cam yüzeye hücrelerin püskürtülmesiyle hazırlanmış olan preparatlar PAP ve Giemsa ile boyanarak kör

olarak sayıldı. Hücreler, morfoloji tiplerine göre nötrofil, eozinofil, makrofaj ve lenfosit olarak tiplendirildi. Toplam hücre sayıları ve bulunma yüzdeleri hesaplandı. BAL sıvısının kalan yarısı +4 °C'de 2000 g'de 20 dakika santrifüjlendi. Bu örneklerin süpernatantlarında ELISA kitleri kullanılarak kitlerde belirtilen talimatlar doğrultusunda IL-4, IL-5 ve IL-13 düzeyleri ölçüldü.

3.3.3. Histopatolojik Değerlendirme

Bu değerlendirmeler H.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji AbD Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sevgen Çelik Önder ile yapıldı. Son OVA uygulamasından 24 saat sonra kan örnekleri alınan farelerin akciğerleri izole edilerek formaldehit (%10) ile fikse edildi. Bu dokulardan kesitler hazırlanarak hemotoksilen-eozin boyası ile boyanarak incelendi. İnflamasyonu skorlamak için parankimal ve peribronşiyal inflamasyon değerlendirildi ve 0-3 arasında kör olarak skorlandı. Parankimal ve peribronşiyal inflamasyon skorunun toplamı inflamasyon skoru olarak ifade edildi.

Tablo 3.1. Akciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesi için yarı kantitatif skorlama sistemi.

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

3.4. Bulguların Sunuluşu ve İstatiksel Analizi

İntratrakeal metakolin ile alınan solunum yolu direnci (RI) yanıtları, PBS nebulizasyonu sonrası ölçülen bazal değerlere göre normalize edilerek sunuldu.

BAL sıvısı örneklerinde hücre sayıları 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.

Deneylerden elde edilen değerleri, tanımlayıcı istatistikler sıralanabilir ve kategorik değişkenler, denek sayısı, ortalama \pm standart hata (SH) ve (%) şeklinde ifade edildi.

Gruplar arasında sıralanabilir değişkenler yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Mann Whitney U *post hoc* Tukey testiyle incelenirken ikiden fazla bağımsız grup arasındaki farkın önemliliği ise ANOVA *post hoc* Tukey, Kruskal Wallis *post hoc* Dunn's testiyle değerlendirildi.

Verilerin analizi için GraphPad Prism Version 9.5.0 (GraphPad Software Inc.) yazılımı kullanıldı. $P < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Solunum Yolu İnflamasyonun Fonksiyonel Olarak Değerlendirilmesi

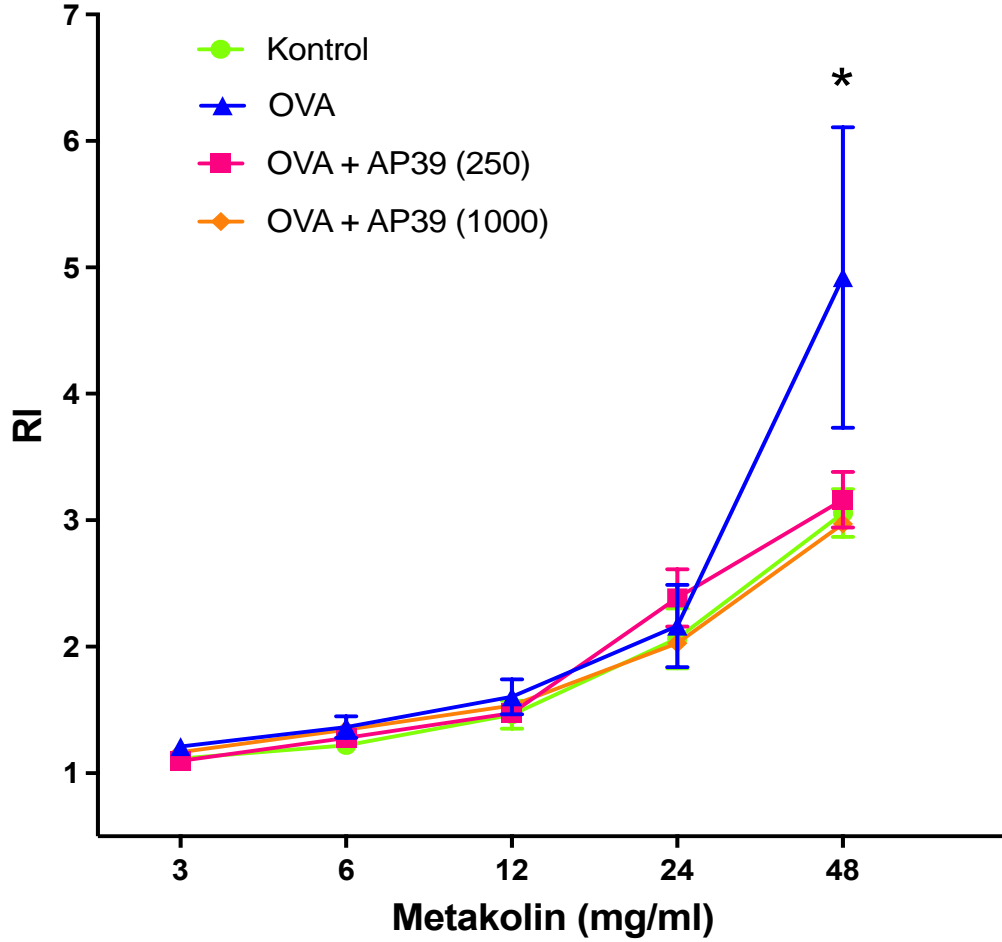
Kontrol, OVA, tedavi ve çözücü gruplarındaki farelerde “Buxco Finepoint Resistance and Compliance System” cihazı ile metakolin aracılı doz bağımlı, solunum yolu direnci (RI) yanıtları alındı. Ölçümlerle, doz-yanıt eğrileri çizildi. Farelerde metakolinin artan dozda uygulaması ile (3-48 mg/ml) solunum yolu direncinde kademeli bir artış elde edildi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Buxco Finepoint Resistance and Compliance System cihazında okunan solunum yolu direncinde (RI) ve kompliyansda (C_{dyn}) metakolin dozuna göre değişen fonksiyonel yanıtın ifadesi (ekranın sol altında; mor sütunlar her bir metakolin dozundaki yanıt bölümünü, pembe çizgi RI yanıtının değişimini ve turuncu çizgi kompliyans yanıtının değişimini ifade etmektedir).

Farelerde, 48 mg/mL dozundaki solunum yolu direnci (RI) yanıtı OVA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı ($P<0,05$). Maksimum değerler OVA için $4,92 \pm 1,18$, kontrol grubu için $3,06 \pm 0,19$ olarak ölçüldü. OVA grubunda artmış olan yanıt AP39 tedavisi uygulanmış olan gruplarda önlendi ($P<0,05$).

Maksimum değerler AP39 tedavisi almış olan OVA gruplarında 250 ve 1000 nmol/kg dozlar için sırasıyla $3,16 \pm 0,22$ ve $2,97 \pm 0,45$ olarak ölçüldü. Sadece çözücü uygulanan OVA grubunun RI yanıtı ($4,46 \pm 0,38$) ile OVA grubunun arasında fark gözlenmedi (Şekil 4.2 ve Tablo 4.1).



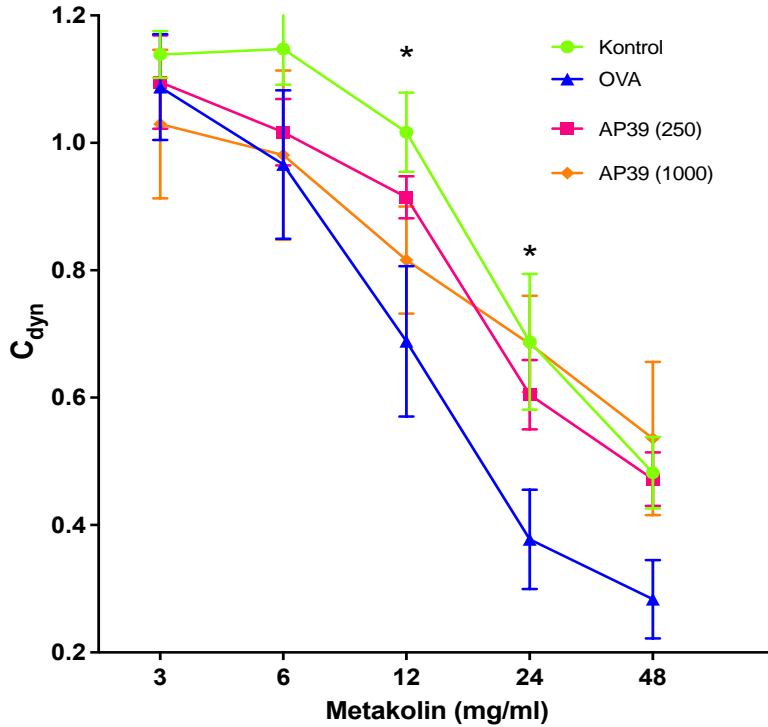
Şekil 4.2. Kontrol (n=5), OVA (n=6) ve AP39 (250-1000 nmol/kg, n=5-6) tedavisi uygulanan gruplardaki farelerden intratrakeal metakolin (3 – 48 mg/mL) ile doza bağımlı olarak elde edilen solunum yolu direnci (RI) yanıtları. PBS nebulizasyonu ile ölçülen değer bazal değer olarak kabul edildi ve diğer değerler bazal değere oranlanarak verildi. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu. *48 mg/mL dozunda ölçülen, OVA grubunun maksimum RI yanıtı kontrol ve OVA + AP39 gruplarından anlamlı olarak farklıdır ($P < 0,001$).

Tablo 4.1. Kontrol, OVA, OVA + AP39 tedavi ve OVA + çözücü gruplarının intratrakeal metakoline (3 – 48 mg/mL) karşı oluşturduğu maksimum solunum yolu direnci yanıtları. PBS nebulizasyonu ile ölçülen değer bazal değer olarak kabul edilerek değerler bazal değere oranlanarak verildi. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu.

Deney Grupları	E_{maks}	n
Kontrol	3,06 \pm 0,19	5
OVA	4,92 \pm 1,18*	6
OVA + AP39 (250 nmol/kg)	3,16 \pm 0,22	6
OVA + AP39 (1000 nmol/kg)	2,97 \pm 0,45	5
OVA + Çözücü (%0,2 DMSO)	4,46 \pm 0,38	4

Emaks: Deneyde ölçülen maksimum RI yanıt değerleri. *OVA grubu yanıtları kontrol ve tedavi grupları yanıtları ile anlamlı olarak farklıdır ($P < 0,001$).

Farelerde, 12 ve 24 mg/mL metakolin dozlarındaki kompliyans (C_{dyn}) yanıtları OVA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($P < 0,05$) (Şekil 4.3).

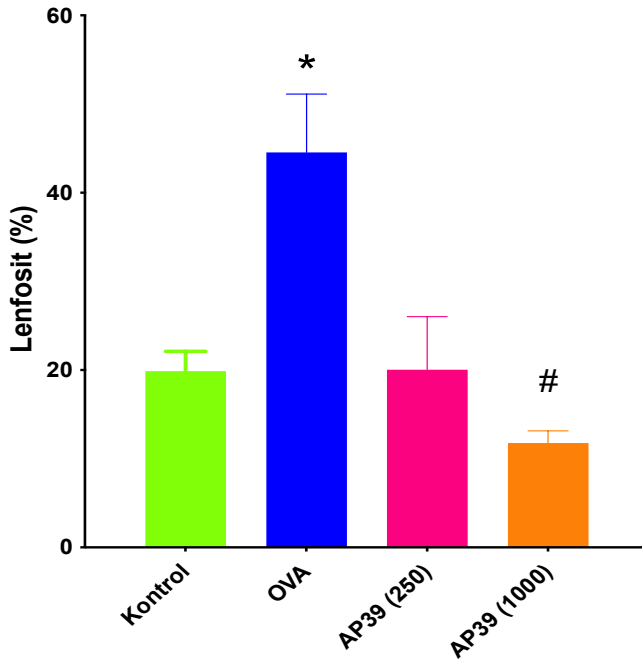


Şekil 4.3. Kontrol (n=5), OVA (n=6) ve AP39 (250-1000 nmol/kg, n=5-6) tedavisi uygulanan gruplardaki farelerden intratrakeal metakolin (3 – 48 mg/mL) ile doza bağımlı olarak elde edilen kompliyans (C_{dyn}) yanıtları. PBS nebulizasyonu ile ölçülen değer bazal değer olarak kabul edildi ve diğer değerler bazal değere oranlanarak verildi. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu. *12 ve 24 mg/mL dozunda ölçülen, OVA grubunun ortalama C_{dyn} yanıtları kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır ($P < 0,05$).

4.2. Bronkoalveoler Lavaj (BAL) Sıvısı Örneklerindeki İnflamatuar Hücrelerin Tayini

Metakolin yanıtı sonrası kontrol, OVA, OVA + AP39 tedavisi ve OVA + çözücü alan gruplardaki farelerden toplanan BAL sıvısı örnekleri içerisindeki inflammatuar hücrelerin sayısı hesaplandı. Her bir inflammatuar hücrenin sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak yüzde olarak ifade edildi.

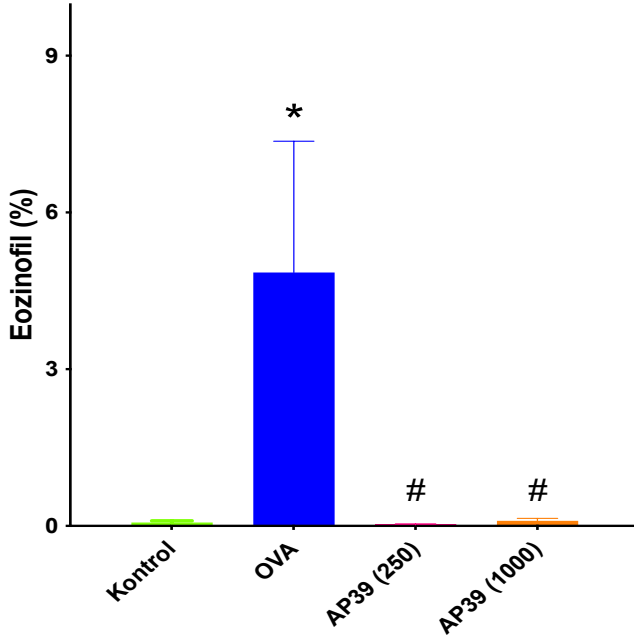
BAL sıvılarındaki lenfosit sayıları OVA grubunda ($44,55 \pm 6,57$) kontrol grubuna ($19,88 \pm 2,20$) göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($P < 0,05$). AP39 ile tedavi edilen gruplarda ise lenfosit sayılarındaki artışın önlendiği tespit edildi. Tedaviler için bu değerler OVA + AP39 (250 nmol/kg) grubu ve OVA + AP39 (1000 nmol/kg) grubu için sırasıyla ($20,04 \pm 5,99$) ve ($11,78 \pm 1,36$; $P < 0,01$) olarak hesaplanmıştır. Çözücünün ise lenfosit sayılarına ($48,75 \pm 14,38$) etkisi olmadığı gösterilmiştir. (Şekil 4.4 ve Tablo 4.2).



Şekil 4.4. Kontrol (n=5) grubu, OVA (n=6) grubu ve OVA + AP39 (250-1000 nmol/kg, n=4-5) tedavisi alan grupların BAL sıvılarındaki lenfosit sayısının toplam hücre sayısındaki yüzdesi. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu. *Kontrol grubundan ($P < 0,05$), #OVA grubundan anlamlı olarak farklıdır ($P < 0,01$).

BAL sıvılarındaki eozinofil sayıları incelendiğinde, OVA grubunda eozinofil hücreleri gözlenirken kontrol ve tedavi gruplarında anlamlı sayıda eozinofile

rastlanmamıştır. OVA grubunda toplam hücre sayısının $4,82 \pm 2,53$ 'lük kısmı eozinofil olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte çözücü uygulanan grupta OVA grubuna benzer oranda eozinofil ($5,75 \pm 2,44$) oluşmuştur (Şekil 4.5 ve Tablo 4.2).



Şekil 4.5. Kontrol (n=5) grubu, OVA (n=6) grubu ve OVA + AP39 (250-1000 nmol/kg, n=4-5) tedavisi alan grupların BAL sıvılarındaki eozinofil hücre sayısının yüzdesi. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu. *Kontrol grubundan, #OVA grubundan anlamlı olarak farklıdır ($P < 0,05$).

Tablo 4.2. Kontrol (n=5), OVA (n=6), OVA + AP39 (n=4-5) ve OVA + çözücü (n=4) gruplarının BAL sıvılarındaki lenfosit ve eozinofil hücre sayısı yüzdeleri. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu.

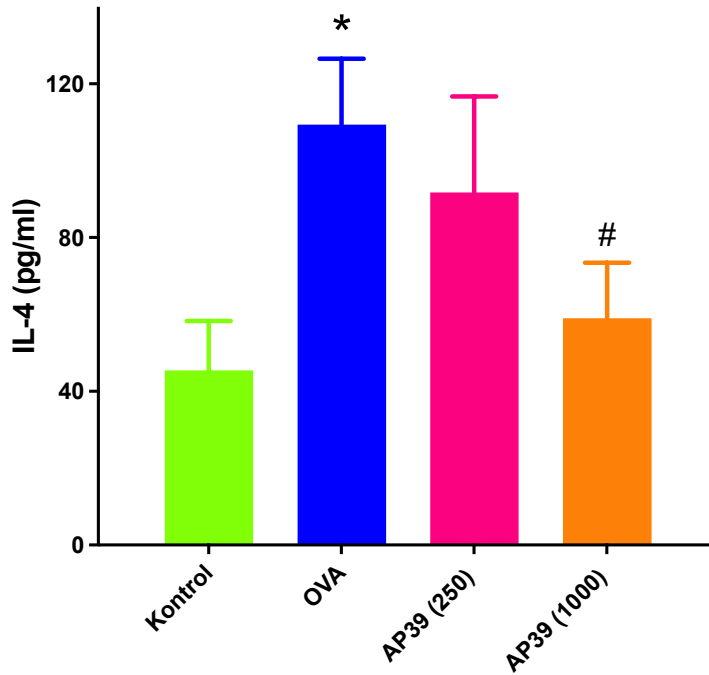
Deney Grupları	Lenfosit (%)	Eozinofil (%)	n
Kontrol	19,88 \pm 2,20	0,06 \pm 0,04	5
OVA	44,55 \pm 6,57*	4,82 \pm 2,53*	6
OVA + AP39 (250 nmol/kg)	20,04 \pm 5,99	0,02 \pm 0,02#	5
OVA + AP39 (1000 nmol/kg)	11,78 \pm 1,36#	0,1 \pm 0,04#	4
OVA + Çözücü (%0,2 DMSO)	48,75 \pm 14,38	5,75 \pm 2,44	4

*Kontrol grubundan, #OVA grubundan anlamlı olarak farklıdır ($P < 0,05$).

4.3. Bronkoalveoler Lavaj (BAL) Sıvısı Örnekleri İçerisindeki Sitokin Düzeylerinin Tayini

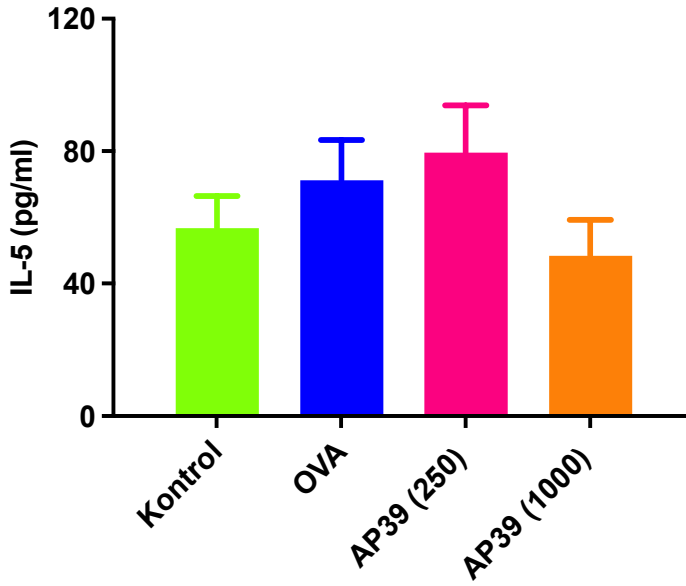
Metakolin maruziyeti sonrası kontrol, OVA ve AP39 tedavi gruplarındaki farelerden toplanan BAL sıvısı örnekleri içerisinde alerjik inflamasyon için önemli olan pro-inflamatuar sitokinlerin ELISA kitleri kullanılarak düzeyleri ölçüldü. Bu amaçla IL-4, IL-5 ve IL-13 düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldı.

OVA grubundan izole edilen BAL örneklerinde IL-4 düzeyi artmıştır. AP39 tedavisi 250 nmol/kg'da IL-4 düzeyini artmasını önlemede etkisizken 1000 nmol/kg etkili bulunmuştur (Şekil 4.6 ve Tablo 4.3).



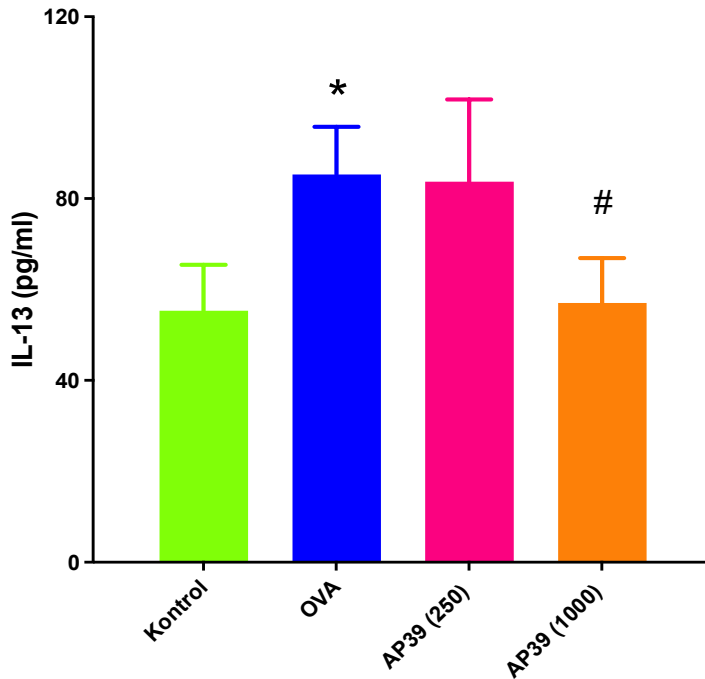
Şekil 4.6. Kontrol (n=5) grubu, OVA (n=5) grubu ve OVA + AP39 (250-1000 nmol/kg, n=5) tedavisi alan grupların BAL sıvılarındaki IL-4 konsantrasyonları. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu. *Kontrol grubundan, #OVA grubundan anlamlı olarak farklıdır ($P<0,05$).

Fare gruplarındaki IL-5 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık görülme de OVA grubunda bir artış, 1000 nmol/kg AP39 tedavisinde ise bu artışın engellenme eğilimi gözükmemektedir (Şekil 4.7 ve Tablo 4.3).



Şekil 4.7. Kontrol (n=5) grubu, OVA (n=5) grubu ve OVA + AP39 (250-1000 nmol/kg, n=5) tedavisi alan grupların BAL sıvılarındaki IL-5 konsantrasyonları. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu.

IL-13 düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında IL-4'e benzer bir sonuç görülmüştür. OVA uygulaması IL-13 düzeyini artırmakta ve bu artış 1000 nmol/kg AP39 tedavisi ile önlenmektedir (Şekil 4.8 ve Tablo 4.3).



Şekil 4.8. Kontrol (n=5) grubu, OVA (n=5) grubu ve OVA + AP39 (250-1000 nmol/kg, n=5) tedavisi alan grupların BAL sıvılarındaki IL-13 konsantrasyonları. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu. *Kontrol grubundan, #OVA grubundan anlamlı olarak farklıdır ($P < 0,05$).

Tablo 4.3. Kontrol (n=5), OVA (n=5) ve OVA + AP39 (n=5) gruplarının BAL sıvılarındaki inflamatuvar sitokin düzeyleri. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu.

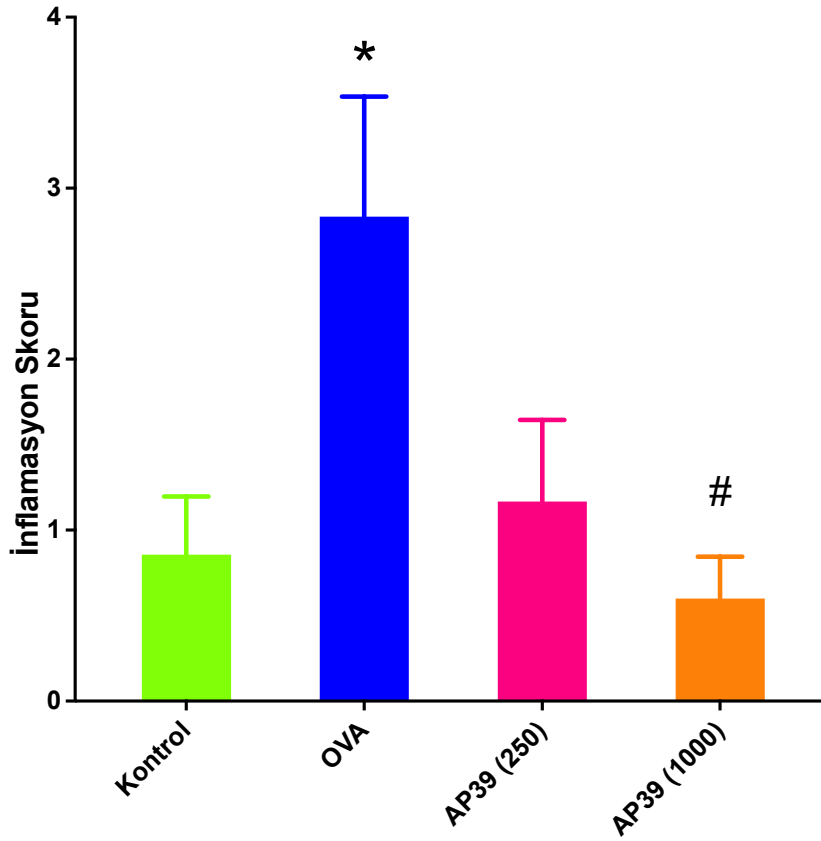
Deney Grupları	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)
Kontrol	45,47 \pm 12,86	56,78 \pm 9,71	55,35 \pm 10,05
OVA	109,93 \pm 17,09*	71,23 \pm 12,07	85,33 \pm 10,49*
OVA + AP39 (250 nmol/kg)	91,76 \pm 24,95	79,51 \pm 14,32	83,74 \pm 18,11
OVA + AP39 (1000 nmol/kg)	59,06 \pm 14,40 [#]	48,44 \pm 10,79	57,03 \pm 9,87 [#]

*Kontrol grubundan, [#]OVA grubundan anlamlı olarak farklıdır ($P < 0,05$).

4.4. Histopatolojik Değerlendirme

Deney sonrası kontrol, OVA, tedavi ve çözücü gruplarındaki farelerden akciğer dokuları izole edilerek bu dokularda histopatolojik değerlendirme yapıldı. Parankimal ve peribronşiyal inflamasyonlar Tablo 3.1.'deki sisteme göre skorlandı. Parankimal ve peribronşiyal inflamasyon skorunun toplamı inflamasyon skoru olarak ifade edildi.

OVA grubu farelerin akciğer dokularındaki inflamasyon skoru, kontrol grubuna göre bir artış gösterdi. OVA + AP39 tedavi gruplarında, OVA grubuna oranla inflamasyon skoru düşme göstermiştir. 1000 nmol/kg AP39 dozu alan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır ($P < 0,05$). OVA grubuna çözücü uygulaması inflamasyon skorunu etkilememiştir (Şekil 4.9, 4.10, 4.11 ve Tablo 4.4).

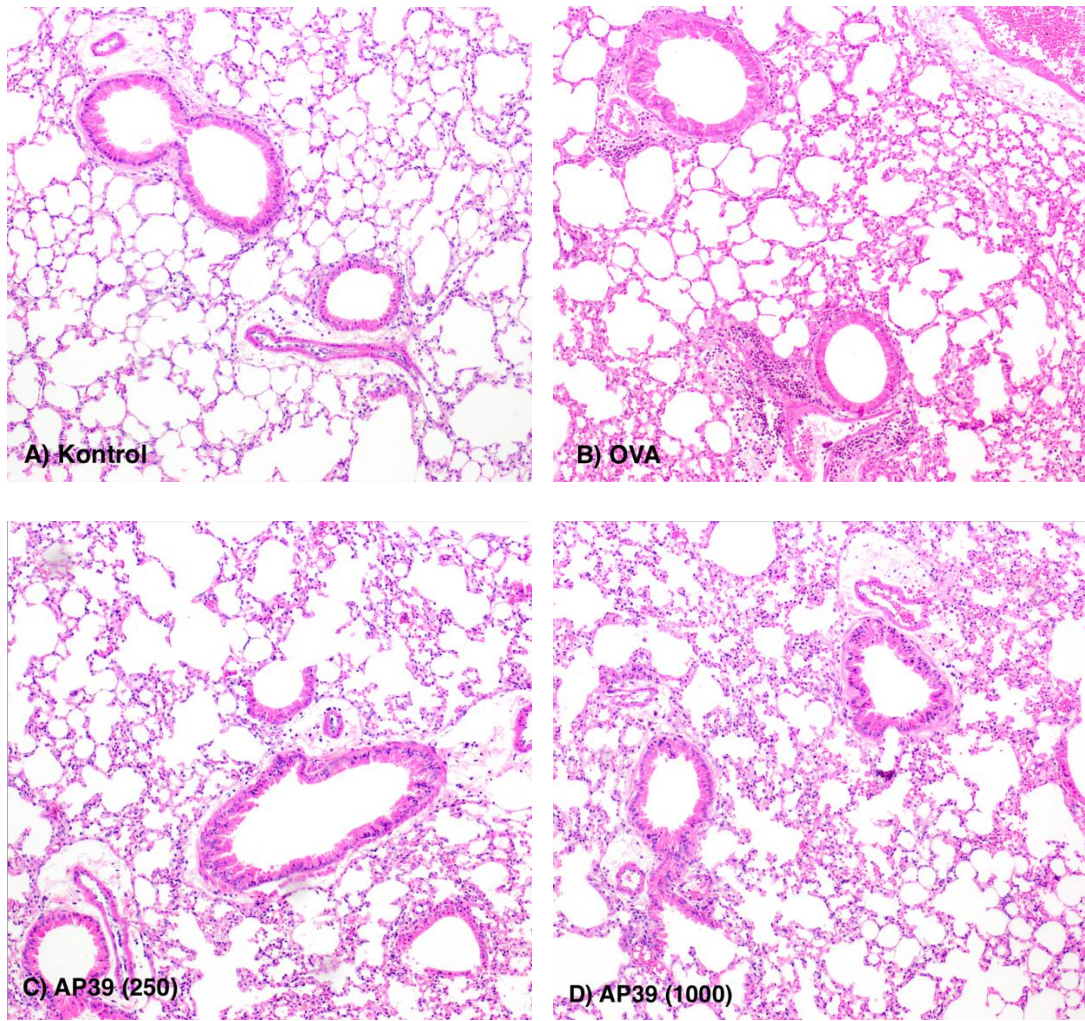


Şekil 4.9. Kontrol (n=6) grubu, OVA (n=6) grubu ve OVA + AP39 (250-1000 nmol/kg, n=5-6) tedavisi alan grupların akciğer dokularındaki inflamasyon skorları. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu. *Kontrol grubundan, #OVA grubundan anlamlı olarak farklıdır ($P<0,05$).

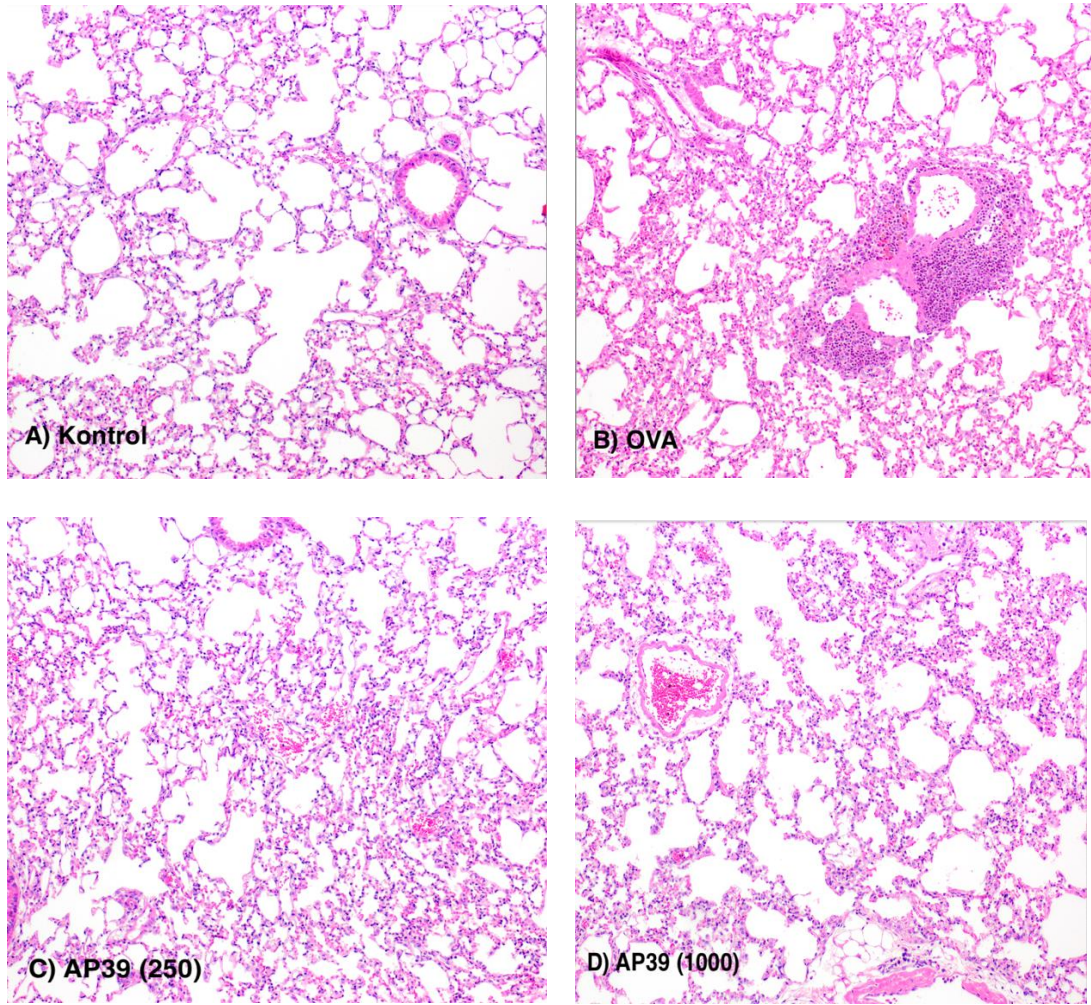
Tablo 4.4. Kontrol, OVA, OVA + AP39 (250-1000 nmol/kg) ve OVA + çözücü gruplarının akciğer dokularındaki inflamasyon skorları. Değerler ortalama \pm SH olarak sunuldu.

Deney Grupları	İnflamasyon Skorları	n
Kontrol	0,85 \pm 0,34	6
OVA	2,83 \pm 0,70*	6
OVA + AP39 (250 nmol/kg)	1,16 \pm 0,48	6
OVA + AP39 (1000 nmol/kg)	0,60 \pm 0,24#	5
OVA + Çözücü (%0,2 DMSO)	2,75 \pm 0,47	4

*Kontrol grubundan, #OVA grubundan anlamlı olarak farklıdır ($P<0,05$).



Şekil 4.10. A) Kontrol, B) OVA, C) OVA + AP39 250 nmol/kg, D) OVA + AP39 1000 nmol/kg gruplarının hematoksilen eozin ile boyanmış akciğer doku kesitlerinde bronşiyal dokuların fotoğrafları.



Şekil 4.11. A) Kontrol, B) OVA, C) OVA + AP39 250 nmol/kg, D) OVA + AP39 1000 nmol/kg gruplarının hematoksilen eozin ile boyanmış akciğer doku kesitlerinin parankim dokuların fotoğrafları.

5. TARTIŞMA

Günümüzde patofiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış birçok hastalık vardır. Bunlardan biri de astımın baskın fenotipi olan alerjik astımdır. Bu hastalıkta şu anda semptomatik tedaviler uygulanmaktadır (72). Toplumun büyük bir popülasyonunu etkileyen bu sağlık sorununu yönetmek adına yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır (73). Yapılan çalışmalar birçok hastalığın patofizyolojisinde mitokondriyal disfonksiyonun önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir (74, 75). Bazı disfonksiyonların endojen hücresel sinyal moleküllerinin sentezindeki değişikliklerden kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (76). Bu amaçla son yıllarda organizmada ciddi etkilerinin olduğu düşünülen endojen gaz mediyatörler ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır (47). Çalışmamızda; astımın patofizyolojisinde solunum yolu düz kası ve inflamatuvar hücrelerde mitokondriyal değişimlerin önemli olabileceği teorisi ile, buradaki muhtemel bir mitokondriyal disfonksiyonun, eksojen H₂S ile düzeltilip düzeltilmeyeceği incelenmiştir. Bu amaçla fizyolojik ortamda endojen H₂S sentezini çok iyi taklit ettiği gösterilen mitokondriye hedeflendirilmiş yavaş H₂S salıveren AP39 maddesi kullanılmıştır (71). Literatürdeki veriler ışığında ve yaptığımız pilot çalışmalar ile ilk olarak laboratuvarımızda alerjik astımın klinik bulgularını en iyi şekilde taklit eden hayvan modeli tespit edilmiştir (77). İnflamasyon bulgularını test etmek için; patolojik boyamalar ve biyokimyasal analizlerle inflamasyon hücreleri ve belirteçleri incelenmiştir. *In vivo* olarak fonksiyonel değişiklikleri değerlendirebilmek için bronşiyal hiperreaktive (BHR) ölçülmüştür (78). Bu amaçla çalışmamızda BHR, dünyada sıklıkla kullanılan “Buxco Finepoint Resistance and Compliance System” cihazı ile ölçülmüştür (79). Daha sonra deneylerde kullanılan farelerin BAL sıvıları ve akciğer dokuları izole edilerek bu örneklerde sırasıyla inflamatuvar hücre sayısı, sitokin düzeyleri ve histopatolojik incelemeler yapılmıştır.

5.1. OVA ile Oluşturulan *in vivo* Solunum Yolu İnflamasyonu

Farelerde deneysel alerjik astım modeli oluşturmak için en sık kullanılan modellerden biri OVA modelidir. Bu model alerjik astımın klinik özelliklerini farelerde en iyi taklit eden modellerden biridir (80, 81). Th2 hücre infiltrasyonunun artması,

eozinofil artışı, IgE düzeyinin yükselmesi, mukus üretiminin artışı ve muskarinik reseptör agonisti ajanlarla maruziyette BHR oluşturma şiddetinin artması bu modelde beklenen patolojik bulgulardır (82, 83). Farelerde kullanılan OVA modellerinde; fare soyu, protokol süresi, OVA uygulama yolu ve uygulama dozu çeşitlilik gösterir. BALB/c fare soyu alerjik astım modelinde en çok kullanılan soydur (84). Ancak laboratuvarımızda yaptığımız pilot çalışmalarda BALB/c soyunda yeterli inflamasyon elde edilememiştir. Bu yüzden alerjik astım modelinin uygulandığı diğer bir soy olan C57BL/6 farelerde deney gerçekleştirilmiştir. Literatürde iki haftadan kısa olan çok az sayıda alerjik inflamasyon modeli bulunmaktadır (85). Bir haftalık bir alerjik astım modeli denenmiş ancak yeterli inflamasyon bulgusu elde edilememiştir (33). İki ile beş hafta arası modeller tip 2 astımı indüklemeye; beş haftadan uzun modeller tip 2 olmayan astımı indüklemeye daha çok kullanılmaktadır (86). Çalışmamızda tip 2 astım oluşturmak için 23 günlük bir protokol uygulanmıştır (77). OVA modellerinde duyarlılaştırma prosüdüğü genellikle tercih edilmektedir ve bunun için intraperitoneal (i.p.) yol ile uygulama yapılır. Sataşma fazı için ise inhalasyon, intranazal (i.n.) ve intratrakeal (i.t.) yol ile uygulama yapılabilir (84). Çalışmamızda i.n. yol tercih edilmiştir.

Alerjik astım modelinin oluştuğunu test etmek amacıyla solunum yolu fonksiyonu, akciğer dokusunun histopatolojisi, BAL sıvısında inflamatuvar hücrelerin miktarları ve pro-inflamatuvar sitokinlerin düzeyleri incelenmiştir (9). Ovalbumin verilen OVA grubu ile PBS verilen kontrol grubu, bu parametreler üzerinden karşılaştırılmıştır.

Literatürde *in vivo* solunum yolu fonksiyonları açısından BALB/c farelerde BHR oluşma oranı C57Bl/6'lara göre daha yüksektir. Birçok çalışmada ise C57BL/6 farelerde fonksiyonel yanıtların yükselmediği de rapor edilmiştir (87, 88). Çalışmamızdaki fonksiyon ölçümlerinde düşük metakolin dozlarında gruplarda verilen yanıtların düşük ve birbirine yakın olması literatür ile uyumludur (87, 89). Ancak 48 mg/mL dozunda maksimum RI yanıtında OVA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu dozdaki artış literatür ile benzer sayısal değerlerdedir (90,

91). Solunum fonksiyonu testinde en son doz, RI yanıtının belirleyici sayısal ölçütüdür. Buna göre OVA grubu farelerde muskarinik agonist bir ajana karşı BHR yanıtının arttığı gözlenmektedir. Akciğer kompliyansı, akciğerin esneme ve genişleme kabiliyetinin bir ölçütüdür. Solunum yolundaki inflamasyonun, akciğerin elastik dokusunu tahrip etmesiyle akciğeri yeniden biçimlendirmesi için zaman gereklidir (92). Kısa bir deney protokolü uygulamamıza rağmen farelerde gruplar arasında akciğer kompliyansında değişiklik olmuştur. OVA grubunda kompliyans yanıtları, kontrole göre azalmıştır. OVA grubu farelerin akciğerlerinin yeniden biçimlenmeye uğramaya başladığı söylenebilir.

CD4⁺ T hücrelerin alt grubu olan Th2 hücreleri, alerjik astımın gelişmesindeki en önemli lenfosit popülasyonunu oluşturmaktadır. T lenfosit miktarının artışı astım geliştiğinin bir bulgusu olarak kabul edilebilir. İlgili pro-inflamatuar sitokinler (IL-4, IL-5 ve IL-13) tarafından uyarılan Th2 hücrelerindeki aktivasyon, eozinofil ve IgE miktarının artmasına yol açar (93). Toplam inflamatuvar hücre artışıyla birlikte lenfosit hücrelerinin de ağırlıklı olarak artması beklenmiştir (94, 95). BAL sıvındaki lenfosit miktarları incelendiğinde OVA grubunda baskın immün hücre tipinin lenfosit döndüğü görülmüştür. Kontrol grubundaki farelerde ise lenfosit yüzdesinde belirgin bir artış görülmemiştir. Alerjik astımın temel belirtisi olan eozinofili bakıldığında ise; kontrol grubunda eozinofil hücrelerine neredeyse hiç rastlanılmaz iken OVA grubunda eozinofil hücrelerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu bulgu kullandığımız deneysel model için beklenmekte olup, literatür ile de uyumludur (96, 97).

Alerjenin immünolojik tanınmasına yanıt olarak CD4⁺ T lenfositleri tarafından pro-inflamatuar sitokinler sentezlenir. Bu sitokinlerin inflamasyon hücrelerinin membranlarında kendilerine özgü reseptörleri vardır. Bu reseptörler üzerinden inflamasyonu başlatma sinyallerini iletirler. IL-4, Th2 hücre farklılaşmasıyla çoğalmasını teşvik eder ve IgE üretiminin temel sorumlusudur. IL-5, B hücrelerinin ve eozinofillerin farklılaşması, büyümesi ve aktifleşmesinde rol oynar. IL-13 ise B hücreleri tarafından IgE sentezini başlatır. Ayrıca IL-4 ve 13 goblet hücre farklılaşmasını da sağlar (98-101). Çalışmamızda pro-inflamatuar sitokinler

incelendiğinde, OVA grubunda IL-4 ve 13 sitokin düzeylerinde kontrole göre bir artış gözlenmektedir. IL-5 sitokin düzeylerinde ise artma eğilimi olduğu söylenebilir. IL-4 ve 13 yakın artış profilleri göstermişken, IL-5 bunlardan farklı bir profil izlemiştir. Bu durum literatürde de sıklıkla göze çarpmaktadır. Deney prosedürü ve elde edildiği yere bağlı olarak sitokin düzeyleri farklı düzeylerde artış gösterebilmektedir (89, 90, 95, 102).

Farelerden izole edilen akciğer doku örneklerinde histopatolojik skorlama yapılmıştır. Peribronşiyal ve parankimal hücre infiltrasyonları değerlendirilerek skorlanmış ve bu skorların toplamı inflamasyon skoru olarak sunulmuştur. OVA grubunda inflamasyon skoru kontrole göre daha yüksek bulunmuştur (90, 95, 97).

Tüm bu bulgular OVA'nın, farelerde alerjik solunum yolu inflamasyonu oluşturduğuna ve deneysel modelin çalıştığına işaret etmektedir.

5.2. OVA ile Oluşturulan Solunum Yolu İnflamasyonunda AP39 Tedavisinin Etkileri

Alerjik astım hastalığının patofizyolojik nedenleri arasında düşünülen solunum yolu hücrelerindeki mitokondriyal disfonksiyonu düzeltmek ve hastalık seyrini geri çevirmek yeni tedavi hedeflerindedir. Son yıllardaki çalışmalarda oksidatif koşullar altında antioksidan ve sitoprotektif etkileri gösterilen AP39'un, mitokondriyal disfonksiyonu düzeltmesiyle solunum yolu düz kaslarında gevşeme yapması ve solunum sistemindeki inflamasyonu azaltması beklenmektedir (103, 104). Bu amaçla OVA ile alerjik astım modeli oluşturulmuş farelerde, literatürde de tedavi amacıyla sık kullanılan iki dozda AP39 tedavisi verilmiştir. Düşük doz olarak 250 nmol/kg ve yüksek doz olarak 1000 nmol/kg seçilmiştir (69, 105). OVA ile duyarlı hale gelmiş farelerde astım yanıtını başlatan adım, sataşma fazı olarak tarif edilen, protokolün son üç gününde aldıkları yüksek doz i.n. OVA maruziyetidir. Bu yüzden AP39 tedavisi sataşma dozlarından 45 dakika önce uygulanmıştır.

AP39 tedavisinin solunum yolu inflamasyonun belirtilerini geriye döndürdüğünü göstermek amacıyla fare gruplarında solunum yolu fonksiyonu,

akciğer dokusunun histopatolojisi, BAL sıvısında inflamatuvar hücrelerin ve pro-inflamatuvar sitokinlerin miktarları ve düzeyleri incelenmiştir (9).

Alerjene karşı solunum düz kaslarının kasılma miktarlarını ölçmek için solunum fonksiyon testi yapılmıştır. Metakolinin 48 mg/mL dozunda, OVA grubunda meydana getirdiği maksimum RI yanıtındaki artış AP39 tedavisi uygulanan gruplarda görülmemiştir. AP39 verilen her iki grubun yanıtları kontrol grubunun yanıtıyla benzer bulunmuştur. Ayrıca AP39 tedavisi uygulanan gruplarda akciğer kompliyansında azalma görülmemiştir. Buna göre düşük veya yüksek doz AP39 tedavisi alan farelerde muskarinik agonist olan metakoline karşı aşırı duyarlılık oluşmamıştır. BHR tepkisi astım olmayan farelere benzer şiddette kalmıştır. Bu bulgular AP39'un BHR'e karşı koruyucu etkinliği olduğunu düşündürmektedir. Laboratuvarımızda yapılan farklı bir çalışmada LPS ile indüklenen BALB/c farelerde BHR ölçümü yapılmıştır. AP39 tedavisi alan grupta BHR oluşumu çalışmamızdakine benzer şekilde engellenmiştir. Yanıt eğrileri benzer olsa da sayısal değerler farklıdır. Bu durum, alerjenin ve fare soyunun farklılığından kaynaklı olabilir (71).

BAL sıvısı örneklerindeki inflamasyon hücreleri üzerine AP39 tedavisinin etkileri incelendiğinde OVA grubunda artmış olan lenfosit sayıları AP39 tedavisi ile normale döndüğü görülmektedir. Düşük doz AP39 alan grubun lenfosit yüzdesi miktarı kontrole benzerdir. Bununla birlikte yüksek doz AP39 alan gruptaki lenfosit oranı kontrolden de daha düşük olduğu görülmüştür. Yüksek doz AP39 tedavisi OVA'ya duyarlı farelerde eozinofil artışını da engellemiştir. OVA ile indüklenmiş bir fare alerji modelinde NaHS ile tedavi eozinofil oluşumunu belli oranda önlese de toplam inflamasyon hücrelerini azaltamamıştır (106). Geçen sene yayınlanan bir çalışmada, farelerde oluşturulan bir alerjik astım modelinde prednizolon-H₂S donörü melez bileşiği, inflamasyon hücrelerinin oluşumunu anlamlı bir şekilde engellemiş ve bu etkinin tek başına uygulanan prednizolondan daha güçlü olduğu ifade edilmiştir (107).

Pro-inflamatuvar sitokinler incelendiğinde ise; düşük doz AP39 tedavisinin OVA grubunda artmış olan IL-4, IL-5 ve IL-13 değerleri üzerine bir etkisinin olmadığı

görülmektedir. Fakat yüksek doz AP39 tedavisinin bu sitokinlerin oluşmasını engellemede etkili olduğu görülmektedir. Farelerde yapılmış olan bir çalışmada alerjik astım modelinde H₂S donörü NaHS'ün pro-inflamatuar sitokinlerin düzeylerinde kısıtlı bir azaltma oluşturduğu görülmektedir (108). Farelerden izole edilen akciğer doku örneklerinde değerlendirilen inflamasyon skorları incelendiğinde ise; AP39 tedavisinin her iki dozda da inflamasyonu azalttığı gözlenmiştir. NaHS kullanılan ve IL-13 düzeylerinde gruplar arası anlamlılık görülmemiş bir diğer çalışmada ise tedavi grubunun inflamasyon skorlarının düşük olduğu ifade edilmiştir. Bu skorlar çalışmamız ile paralel sayısal değerlerdedir (109).

AP39, PBS içerisinde çözünmediği için DMSO içerisinde çözündürülüp PBS ile hacmi tamamlanmıştır. Çok düşük miktarda (%0,2) eklenen çözücünün deney parametrelerine etkisinin olup olmadığını göstermek için OVA ile indüklenen farelere AP39 içermeyen çözücü uygulaması yapılmıştır. Bu gruptan elde edilen sonuçlar, sadece OVA uygulanan farelerle paralellik göstermiştir. Hiçbir inflamasyon bulgusunda bu gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Böylelikle AP39 çözücüsünün deneyde kullandığımız miktarlarda anti-inflamatuar etki üzerine bir katkısı olmadığı düşünülmektedir.

Bulgularımız, düşük doz AP39 tedavisinin farelerde inflamasyon yanıtına bağlı BHR'yi engellediğini, inflamasyon hücre yoğunlaşmasını azalttığını ancak diğer parametreleri değiştirmedini göstermiştir. Bununla birlikte yüksek doz AP39 tedavisinin hem fonksiyonel BHR yanıtları hem de incelenen diğer parametreler açısından etkili olabileceği düşünülmektedir. Yüksek doz AP39 tedavisinin inflamasyonu engelleyici etkisinin yanında mitokondri fonksiyonları üzerindeki etkilerinin de incelenmesi bu bulguların mekanizmalarının ortaya konabilmesi için çok önemlidir. Bu amaçla tez çalışmasının devamında akciğerlerdeki mitokondri kompleks fonksiyonlarının değerlendirilmesi planlanmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada alerjik astımın klinik bulgularının farelerde giderilmesi amacıyla yeni bir tedavi yaklaşımı denenmiştir. H₂S'in etkileri, solunum sistemi dahil her fizyolojik sistemde incelenmektedir. Ancak solunum yolu inflamasyonu üzerine ilaç olarak kullanılabilecek özellikle mitokondriye hedeflendirilmiş bileşiklerle ilgili çalışmalar eksiktir. Çalışmamızda H₂S'in endojen üretimini taklit eden mitokondriye hedeflendirilmiş yavaş H₂S donörü AP39 bileşiğinin ovalbumin ile duyarlı hale getirilmiş farelerde etkisini inceledik.

OVA kullanarak oluşturduğumuz deneysel modelde C57Bl/6 farelerde anlamlı düzeyde alerjik astım bulgularını elde ettik. OVA ile duyarlı hale gelmiş ve 1000 nmol/kg AP39 tedavisi alan farelerde, OVA grubuna göre BHR ve inflamasyon belirteçlerinde belirgin bir azalma gözlemlendi. Bu bulgulara göre sataşma OVA uygulamasından önce, solunum yoluna lokal olarak 1000 nmol/kg dozda AP39 tedavisinin, farelerde astımda gözlenen alerjik inflamasyon parametrelerini azalttığını söyleyebiliriz. AP39'un farelerin solunum yolu düz kas hücrelerindeki mitokondrilere karşı koruyucu etkisi olabileceği düşünülebilir. AP39'un 250 nmol/kg dozunda da benzer bir antiinflamatuvar etki görülmüştür. Ancak 1000 nmol/kg dozundaki kadar belirgin ve tutarlı değildir.

Medikal teknolojilerdeki gelişimlerle bileşiklere organel düzeyinde hedeflendirme yapılabilmektedir. Bu sayede birçok inflamasyon kaynaklı hastalık için geleneksel yöntemlere ek olarak harici hücresel yöntemlerle de tedaviler çalışılmaktadır. Günümüzdeki teknolojiyle patofizyolojisi hala tam olarak aydınlatılmadığı için astım hastalığının oluşması engellenememektedir. Bu açıdan, solunum yolu hücrelerindeki mitokondri fonksiyonlarının korunması, alerjik solunum yolu inflamasyonu için umut verici bir tedavi stratejisi olabilir.

Bu amaçla deneysel araştırmasını yaptığımız bileşiğin etkisi özellikle alerjen sataşması sırasında etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca farelerin astım semptomlarını göstermemiş olması, semptomatik tedavilere gerek duyulmadan astımda bu grup

bileşiklerin tek başına ilaç olarak kullanılabilceğini düşündürmüştür. Ancak bireyin alerjik duyarlılığını geri döndürücü bir etkisi olduğuna dair bir bulgu elde edilmemiştir. Bu nedenle H₂S salıveren bileşiklerin de düzenli olarak kullanılması gerekip gerekmeceği hakkında fikir yürütülemez.

Hala H₂S gibi gaz mediyatörlerin organizmadaki etki mekanizması net aydınlatılamaması, toksisite potansiyeli, H₂S'in endojen sentezine yapılacak müdahalelerin zorluğu ve yıkımının çok kolay olması nedeniyle H₂S metabolizmasını etkileyen ilaçların geliştirilmesini kısıtlamaktadır. Bununla beraber solunum sistemine lokal ilaç uygulamanın hızlı ve kolay olması, H₂S'in gaz halinde bir bileşik olması ve etkisini hemen gösterip yıkılabilmesi solunum yolu hastalıklarında H₂S salıveren bileşikler için bir kullanım alanı oluşturabilir. Bu amaçla yavaş H₂S salıveren bileşiklerin doza bağlı etki ve güvenlik profillerinin daha ayrıntılı incelenmesi gerekmektedir. Çalışmamızın bu alana dair ileri araştırmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Mims JW. Asthma: definitions and pathophysiology. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2015;5 Suppl 1:S2-6.
2. Aun MV, Bonamichi-Santos R, Arantes-Costa FM, Kalil J, Giavina-Bianchi P. Animal models of asthma: utility and limitations. *J Asthma Allergy.* 2017;10:293-301.
3. Castillo JR, Peters SP, Busse WW. Asthma Exacerbations: Pathogenesis, Prevention, and Treatment. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(4):918-27.
4. Cockcroft DW, Swystun VA. Asthma control versus asthma severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 1996;98(6):1016-8.
5. Prakash YS, Pabelick CM, Sieck GC. Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest.* 2017;152(3):618-26.
6. Cho HY, Kleeberger SR. Mitochondrial biology in airway pathogenesis and the role of NRF2. *Arch Pharm Res.* 2020;43(3):297-320.
7. Ding H, Chang J, He F, Gai S, Yang P. Hydrogen Sulfide: An Emerging Precision Strategy for Gas Therapy. *Adv Healthc Mater.* 2022;11(4):e2101984.
8. Bazhanov N, Ansar M, Ivanciuc T, Garofalo RP, Casola A. Hydrogen Sulfide: A Novel Player in Airway Development, Pathophysiology of Respiratory Diseases, and Antiviral Defenses. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;57(4):403-10.
9. Debeuf N, Haspeslagh E, van Helden M, Hammad H, Lambrecht BN. Mouse Models of Asthma. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2016;6(2):169-84.
10. Barnes PJ. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(7):454-66.
11. Statistics NCHS. Asthma 2021 [Available from: <https://www.cdc.gov/nchs/fastats/asthma.htm>].
12. Wenzel SE. Severe Adult Asthmas: Integrating Clinical Features, Biology, and Therapeutics to Improve Outcomes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021;203(7):809-21.
13. McGregor MC, Krings JG, Nair P, Castro M. Role of Biologics in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;199(4):433-45.
14. Nair P, Surette MG, Virchow JC. Neutrophilic asthma: misconception or misnomer? *Lancet Respir Med.* 2021;9(5):441-3.
15. Heaney LG, Perez de Llano L, Al-Ahmad M, Backer V, Busby J, Canonica GW, et al. Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma: An Expert Consensus Framework to Characterize Phenotypes in a Global Real-Life Severe Asthma Cohort. *Chest.* 2021;160(3):814-30.
16. Suehs CM, Menzies-Gow A, Price D, Bleecker ER, Canonica GW, Gurnell M, et al. Expert Consensus on the Tapering of Oral Corticosteroids for the Treatment of Asthma. A Delphi Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021;203(7):871-81.

17. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. 2014;43(2):343-73.
18. Pattemore PK, Asher MI, Harrison AC, Mitchell EA, Rea HH, Stewart AW. The interrelationship among bronchial hyperresponsiveness, the diagnosis of asthma, and asthma symptoms. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(3):549-54.
19. Sterk PJ. Virus-induced airway hyperresponsiveness in man. *Eur Respir J*. 1993;6(6):894-902.
20. Hopp RJ, Townley RG, Biven RE, Bewtra AK, Nair NM. The presence of airway reactivity before the development of asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(1):2-8.
21. Carey VJ, Weiss ST, Tager IB, Leeder SR, Speizer FE. Airways responsiveness, wheeze onset, and recurrent asthma episodes in young adolescents. The East Boston Childhood Respiratory Disease Cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(1):356-61.
22. Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ, Holdaway MD. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med*. 1991;325(15):1067-71.
23. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(3):1001-8.
24. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(1):101-8.
25. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(4):315-23.
26. Shaw DE, Sousa AR, Fowler SJ, Fleming LJ, Roberts G, Corfield J, et al. Clinical and inflammatory characteristics of the European U-BIOPRED adult severe asthma cohort. *Eur Respir J*. 2015;46(5):1308-21.
27. Loza MJ, Djukanovic R, Chung KF, Horowitz D, Ma K, Branigan P, et al. Validated and longitudinally stable asthma phenotypes based on cluster analysis of the ADEPT study. *Respir Res*. 2016;17(1):165.
28. Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;56(2):219-33.
29. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med*. 2010;363(13):1211-21.
30. Al-Sajee D, Sehmi R, Hawke TJ, El-Gammal A, Howie KJ, Watson RM, et al. Expression of IL-33 and TSLP and Their Receptors in Asthmatic Airways after Inhaled Allergen Challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(6):805-7.

31. Sano K, Haneda K, Tamura G, Shirato K. Ovalbumin (OVA) and Mycobacterium tuberculosis Bacilli Cooperatively Polarize Anti-OVA T-helper (Th) Cells toward a Th1-Dominant Phenotype and Ameliorate Murine Tracheal Eosinophilia. *Am J Resp Cell Mol.* 1999;20(6):1260-7.
32. Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev.* 2002;102(12):4751-804.
33. Daubeuf F, Frossard N. Eosinophils and the ovalbumin mouse model of asthma. *Methods Mol Biol.* 2014;1178:283-93.
34. 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.
35. Delmotte P, Sieck GC. Interaction between endoplasmic/sarcoplasmic reticulum stress (ER/SR stress), mitochondrial signaling and Ca(2+) regulation in airway smooth muscle (ASM). *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;93(2):97-110.
36. Aranda-Rivera AK, Cruz-Gregorio A, Aparicio-Trejo OE, Pedraza-Chaverri J. Mitochondrial Redox Signaling and Oxidative Stress in Kidney Diseases. *Biomolecules.* 2021;11(8).
37. Pomierny B, Krzyzanowska W, Jurczyk J, Skorkowska A, Strach B, Szafarz M, et al. The Slow-Releasing and Mitochondria-Targeted Hydrogen Sulfide (H₂S) Delivery Molecule AP39 Induces Brain Tolerance to Ischemia. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15).
38. Jaffer OA, Carter AB, Sanders PN, Dibbern ME, Winters CJ, Murthy S, et al. Mitochondrial-targeted antioxidant therapy decreases transforming growth factor- β -mediated collagen production in a murine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;52(1):106-15.
39. Mabalirajan U, Dinda AK, Kumar S, Roshan R, Gupta P, Sharma SK, et al. Mitochondrial structural changes and dysfunction are associated with experimental allergic asthma. *J Immunol.* 2008;181(5):3540-8.
40. Aguilera-Aguirre L, Bacsı A, Saavedra-Molina A, Kurosky A, Sur S, Boldogh I. Mitochondrial dysfunction increases allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2009;183(8):5379-87.
41. 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.
42. Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1992;32:109-34.
43. Szabo C. A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: From environmental toxin to biological mediator. *Biochem Pharmacol.* 2018;149:5-19.
44. Malone Rubright SL, Pearce LL, Peterson J. Environmental toxicology of hydrogen sulfide. *Nitric Oxide.* 2017;71:1-13.

45. Papapetropoulos A, Whiteman M, Cirino G. Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. *Br J Pharmacol*. 2015;172(6):1633-7.
46. Olson KR, Straub KD. The Role of Hydrogen Sulfide in Evolution and the Evolution of Hydrogen Sulfide in Metabolism and Signaling. *Physiology (Bethesda)*. 2016;31(1):60-72.
47. Kolluru GK, Shen X, Bir SC, Kevil CG. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide*. 2013;35:5-20.
48. Dilek N, Papapetropoulos A, Toliver-Kinsky T, Szabo C. Hydrogen sulfide: An endogenous regulator of the immune system. *Pharmacol Res*. 2020;161:105119.
49. Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem Pharmacol*. 2018;149:110-23.
50. Magli E, Perissutti E, Santagada V, Caliendo G, Corvino A, Esposito G, et al. H₂S Donors and Their Use in Medicinal Chemistry. *Biomolecules*. 2021;11(12).
51. Chen Y, Wang R. The message in the air: hydrogen sulfide metabolism in chronic respiratory diseases. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012;184(2):130-8.
52. 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.
53. Wang P, Zhang G, Wondimu T, Ross B, Wang R. Hydrogen sulfide and asthma. *Exp Physiol*. 2011;96(9):847-52.
54. 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.
55. Fuschillo S, Palomba L, Capparelli R, Motta A, Maniscalco M. Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide: A Nice Pair in the Respiratory System. *Curr Med Chem*. 2020;27(42):7136-48.
56. Karaman Y, Kaya-Yasar Y, Bozkurt TE, Sahin-Erdemli I. Hydrogen sulfide donors prevent lipopolysaccharide-induced airway hyperreactivity in an in vitro model of chronic inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2021;128(5):652-60.
57. Han W, Dong Z, Dimitropoulou C, Su Y. Hydrogen sulfide ameliorates tobacco smoke-induced oxidative stress and emphysema in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(8):2121-34.
58. Khattak S, Zhang QQ, Sarfraz M, Muhammad P, Ngowi EE, Khan NH, et al. The Role of Hydrogen Sulfide in Respiratory Diseases. *Biomolecules*. 2021;11(5).
59. Fitzgerald R, DeSantiago B, Lee DY, Yang G, Kim JY, Foster DB, et al. H₂S relaxes isolated human airway smooth muscle cells via the sarcolemmal K(ATP) channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(1):393-8.

60. Whiteman M, Winyard PG. Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2011;4(1):13-32.
61. Roviezzo F, Bertolino A, Sorrentino R, Terlizzi M, Matteis M, Calderone V, et al. Hydrogen sulfide inhalation ameliorates allergen induced airway hyperreactivity by modulating mast cell activation. (1096-1186 (Electronic)).
62. Zhang G, Wang P, Fau - Yang G, Yang G, Fau - Cao Q, Cao Q, Fau - Wang R, Wang R. The inhibitory role of hydrogen sulfide in airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of asthma. (1525-2191 (Electronic)).
63. Wang Y, Liao S, Pan Z, Jiang S, Fan J, Yu S, et al. Hydrogen sulfide alleviates particulate matter-induced emphysema and airway inflammation by suppressing ferroptosis. *Free Radic Biol Med*. 2022;186:1-16.
64. 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.
65. 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.
66. Szczesny B, M6dis 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.
67. Smith RA, Hartley RC, Murphy MP. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(12):3021-38.
68. Zhu C, Su Y, Juriasingani S, Zheng H, Veramkovich V, Jiang J, et al. Supplementing preservation solution with mitochondria-targeted H₂S donor AP39 protects cardiac grafts from prolonged cold ischemia-reperfusion injury in heart transplantation. *Am J Transplant*. 2019;19(11):3139-48.
69. 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.
70. 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.

71. Karaman Y, Kaya-Yasar Y, Eylem CC, Onder SC, Nemetlu E, Bozkurt TE, et al. The effect of mitochondria-targeted slow hydrogen sulfide releasing donor AP39-treatment on airway inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2023;946:175619.
72. Akar-Ghibril N, Casale T, Custovic A, Phipatanakul W. Allergic Endotypes and Phenotypes of Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020;8(2):429-40.
73. Rehman A, Amin F, Sadeeqa S. Prevalence of asthma and its management: A review. *J Pak Med Assoc.* 2018;68(12):1823-7.
74. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 2011;435(2):297-312.
75. Sorrentino V, Menzies KJ, Auwerx J. Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2018;58:353-89.
76. Quinzii CM, Lopez LC. Abnormalities of hydrogen sulfide and glutathione pathways in mitochondrial dysfunction. *J Adv Res.* 2021;27:79-84.
77. Swedin L, Ellis R, Kemi C, Ryrfeldt A, Inman M, Dahlén SE, et al. Comparison of aerosol and intranasal challenge in a mouse model of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;153(3):249-58.
78. Bates JHT. CORP: Measurement of lung function in small animals. *J Appl Physiol (1985).* 2017;123(5):1039-46.
79. Vanoirbeek JA, Rinaldi M, De Vooght V, Haenen S, Bobic S, Gayan-Ramirez G, et al. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(1):96-104.
80. Reddy AT, Lakshmi SP, Reddy RC. Murine model of allergen induced asthma. *J Vis Exp.* 2012(63):e3771.
81. Casaro M, Souza VR, Oliveira FA, Ferreira CM. OVA-Induced Allergic Airway Inflammation Mouse Model. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:297-301.
82. Kucharewicz I, Bodzenta-Łukaszyk A, Buczek W. Experimental asthma in rats. *Pharmacol Rep.* 2008;60(6):783-8.
83. Epstein MM. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;133(1):84-100.
84. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets.* 2008;9(6):485-94.
85. Piñeiro-Hermida S, Alfaro-Arnedo E, Gregory JA, Torrens R, Ruíz-Martínez C, Adner M, et al. Characterization of the acute inflammatory profile and resolution of airway inflammation after Igf1r-gene targeting in a murine model of HDM-induced asthma. *PLoS One.* 2017;12(12):e0190159.
86. Bracken SJ, Adami AJ, Szczepanek SM, Ehsan M, Natarajan P, Guernsey LA, et al. Long-Term Exposure to House Dust Mite Leads to the Suppression of Allergic Airway Disease Despite Persistent Lung Inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015;166(4):243-58.

87. Boucher M, Henry C, Dufour-Mailhot A, Khadangi F, Bossé Y. Smooth Muscle Hypocontractility and Airway Normoresponsiveness in a Mouse Model of Pulmonary Allergic Inflammation. *Front Physiol.* 2021;12:698019.
88. Weng YH, Chen WY, Lin YL, Wang JY, Chang MS. Blocking IL-19 Signaling Ameliorates Allergen-Induced Airway Inflammation. *Front Immunol.* 2019;10:968.
89. Lu C, Zhang B, Xu T, Zhang W, Bai B, Xiao Z, et al. Piperlongumine reduces ovalbumin-induced asthma and airway inflammation by regulating nuclear factor- κ B activation. *Int J Mol Med.* 2019;44(5):1855-65.
90. Lunding LP, Skouras DB, Vock C, Dinarello CA, Wegmann M. The NLRP3 inflammasome inhibitor, OLT1177^(®), ameliorates experimental allergic asthma in mice. *Allergy.* 2022;77(3):1035-8.
91. Goldklang MP, Perez-Zoghbi JF, Trischler J, Nkyimbeng T, Zakharov SI, Shiomi T, et al. Treatment of experimental asthma using a single small molecule with anti-inflammatory and BK channel-activating properties. *Faseb j.* 2013;27(12):4975-86.
92. Edwards Z, Annamaraju P. *Physiology, Lung Compliance.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.; 2023.
93. Larché M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(3):450-63; quiz 64.
94. Landgraf RG, Jancar S. Endothelin A receptor antagonist modulates lymphocyte and eosinophil infiltration, hyperreactivity and mucus in murine asthma. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(13-14):1748-53.
95. Gao P, Tang K, Lu Y, Huang Z, Wang S, Wang M, et al. Pentraxin 3 promotes airway inflammation in experimental asthma. *Respir Res.* 2020;21(1):237.
96. Warren KJ, Dickinson JD, Nelson AJ, Wyatt TA, Romberger DJ, Poole JA. Ovalbumin-sensitized mice have altered airway inflammation to agriculture organic dust. *Respir Res.* 2019;20(1):51.
97. Liang S, Zhao Y, Chen G, Wang C. Isoorientin ameliorates OVA-induced asthma in a murine model of asthma. *Exp Biol Med (Maywood).* 2022;247(16):1479-88.
98. Martinez FD, Vercelli D. Asthma. *Lancet.* 2013;382(9901):1360-72.
99. Kau AL, Korenblat PE. Anti-interleukin 4 and 13 for asthma treatment in the era of endotypes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2014;14(6):570-5.
100. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood.* 1991;77(9):1859-70.
101. Takatsu K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2011;87(8):463-85.
102. Van LP, Bardel E, Gregoire S, Vanoirbeek J, Schneider E, Dy M, et al. Treatment with the TLR7 agonist R848 induces regulatory T-cell-mediated suppression of established asthma symptoms. *Eur J Immunol.* 2011;41(7):1992-9.

103. da Costa Marques LA, Teixeira SA, de Jesus FN, Wood ME, Torregrossa R, Whiteman M, et al. Vasorelaxant Activity of AP39, a Mitochondria-Targeted H(2)S Donor, on Mouse Mesenteric Artery Rings In Vitro. *Biomolecules*. 2022;12(2).
104. Covarrubias AE, Lecarpentier E, Lo A, Salahuddin S, Gray KJ, Karumanchi SA, et al. AP39, a Modulator of Mitochondrial Bioenergetics, Reduces Antiangiogenic Response and Oxidative Stress in Hypoxia-Exposed Trophoblasts: Relevance for Preeclampsia Pathogenesis. *Am J Pathol*. 2019;189(1):104-14.
105. Karwi QG, Bornbaum J, Boengler K, Torregrossa R, Whiteman M, Wood ME, et al. AP39, a mitochondria-targeting hydrogen sulfide (H₂S) donor, protects against myocardial reperfusion injury independently of salvage kinase signalling. *Br J Pharmacol*. 2017;174(4):287-301.
106. 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.
107. Corvino A, Citi V, Fiorino F, Frecentese F, Magli E, Perissutti E, et al. H(2)S donating corticosteroids: Design, synthesis and biological evaluation in a murine model of asthma. *J Adv Res*. 2022;35:267-77.
108. Mendes JA, Ribeiro MC, Reis Filho G, Rocha T, Muscará MN, Costa SKP, et al. Hydrogen sulfide inhibits apoptosis and protects the bronchial epithelium in an allergic inflammation mice model. *Int Immunopharmacol*. 2019;73:435-41.
109. Kianian F, Seifi B, Kadkhodae M, Sadeghipour HR, Ranjbaran M. Nephroprotection through Modifying the Apoptotic TNF- α /ERK1/2/Bax Signaling Pathway and Oxidative Stress by Long-term Sodium Hydrosulfide Administration in Ovalbumin-induced Chronic Asthma. *Immunol Invest*. 2022;51(3):602-18.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-89

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 24.08.2021 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2021/06
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2021/48
KARAR NUMARASI	: 2021/06-09
ONAY BİTİŞ TARİHİ	24.08.2026
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Turgut Emrah BOZKURT
HAYVAN DENEYLERİNDE	Doç. Dr. Turgut Emrah BOZKURT, Ecz. Bartu
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: ALTIPARMAK(Yüksek Lisans Tezi), Öğr. Gör. Dr. Yasemin KARAMAN
DİĞER YARDIMCI	: Doç. Dr. Sevgen Çelik ÖNDER, Prof. Dr. Emirhan
ARAŞTIRMACILAR	NEMUTLU
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 72 Adet Balb/c Fare (10-12 Hafta)

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Turgut Emrah BOZKURT'un araştırma yürütücüsü olduğu 2021/48 kayıt numaralı "*DeneySEL Alerjik Astım Modelinde Mitokondri Hedefli Sülfür Donörü AP39 Tedavisinin Etkisinin Araştırılması*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Deneyisel alerjik astım modelinde mitokondri hedefli hidrojen sülfür donörü AP39 tedavisinin etkisinin araştırılması

ORIJINALLIK RAPORU

% 13	% 13	% 1	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 9
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
3	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 1
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	Yasemin Karaman, Yesim Kaya-Yasar, Cemil Can Eylem, Sevgen Celik Onder et al. "The effect of mitochondria-targeted slow hydrogen sulfide releasing donor AP39-treatment on airway inflammation", European Journal of Pharmacology, 2023 Yayın	<% 1
6	all-imm.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	mdpi-res.com İnternet Kaynağı	<% 1

EK-3: Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Bartu Altıparmak
Ödev başlığı: Bartu Tez
Gönderi Başlığı: Bartu Tez
Dosya adı: Bartu_Alt_parmak_TEZ.docx
Dosya boyutu: 11.69M
Sayfa sayısı: 61
Kelime sayısı: 11,289
Karakter sayısı: 74,613
Gönderim Tarihi: 09-Ağu-2023 02:00ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2143493549

