



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**FAREDE OVA-LPS İLE İNDÜKLENEN
ALERJİK ASTIM MODELİNDE DİMETİL
FUMARATIN TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Elif GÜN

DOKTORA TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Yeşim KAYA YAŞAR

TRABZON-2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

16/10/2025

Elif GÜN

İthaf

Doktora tezimi, her daim yanımda olan ve bana varlıklarıyla güç katan annem ve babama ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Tez dönemim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olan Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yeşim KAYA YAŞAR'a ,

Çalışmalarıma değerli katkıları ve desteklerinden ötürü tez izleme komite üyeleri Prof. Dr. Mine KADIOĞLU DUMAN'a ve Prof. Dr. Gökçen KERİMOĞLU'na, Doç. Dr. İsmail SAYGIN'a, Arş. Gör. Dr. Sevilay KABLAN'a, Öğr. Gör. İlyas AY'a,

Doktora eğitimim boyunca desteklerini hissettiren, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU'ya, Prof. Dr. Feride Sena SEZEN'e, Prof. Dr. Ersin YARIŞ'a, Doç. Dr. Seçkin ENGİN'e ve Dr. Öğr. Üyesi Serhat SEVGİ'ye,

Bu süreçte bilimsel katkı ve manevi destekleriyle yanımda olan arkadaşlarım Dr. Ümit UZUN' a, Arş. Gör. Ecz. Yasemin ALTUN ALİ'ye, Arş. Gör. Dr. Gözde BOZDAL'a, Öğr. Gör. Dr. Vildan SERDAROĞLU'na,

Doktora yolculuğunda motivasyona en çok ihtiyaç duyduğum anlarda yanımda olan arkadaşlarım Ecz. Berkay DEMİRÇİ, Ecz. Dilara DİLAVER, Ecz. Havva SAYIN ve Zeynep TÖMAN'a,

Son olarak eğitimimin her sürecinde maddi ve manevi beni destekleyen ve gücümün azaldığı her noktada varlıkları ile bana güç veren annem Melek GÜN ve babam Ali GÜN'e, kardeşlerim Ceren ve Merve GÜN'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK 1002-A programına (Proje kodu: 224S427) desteklerinden ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Elif GÜN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Solunum Sistemi Anatomisi ve Fizyolojisi	2
2.2. Kemirgenlerde Solunum Sistemi	3
2.3. Astım	4
2.4. Tarihçe	5
2.5. Etiyoloji	5
2.5.1. Genetik Faktörler	5
2.5.2. Epigenetik Faktörler	6
2.5.3. Çevresel Faktörler	6
2.6. Epidemiyoloji	7
2.7. Patogenez	7
2.7.1. Astımda İnflamasyon	7
2.7.1.2. Tip 2 Astım (Eozinofilik Astım)	8
2.7.1.3. Tip 2 Olmayan Astım (Nötrofilik Astım)	10
2.7.1.4. Obezite İlişkili Astım	11
2.7.2. Astım ve Oksidatif Stres	12
2.7.3. Astım ve Solunum Yolu Remodellingi	12
2.8. Tedavi	13

2.9. Astımda Hücre Metabolizması	16
2.9.1. Glikoz Metabolizması	17
2.9.2. Aminoasit Metabolizması	17
2.9.3. Lipit Metabolizması	18
2.10. Deneysel Astım Modelleri	18
2.10.1. Alerjik (atopik) Astım Modeli	19
2.10.2. OVA ve LPS Modeli	20
2.11. Nükleer Faktör κ B Yolağı	20
2.11.1. Astım ve Nükleer Faktör κ B Yolağı	21
2.12. Keap-1/ Nrf2/HO-1 Yolağı	22
2.12.1. Astım ve Keap-1/ Nrf2/HO-1 Yolağı	22
2.13. Wnt/ β -katenin Yolağı	23
2.13.1. Astım ve Wnt/ β -katenin Yolağı	26
2.14. Dimetil Fumarat	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	31
3.1. Gereç	31
3.1.1. Kimyasallar	31
3.1.2. Antikorlar	32
3.1.3. Analiz Setleri	32
3.1.4. Cihazlar	33
3.1.5. Çözelti ve Tamponlar	34
3.1.5.1. Krebs Henseleit Çözeltisi	34
3.1.5.2. Western Blot Stok Çözelti ve Tamponlar	34
3.1.5.3. Western Blot Çalışma Çözeltileri ve Tamponlar	37
3.2. Yöntem	38
3.2.1. Deney Hayvanları	38
3.2.2. Deneysel Astım Modelinin Oluşturulması ve Deney Protokolü	38
3.2.3. In Vitro Trakea Hiperreaktivitesinin Değerlendirilmesi	41
3.2.4. Total Doku Homojenatlarının Hazırlanması	42
3.2.5. Total Protein Miktar Tayini	42
3.2.6. Western Blot Yöntemi	43
3.2.6.1. Jellerin Hazırlanması	43
3.2.6.2. Örneklerin Hazırlanması	44

3.2.6.3. Elektroforez	44
3.2.6.4. Jelden Membrana Transfer İşlemi	45
3.2.6.5. Proteinlerin Jelden Membrana Transfer İşleminin Doğrulanması	46
3.2.6.6. Bloklama	47
3.2.6.7. Primer Antikorla İnkübasyon	47
3.2.6.8. Görüntüleme	48
3.2.7. Histopatolojik Analiz	49
3.2.8. Metabolomik Analiz	50
3.2.9. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	52
4.1. Fare Trakea Halka Preparatlarında Agonist Aracılı Kasılma Fonksiyonunun Farmakodinamik Analizi	52
4.2. Fare Total Akciğer Homojenatlarında Protein Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi İle Semi Kantitatif Değerlendirilmesi	55
4.2.1. Fare Total Akciğer Homojenatlarında Nrf2/Keap-1/HO-1 Sinyal Yolağı Protein Ekspresyonu	55
4.2.2. Fare Total Akciğer Homojenatlarında Kanonikal Wnt Sinyal Yolağı Protein Ekspresyonu	57
4.2.3. Fare Total Akciğer Homojenatlarında Kanonikal Nf-κB Sinyal Yolağı Protein Ekspresyonu	59
4.3. İzole Fare Akciğer Dokularının Histopatolojik Analizi	62
4.4. İzole Fare Akciğer Dokularının Metabolomik Analizi	65
4.4.1. Aminoasit Metabolizmasında Rol Oynayan Metabolitlerin Analizi	68
4.4.2. Karbonhidrat Metabolizması ve Glikolizde Rol Oynayan Metabolitlerin Analizi	69
4.4.3. Lipit ve Yağ Asidi Metabolizmasında Rol Oynayan Metabolitlerin Analizi	69
4.4.4. Aromatik ve Sekonder Metabolitler	70
4.4.5. Diğer: Dehidroaskorbik asit, Monometil Fosfat ve Fosfonomisin	70
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	77
6. KAYNAKLAR	89
EKLER	113
Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi	114
ÖZGEÇMİŞ	116

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Klinik kullanımı olan beta-2 adrenerjik agonist ilaçlar	14
Tablo 2. Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar	16
Tablo 3. Astım tedavisinde kullanılan ve klinik araştırmaları devam eden biyolojik ajanlar	16
Tablo 4. Kullanılan kimyasallar, marka ve kodları	31
Tablo 5. Kullanılan antikorlar, marka ve kodları	32
Tablo 6. Western blot deneylerinde kullanılan analiz setleri	33
Tablo 7. Kullanılan cihazlar, marka ve kodları	33
Tablo 8. Deneysel astım modelinde DMF tedavisinin etkinliğini araştırmak amacıyla oluşturulan deney grupları	41
Tablo 9. Akciğer dokularındaki histopatolojik skora için yarı-kantitatif değerlendirme sistemi	50
Tablo 10. Farelerden izole edilen trakealardan elde edilen karbakol indüklü kasılma yanıtlarının Emax değerleri.	52
Tablo 11. Farelerden izole edilen trakealardan elde edilen 5-HT indüklü kasılma yanıtlarının Emax (%) değerleri	53
Tablo 12. Farelerden izole edilen trakealardan elde edilen bradikinin indüklü kasılma yanıtlarının Emax (%) değerleri.	54
Tablo 13. Kontrol ve DMF 100 mg/kg/gün grubu farelerden izole edilen trakealarda elde edilen karbakol, 5-HT ve bradikinin kasılma yanıtlarının Emaks ve pD2 değerleri	55
Tablo 14. GC-MS analizi sonucunda akciğer homojenatlarında tanımlanan metabolitler	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. İnsan solunum sisteminin anatomik yapısı	3
Şekil 2. Fare akciğer anatomisi	4
Şekil 3. Astım patogenezi	9
Şekil 4. Nötrofilik astım patogenezi	11
Şekil 5. Astımda sitokinler	12
Şekil 6. Solunum yolu remodellingi	13
Şekil 7. Nf-κB kanonikal yolak	21
Şekil 8. Wnt/β-katenin yolağı	25
Şekil 9. Wnt/ β- katenin yolağı aktivasyonu ve inaktivasyonu	26
Şekil 10. DMF kimyasal yapısı	28
Şekil 11. Farede OVA ve LPS ile indüklenen astım modelinin deneysel protokolü	39
Şekil 12. Western blotlama deneylerinde uygulanan jelden membrana transfer (ıslak transfer) işleminde kaset içeriği	45
Şekil 13. Kontrol, OL, OL+DMF30, OL+DMF100 deney gruplarındaki farelerden izole edilen trakea halkalarında karbakol (10-8-10-4 M) ile indüklenen konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtları	52
Şekil 14. Kontrol, OL, OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarındaki farelerden izole edilen trakea halkalarında 5-HT (10-10-10-4 M) ile indüklenen konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtları	53
Şekil 15. Kontrol, OL, OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarındaki farelerden izole edilen trakea halkalarında bradikinin (10-8-10-4 M) ile indüklenen konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtları	54
Şekil 16. Farelerden izole edilen akciğer dokularında Nrf2 protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü	56
Şekil 17. Farelerden izole edilen akciğer dokularında Nrf2 protein ekspresyonunun yarı kantitatif analiz grafiği	56
Şekil 18. Farelerden izole edilen akciğer dokularında HO-1 protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü	57
Şekil 19. Farelerden izole edilen akciğer dokularında β-katenin protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü	57

Şekil 20. Farelerden izole edilen akciğer dokularında β -katenin protein ekspresyonunun yarı kantitatif analiz grafiği	58
Şekil 21. Farelerden izole edilen akciğer dokularında Wnt-5A/B protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü	58
Şekil 22. Farelerden izole edilen akciğer dokularında Wnt-5A/B protein ekspresyonunun yarı kantitatif analiz grafiği	59
Şekil 23. Farelerden izole edilen akciğer dokularında total Nf- κ B protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü	59
Şekil 24. Farelerden izole edilen akciğer dokularında total Nf- κ B protein ekspresyonunun yarı kantitatif analiz grafiği	60
Şekil 25. Farelerden izole edilen akciğer dokularında fosforile Nf- κ B protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü	60
Şekil 26. Farelerden izole edilen akciğer dokularında fosforile Nf- κ B protein ekspresyonunun yarı kantitatif analiz grafiği	61
Şekil 27. Farelerden izole edilen akciğer dokularında fosforile Nf- κ B protein ekspresyonunun total Nf- κ B protein ekspresyonuna oranı	62
Şekil 28. a)Farelerden elde edilen akciğer örneklerinde parankimal inflamasyon skorları b)Farelerden elde edilen akciğer örneklerinde peribronşiyal inflamasyon skorları	63
Şekil 29. Kontrol, kontrol+DMF, OL, OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarındaki farelerden elde edilen akciğer homojenatlarının metabolomik analizinden elde edilen temel bileşenler analizi (PCA) grafiği (a) ve kısmi en küçük kareler ayırıcı analizi (PLS-DA) grafiği (b)	66
Şekil 30. Kontrol, DMF, OL, OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarının metabolomik analizinde, gruplar arası ayrımı sağlayan metabolitlerin Variable Importance in Projection (VIP) puanları ile metabolitlerin düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik	68
Şekil 31. Kontrol ve kontrol+ DMF gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarındaki metabolit ekspresyonlarının ısı haritası (heat map) ile gösterimi.	71

Şekil 32. Kontrol ve kontrol+DMF deney gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarının metabolomik analizinde, gruplar arası ayrımı sağlayan metabolitlerin VIP puanları ile metabolitlerin düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik	72
Şekil 33. Kontrol ve kontrol+DMF deney gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarının karşılaştırmalı metabolomik analizine ait yanardağ (volcano plot) grafiği	73
Şekil 34. Kontrol ve OL gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarındaki metabolit ekspresyonlarının ısı haritası (heat map) ile gösterimi.	74
Şekil 35. Kontrol ve OL deney gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarının metabolomik analizinde, gruplar arası ayrımı sağlayan metabolitlerin VIP puanları ile metabolitlerin düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik.	75
Şekil 36. Kontrol ve OL deney gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarının karşılaştırmalı metabolomik analizine ait yanardağ (volcano plot) grafiği	76

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. Farelere çözeltilerin intranazal yoldan uygulanmasının temsili görüntüsü.	38
Resim 2. İzole organ banyosu deneyleri için farelerden izole edilen trakeaların çevre dokulardan temizlenmesine ait temsili görüntü	40
Resim 3. İzole organ banyosu deneylerinde miyografa takılmış trakea halkalarına ait temsili görüntü	40
Resim 4. İzole organ banyosu deneylerinin yürütüldüğü miyograf cihazının temsili görüntüsü	42
Resim 5. Farelerden izole edilen akciğer dokusu homojenatlarında total protein tayininde kullanılan 96-kuyucuklu mikroplakanın temsili görüntüsü	43
Resim 6. Western blotlama deneylerinde uygulanan elektroforez işlemine ait temsili görüntü	44
Resim 7. Western blotlama deneylerinde uygulanan jelden membrana transfer (ıslak transfer) işlemine ait temsili görüntü	46
Resim 8. Western blotlama deneylerinde proteinlerin jelden membrana transfer doğruluğunu teyit etmek için uygulanan Ponceau S çözeltisi ile boyama işlemine ait temsili görüntü	46
Resim 9. Western blotlama deneylerinde spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin kapatılması için uygulanan bloklama işlemine ait temsili görüntü	47
Resim 10. Western blotlama deneylerinde membranların primer antikor ile inkübasyon işlemine ait temsili görüntü	48
Resim 11. Histopatolojik analiz için hazırlanan parafin bloklar	50
Resim 12. Histopatolojik analiz görüntüleri	64

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

APC	Adenomatöz poliposis koli
ATP	Adenozin trifosfat
BAL	Bronkoalveolar lavaj
BSA	Bovin serum albumin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CCH	Karbakol
CMC	Karboksimetil selüloz
CXCL	Kemokin
DMF	Dimetil fumarat
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EWAS	Epigenom Wide Association Studies
FEV1	Zorlu ekspiratuvar hacim
FVC	Zorunlu vital kapasite
GATA3	GATA transkripsiyon faktörü 3
GINA	Küresel Astım Yönetimi ve Önleme Stratejisi
GLUT1	Glikoz taşıyıcısı tip 1
GSK	Glikojen sentaz kinaz
GTP	Guanozin trifosfat
GWAS	Genom Wide Association Studies
H&E	Hematoksilen & Eozin
HO	Hemooksijenaz-1
IFN	İnterferon
IG	İmmunoglobulin
IL	İnterlökin
İ.N.	İntranazal
İ.P.	İntraperitoneal
KDA	Kilodalton
KEAP	Kelch like associated protein

KH	Krebs-Henseleit
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LPS	Lipopolisakkarit
MDA	Malondialdehit
MMP	Matriks metalloproteinaz
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
mg	Miligram
miRNA	Mikro RNA
mL	Mililitre
MS	Multiple sklerozis
M1	Muskarinik tip 1
NaCl	Sodyum klorür
NaF	Sodyum florür
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
Nf-κ B	Nükleer faktör kappa B
NO	Nitrik oksit
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2
OL	OVA-LPS
OVA	Ovalbumin
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCA	Temel bileşenler analizi
PDE	Fosfodiesteraz
PKA	Protein kinaz A
PO	Per oral
ROS	Reaktif oksijen türevleri
RV	Rezidüel hacim
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
STAT	Sinyal iletimi ve transkripsiyon faktörleri
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
Th	T helper
TLR	Toll benzeri reseptör

TNF	Tümör nekrozis faktör
TSLP	Timik stromal lenfopoietin
WNT	Wingless
VIP	Variable Importance in Projection
5-HT	5-Hidroksi triptamin

Formüller

CaCl₂	Kalsiyum klorür
K⁺	Potasyum iyonu
NaCl	Sodyum klorür
NaF	Sodyum florür
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa

ÖZET

Farede OVA-LPS ile İndüklenen Alerjik Astım Modelinde Dimetil Fumaratın Terapötik Etkinliğinin Araştırılması

Alerjik astım, en yaygın görülen astım alt tipi olmakla birlikte hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir ve henüz radikal bir tedavisi mevcut değildir. Patogenezinde oksidatif stres, inflamasyon ve hücre metabolizmasındaki değişiklikler gibi birçok faktör rol oynamaktadır. Bu çalışmada amacımız dimetil fumaratın (DMF) ovalbumin (OVA) ve lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen astım modelinde trakeal kontraktilite, akciğer dokusunda protein ekspresyonlarındaki değişiklikler, parankimal ve peribronşiyal inflamasyon ve hücre metabolitlerindeki değişiklikler aracılı terapötik etkisini araştırmaktır.

Dişi Balb/c farelere sensitizasyon ve sataşma fazlarından oluşan 21 günlük deney protokolünde intraperitoneal (i.p.) ve intranazal (i.n.) OVA ve LPS uygulanarak alerjik astım modeli oluşturuldu. 18-21. Günlerde deney gruplarına göre farelere düşük doz (30 mg/kg/gün) veya yüksek doz (100 mg/kg/gün) DMF oral gavaj ile verildi. 22. Gün farelerden trakea ve akciğer dokuları izole edildi. İzole edilen trakealardan miyograf sistemi aracılığıyla karbakol, 5-HT ve bradikinine bağlı kontraktilite yanıtları elde edildi. Yüksek doz DMF tedavisi, 5-HT ve bradikinin ile indüklenen trakeal kontraktiliteyi inhibe etti. Akciğer dokularında western blotlama tekniği ile kanonikal Wnt/ β -katenin yolağı (defosforile β -katenin, Wnt-5A/B), Nf- κ B yolağı (total Nf- κ B ve fosforile Nf- κ B p65), Nrf2/HO-1 yolağı (Nrf2) proteinlerinin ekspresyonu değerlendirildi. B-katenin düzeylerinde astımlı farelerde ve kontrol DMF grubunda anlamlı azalma görülürken, DMF tedavisi alan astımlı farelerde ekspresyon seviyesi değişmedi. Wnt-5A düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi. Nrf2 düzeyi astımlı farelerde azalırken, DMF tedavisi ile Nrf2 ekspresyonu indüklendi. Astımlı farelerde aktive olan Nf- κ B yolağı, DMF tedavisi ile inhibe edildi. Akciğer dokularında yapılan metabolomik analizlerde özellikle glikoz metabolizmasında astım kaynaklı gelişen bozukluklar DMF ile iyileştirildi. Akciğer dokularında peribronşiyal ve parankimal inflamasyon üzerinde DMF'nin iyileştirici etkisi tespit edilemedi. Çalışmamızın sonuçlarına göre; yüksek doz DMF (100 mg/kg/gün) astımdaki fonksiyonel, moleküler ve metabolik değişiklikleri iyileştirerek terapötik etkinlik göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Astım, Dimetil fumarat, Lipopolisakkarit, Ovalbumin

ABSTRACT

Investigation of the Therapeutic Effects of Dimethyl Fumarate in an OVA-LPS-Induced Allergic Asthma Model in Mice

Allergic asthma, the most common subtype of asthma, significantly impairs patients' quality of life, and a definitive cure is yet to be established. Its pathogenesis involves multiple factors, including oxidative stress, inflammation, and alterations in cellular metabolism. In this study, we aimed to investigate the therapeutic effects of dimethyl fumarate (DMF), in an ovalbumin (OVA) and lipopolysaccharide (LPS)-induced asthma model. The study focused on tracheal contractility, protein expression changes in lung tissue, parenchymal and peribronchial inflammation, and alterations in cellular metabolites.

Female Balb/c mice were sensitized and challenged over a 21-day experimental protocol using intraperitoneal (i.p.) and intranasal (i.n.) administration of OVA and LPS to induce allergic asthma. On days 18–21, mice received either a low dose (30 mg/kg/day) or high dose (100 mg/kg/day) of DMF via oral gavage according to the experimental group. On day 22, tracheal and lung tissues were isolated. Contractile responses to carbachol, 5-HT, and bradykinin were measured in isolated tracheae using a myograph system. High-dose DMF treatment inhibited 5-HT- and bradykinin-induced tracheal contractility. Protein expression of canonical Wnt/ β -catenin pathway components (dephosphorylated β -catenin, Wnt-5A/B), NF- κ B pathway components (total NF- κ B and phosphorylated NF- κ B p65), and Nrf2/HO-1 pathway (Nrf2) was assessed in lung tissues by Western blotting. β -catenin levels were significantly reduced in asthmatic mice and the control DMF group, whereas DMF treatment in asthmatic mice maintained expression levels. No significant differences in Wnt-5A levels were observed among groups. Nrf2 levels were decreased in asthmatic mice but were restored following DMF treatment. NF- κ B pathway activation in asthmatic mice was inhibited by DMF treatment. Metabolomic analysis of lung tissues revealed that DMF ameliorated asthma-induced disturbances, particularly in glucose metabolism. However, DMF did not significantly affect peribronchial or parenchymal inflammation. Overall, our results indicate that high-dose DMF (100 mg/kg/day) exerts therapeutic effects by improving functional, molecular, and metabolic alterations associated with asthma.

Keywords: Asthma, Dimethyl fumarate, Lipopolysaccharide, Ovalbumin

1. GİRİŞ ve AMAÇ

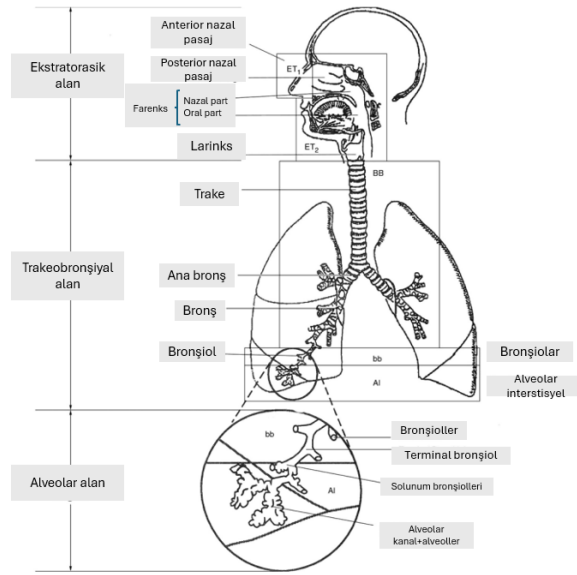
Küresel Astım Yönetimi ve Önleme Stratejisi (*Global Initiative for Asthma; GINA*) 2024 kılavuzuna göre, astım; hırıltılı solunum, nefes darlığı ve öksürük gibi belirtilerden biri ya da birkaçıyla seyreden, bu belirtilerin genellikle gece saatlerinde, egzersiz, kahkaha, alerjen maruziyeti, soğuk hava veya viral enfeksiyonlar gibi tetikleyicilerle ortaya çıktığı; zaman içinde değişkenlik gösteren sıklık ve şiddette gözlenebilen, heterojen ve kompleks yapıda bir kronik hastalıktır (1, 2). Astım hastalarının büyük çoğunluğu alerjik astım tanılıdır (3). Alerjik astım patogenezinde genetik, epigenetik birçok faktörlerin yanı sıra, inflamasyon, oksidatif stres ve buna bağlı morfolojik ve hücre metabolizmasındaki değişiklikler rol oynamaktadır (4). Güncel tedavi yaklaşımları çoğunlukla atakları kontrol etmeye yönelik olup henüz küratif bir tedavi seçeneği mevcut değildir (5). Astım ile ilişkili deneysel araştırmalarda sıklıkla kullanılan modeller arasında i.p. ve/veya i.n. OVA, LPS'in kombine veya tekli uygulamaları yer almaktadır (6). Bu tez çalışmasında sensitizasyon ve sataşma fazlarında i.p. ve i.n. OVA ve LPS uygulaması ile farelerde astım oluşturulmuştur. OVA ve LPS ile indüklenen trakeal reaktivite değişiklikleri, Wnt/ β -katenin, nükleer faktör κ B (Nf- κ B) ve nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2/hemeoksijenaz-1 (Nrf2/ HO-1) moleküler yollarındaki değişiklikler, akciğer dokularında parankimal/peribronşiyal inflamasyon ve hücre metabolizmasındaki değişiklikler incelenmiştir.

DMF, antiinflamatuvar ve immunomodülatör etkinliği ile psöriazis ve multiple sklerozis hastalıklarında klinik kullanımı mevcut olan Nrf2 indükleyici terapötik ajandır. Astım patogenezi ile ilişkilendirilen oksidatif stres ve inflamatuvar yollarla regülatör etkisi birçok prelinik çalışma ile kanıtlanarak, astım tedavisinde yeniden konumlandırılabilmesi öne sürülmüştür (7). Bu tez çalışmasında, OVA ve LPS ile astım oluşturulan farelerde, DMF'nin düşük ve yüksek dozlarının astım patogenezinin eşlik eden fonksiyonel, moleküler, yapısal ve hücre metabolizmadaki değişiklikler üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Solunum Sistemi Anatomisi Ve Fizyolojisi

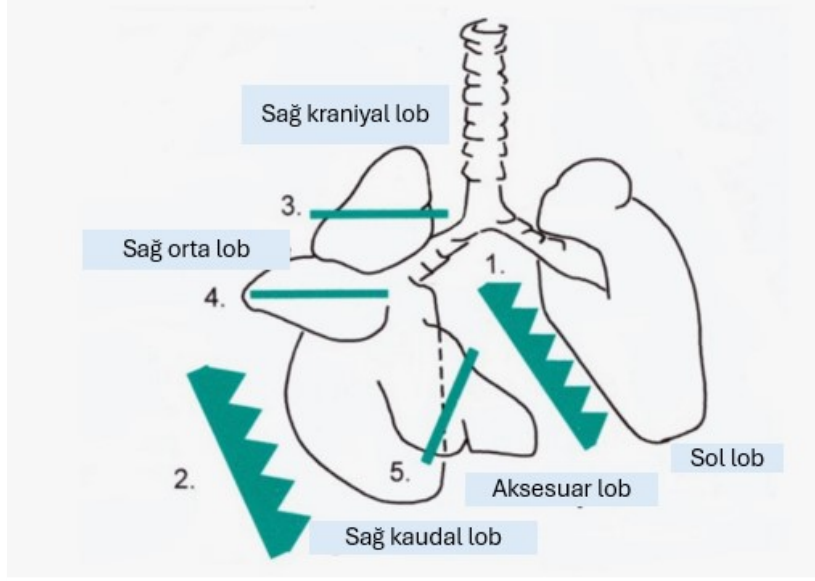
Memeli canlılarda solunum sistemi *cavitas nasi* (burun boşluğu), paranasal sinüsler, farenks, larenks, interkostal nörovasküler yapılar, trakea, bronş, bronşiyoller, alveoller ve akciğer parankiminden oluşur. Solunum sistemi anatomik olarak ekstratorasik alan, trakeadan terminal bronşiyollere kadar uzanan trakebronşiyal alan, alveoller ve akciğer parankimini içeren asinar alan olmak üzere 3 kısımda incelenir. Klinik uygulamalarda ekstratorasik alan üst solunum yolu; intratorasik alan ve alveolar yapılar ise alt solunum yolu olarak isimlendirilmektedir (8). Solunum yolunun, her dallanma adımında duvar çapı ve kalınlığı giderek azalmaktadır. Trakea, 10-13 cm uzunluğunda ve 1,5- 2 cm genişliğinde, , altıncı-yedinci servikal vertebra ile dördüncü-beşinci torasik vertebraya kadar uzanan tübüler yapıdır. Trakeanın tübüler yapısı ventralinde hiyalin kıkırdak yapısı, dorsalinde ise solunum yolu düz kasından oluşmaktadır. Trakea beşinci torasik vertebra sınırında dallanarak bronşları oluşturur (9). Akciğerler inhalasyon havasını solunum yolu aracılığı ile alveolar keseciklere kadar taşıyarak pulmoner kapiler damarlardaki kanın oksijenlenmesini ve karbondioksitten arınmasını sağlamaktadır. Akciğer *radix pulmonis*'ten kalp ve trakeaya bağlanır. *Radix pulmonis*'ten itibaren pariyetal ve visseral yapraklar *mesopneumonium*'u (akciğer mezenterisi) oluşturur. Akciğerin mediyal kısmında bronşlar, pulmoner, bronşiyal ve lenfatik damarlar ile sinirler gibi *radix pulmonis*'i oluşturan yapılar *hilum pulmonis*'te akciğere bağlanır. Akciğerler *fissura horizontalis* ve *fissura-obliqua* ile loblara ayrılır. Buna göre, sağ akciğer üç lobdan, sol akciğer ise iki lobdan oluşmaktadır. Sağ akciğer soldakine göre daha büyük ve ağırdır. Akciğerler plevra adı verilen iki katlı seröz tabaka ile kaplıdır. İnsanda akciğerlerin toplam gaz hacmi 6 000 mL'dir (10, 11).



Şekil 1. İnsan solunum sisteminin anatomik yapısı (Ahookhash'tan, 8)

2.2. Kemirgenlerde Solunum Sistemi

Kemirgenlerde solunum sisteminin genel yapısı diğer memelilere benzer şekilde başlıca trakea ve akciğerlerden oluşmaktadır. Ancak kemirgenlerde sol akciğer tek loblu iken, sağ akciğer beş loba ayrılmaktadır. Akciğerlerin toplam gaz hacmi ise sıçanlarda 10 mL, farelerde ise 1 mL'dir. İnsan solunum sistemine kıyasla akciğerleri saran plevra dokusu daha ince, alveolar keseciklerin yapısı daha küçük, kan-gaz değişiminin gerçekleştiği bariyer kalınlığı ise daha azdır. Fare trakeasında kıkırdak bulunur ancak diğer memelilere göre daha az organize olmuştur; trakeanın sadece üst kısmı diğer memelilerde görülen tam halkalara sahiptir ve bunlar distale doğru ilerledikçe plakalara dönüşür. Solunum yolu dikotomik değil monopodial bir dallanma örüntüsü sergiler. Fare akciğerinin diğer iki önemli özelliği solunum yolunun göreceli büyüklüğü ile solunum yolu epitelinin ince olmasıdır (10).



Şekil 2. Fare akciğer anatomisi (Kittel'den, 12)

2.3. Astım

Küresel Astım Yönetimi ve Önleme Stratejisi (*Global Initiative for Asthma; GINA*) 2024 kılavuzuna göre astım hırıltılı solunum, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve öksürük belirtilerinin biri veya birkaçının görüldüğü, belirtilerin gece vakitlerinde, egzersiz, kahkaha, alerjenler veya soğuk hava ya da viral enfeksiyonlar ile tetiklendiği, zaman içinde değişik şekillerde ve farklı yoğunluklarda görülebildiği heterojenik ve kompleks bir kronik hastalıktır (1,2). Astım, klinik belirtilerin şiddetinin ve sıklığının arttığı epizodik hastalık alevlenmeleri ile seyreder. Solunum yolu düz kasında hipertrofi ve hiperplazi, goblet hücrelerinde hiperplazi ve mukus salgısında artış, submukozal mukus bezlerinde hipertrofi, subepitelyal fibrozis ve kolajen birikiminde ve submukozal kan damarlarında artış, submukozal ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu, düz kas kasılmasından kaynaklı solunum yolu obstrüksiyonu astıma eşlik etmektedir (13). Astım hayat kalitesini azaltıp, iş gücü kaybına neden olarak bireye ve topluma önemli sosyoekonomik yük oluşturmaktadır. Ayrıca astımlı hastalarda diyabet, artrit, kardiyovasküler ve hipertansif hastalıklar, hormonal bozukluklar, obezite, rinit, kanser, inme ve osteoporozis riskinde artış bildirilmektedir (14). Hastalık patogenezinin altında yatan moleküler mekanizmalar ve epizodik alevlenmeleri tetikleyen faktörlere bağlı olarak alerjik astım, erken başlangıçlı eozinofilik astım, enfeksiyon ile indüklenen astım, viral

enfeksiyonla kötüleşen astım, aspirin ile indüklenen astım, premenstrüel astım, nötrofilik astım, steroid dirençli eozinofilik astım gibi farklı astım fenotipleri tanımlanmıştır (5).

2.4. Tarihçe

Astım ile ilgili ilk kayıtlara eski Çin ve Mısır kaynaklarında rastlanmaktadır. Hastalığın semptomları ile ilgili mevsimsel alevlenme dönemleri, hırıltılı solunum, mukus yapısında değişiklikler bildirilmiştir. 20. yüzyıla kadar astım tanısı infektif, kardiyak ve diğer solunum yolu hastalıkları ile karıştırılmıştır ve ancak 20. yüzyılda net olarak tanımlanabilmiştir (15). 19. yüzyılda alerjik yanıtta rol oynayan hücrelerin ve saman nezlesinin tanımlanması astım hastalığı ile ilgili mevcut yaklaşımın temelini oluşturmuştur. 1819 yılında John Bostock ilk vakayı yayımlamıştır. 1873 yılında Charles Blackley saman nezlesi ve astım ile ilişkili 28 vaka raporu bildirmiştir. Birçok ülkede, 1960'lı yıllarda sodyum lauril sülfat gibi kimyasalları içeren temizlik ürünlerinin evlerde kullanılmaya başlanması ile astım insidansında ve astıma bağlı hastaneye yatış riskinde artış gözlemlenmiştir (16). Astım etimolojik olarak, Yunanca'da "nefes nefese kalma" ya da "kısa nefes alma" anlamına gelen sözcüklerden türetilmiştir. Galen, Hipokrat gibi birçok hekimin reçetelerinde ve metinlerinde astım semptomları ile tanımlanan hastalıklara rastlanırken, İbni Sina'nın astımla ilgili özel olarak yazdığı metinde hastalık trakeada mukus birikimi, nefes almada zorluk, hızlı hızlı nefes alma belirtileri ile tanımlanmıştır (17).

2.5. Etiyoloji

Astım etiyolojisinde genetik, epigenetik ve çevresel birçok faktör rol oynamaktadır.

2.5.1. Genetik Faktörler

Genome Wide Association Studies (GWAS) kapsamında yürütülen çalışmalarda astımlı ve sağlıklı bireyler arasında birçok genetik varyantta farklılık olduğu gözlemlenmiştir. Astım ilk kez 1989 yılında *11q13* lokusundaki genetik varyasyonlarla ilişkilendirilmiş ve şimdiye kadar 600'den fazla genin astım ve astımla ilişkili fenotipler (IgE seviyelerinde yükselme, bronşiyal hiperreaktivite, eozinofili vb.) ile ilişkisi tanımlanmıştır. Beta2 adrenerjik reseptör geni, T *helper* (Th)1 ve Th2 hücre farklılaşmasında yer alan sitokinler, reseptörler, sinyal proteinleri ve transkripsiyon faktörleriyle ilişkili *IL4*, *IL4RA*, *IFNG*, *IFNGR1*, *STAT6*, *GATA3* ve *TBX21* genlerindeki varyasyonları ortaya koyan birçok çalışma yapılmıştır (18). Özellikle *17q12-21* lokusunda

yer alan endoplazmik retikulumda protein katlanmasından sorumlu *ORDML3*, *GSDMB*, *ZPBP2* ve *IKZF3* genlerindeki değişiklikler majör olarak astım ve astımdaki proinflamatuvar süreçler ile ilişkilendirilmektedir (13). Ayrıca *6p21.32*, *5q22.1*, *2q12* ve *9p24.1* lokuslarındaki genetik varyasyonların da astım gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (19).

2.5.2. Epigenetik Faktörler

Epigenom wide association studies (EWAS) ve preklinik çalışmalar, DNA metilasyonu, post-translasyonel histon modifikasyonu ve mikroRNA (miRNA) ekspresyonunun immün yanıtlarda majör regülatör rol oynayan ve astımdaki gen ekspresyon değişiklikleri ile ilişkilendirilen en yaygın epigenetik mekanizmalar olduğunu göstermiştir. Solunum yolu *remodellinginde* görevli *COL15A1*, *RB1*, *FOXP1*, *CCDC19*; sürfaktan sekresyonunda görevli , *ACOT7*, *PPT2*; solunum yollarında nitrik oksit (NO) üretiminden sorumlu *ACP5* ve sitokin üretimi ve sinyalizasyonunda görevli *IL5RA*, *DICER1* genlerindeki DNA metilasyonunda azalma astım ile ilişkilendirilmektedir. Bazofillerde ve mast hücrelerinde histidin dekarboksilaz geninin hipometilasyonunun özellikle alerjik astım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Post translasyonel histon modifikasyonlarının (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, SUMOilasyon ve ADP-ribozilasyonu) astımdaki özellikle CD⁴⁺T hücre farklılaşması ile ilişkisi tanımlanmış ancak altta yatan mekanizma yeterince aydınlatılamamıştır. Ayrıca miRNA 221, miRNA21, miRNA19, miRNA145, miRNA146 ve miRNA126 seviyelerinin de astımlı hastalarda değiştiği kaydedilmiştir (19).

2.5.3. Çevresel Faktörler

Astım hastalarında solunum yolu hiperreaktivitesi nedeniyle, tetikleyici faktörlere maruziyet solunum yolunda bronkokonstriksiyona, inflamasyona ve ödeme sebep olabilmektedir. Alerjenler (polenler, küf, kedi/köpek, toz akarları), iritanlar (toz partikülleri, hava değişiklikleri, ozon ve duman gibi hava kirleticileri, temizlik ürünleri, boya, parfüm gibi çeşitli kimyasallar, tütün, marihuana), solunum yolu enfeksiyonları (insan rinovirüs, solunum sinsital virüs, influenza, parainfluenza, koronavirüs, adenovirüs, insan metapnömonovirüs, bokavirüs vb.), stres, egzersiz, ilaçlar (aspirin, beta blokörler), vitamin D eksikliği, diyet astım hastalığı gelişiminde ve astım alevlenmesinde rol oynayabilmektedir (18,20).

2.6. Epidemiyoloji

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2019 yılında astımdan etkilenen toplam insan sayısı 262 milyondur ve astım kaynaklı ölüm sayısı 455 bindir (21). 2024 GINA kılavuzuna göre ise dünya çapında yaklaşık 300 milyon kişi astımla mücadele etmektedir ve her gün 1 000 kişi astım nedeniyle hayatını kaybetmektedir (2). Türkiye’de yaklaşık 3 milyon kişinin astım hastası olduğu tahmin edilmektedir ve tüm kronik solunum yolu hastalıkları içinde en sık hastane yatışı gerektiren ikinci hastalık astımdır. Türkiye’de yürütülen çok merkezli bir çalışmada astım görülme sıklığı %5 olarak bildirilmiştir. Astım görülme oranının Marmara Bölgesi ve İç Anadolu Bölgesinde yüksek olduğu ve astım tanılı hastaların çoğunluğunu (%74.8) kadınların oluşturduğu gözlemlenmiştir (22). Puberte öncesi astım insidansı erkeklerde daha fazla iken, puberte sonrası kadınlarda daha fazladır (23).

2.7. Patogenez

2.7.1. Astımda İnflamasyon

Astımda görülen kronik inflamasyon, alveolar hipoventilasyon ve hipoksiye sebep olur ve akciğerlere perfüzyon azalır. Akciğerlerdeki inflamasyonun intraplevral ve intraalveolar basıncı arttırması ile pulmoner sirkülasyon daha da azalarak kan oksijenlenme seviyesinin azalmasına ve karbondioksit retansiyonuna sebep olur (24). Astım patogenezinde rol oynayan immün mekanizmalar farklı T lenfosit alt tiplerinin farklılaşmasına ve aktivasyonuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (25). Alerjik astım patogenezini başlıca Th2 tip inflamasyona bağımlıdır ancak diğer astım fenotiplerinde Th1 ve Th17 hücre yanıtlarının da solunum yolu inflamasyonunda rol oynadığı tespit edilmiştir (5, 13).

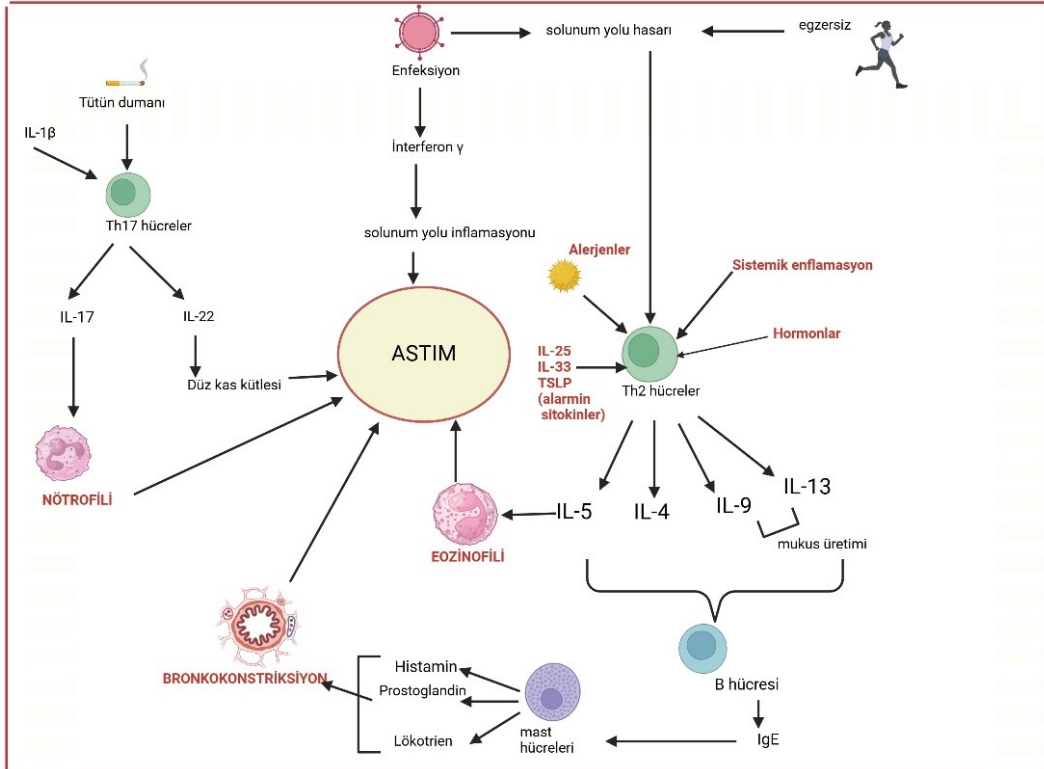
Th2 ve Th1 hücre yanıtlarındaki arasındaki dengenin bozulması uzun yıllar boyunca astım patogenezinde ana etken olarak tanımlanmış olsa da otoimmün hastalıkların görülme sıklığındaki artıştan ötürü astım gelişim mekanizmalarının Th2 ve Th1 yanıtlarındaki dengesizlik ile açıklanamayacak kadar kompleks olduğuna karar verilmiştir (26). Th2 yanıtın astım patogenezinde rol oynamasına bağlı olarak astım çeşitleri Th2 yanıtı yüksek astım (T2, eozinofilik astım) ve Th2 yanıtı düşük astım (Th1, Th17, solunum yolu disbiyozisi, NO sinyalizasyonunda disregülasyon vb. faktörler aracılığıyla) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (27).

2.7.1.2. Tip 2 Astım (Eozinofilik Astım)

Tip 2 astımda Th2 inflamatuvar yanıt baskın olup alerjik ya da alerjik olmayan temellere sahip olabilir ve başlıca eozinofilik solunum yolu inflamasyonu ile ilişkilidir. Tekrarlayan ve kronik rinosinüzit ve nazal polip ilişkili astım, aspirin ile indüklenen astım alt tiplerinde de Tip 2 inflamasyon görülmektedir (28). Tip 2 astımda Th2 sitokinler, inflamatuvar hücreler (eozinofiller, mast hücreleri, bazofiller, Th2 lenfositler, IgE üreten plazma hücreleri) ve solunum yolu epitelyal hücre sitokinleri birlikte etki göstermektedir (13). Alerjenler ve viral enfeksiyonlar gibi astım tetikleyicileri dendritik hücre aktivasyonu aracılığıyla *native* CD4⁺T⁺ lenfositlerin efektör Th2 hücrelere farklılaşmasına neden olur. Çevresel patojenlere maruziyet sonrasında solunum yolu epitelinden alarmin sitokinler olarak adlandırılan interlökin (IL)-25, IL-33 ve *timik stromal lenfopoietin* (TSLP) gibi faktörlerin salıverilmesi de dendritik hücre aktivasyonuna katkı sağlamaktadır. Alarminler, epitelyal hücrelerde eksprese edildikten sonra *Toll* benzeri reseptörlerle (TLR) etkileşmektedir ve astım patogenezinde majör rol oynayan Th2 sitokinlerin ekspresyonuna öncülük etmektedir. TSLP, insan epitel hücrelerinin yanı sıra dendritik hücreler, mast hücreleri, insan akciğer makrofajları ve fibroblastlar tarafından da salıverilebilmekte ve etkilerini TSLP reseptörü ve IL-17 reseptör (IL-17R) α 'ya bağlanarak göstermektedir. IL-33 ise epitel hücreler ve endotel hücrelerden salıverilmektedir ve solunum yolu fibroblastlarından kolajen ve fibronektin sentezini, mast hücrelerinden Th2 sitokinlerin salıverilmesini sağlayarak hem immünizasyonda hem de *remodellingde* rol oynamaktadır. IL-25, IL-17E sitokini olarak da bilinmektedir ve akciğer fibrozisi ve akciğer fibroblastlarında sitokin ekspresyonunda artışa sebep olmaktadır. Astım tedavisinde Th2 ve Th17 sitokinlerin yanı sıra, alarmin sitokinlerin hedeflendirildiği tedaviler de araştırılmaktadır (29, 30).

Mast hücreler ve efektör Th2 hücreler IL-4 salıvererek GATA transkripsiyon faktörü 3 (GATA3) ve sinyal iletimi ve transkripsiyon faktörleri (STAT) 6 gibi transkripsiyon faktörleri aracılığıyla Th2 hücre farklılaşmasına ve aktivasyonuna katkı sağlar. Ayrıca aktive Th2 hücrelerden IL-5 ve IL-13 salıverilir. IL-5, kemik iliği üzerinde etkisi ile eozinofil sayısında artışa, eozinofil kolonizasyonuna ve migrasyonuna sebep olmaktadır (31). IL-13, goblet hücre metaplasisine, mukus hipersekresyonuna ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β ekspresyonunda artış ile solunum yollarında fibrozise neden olmaktadır (32). Th2 tarafından aktive edilen B hücreler, immunoglobulin

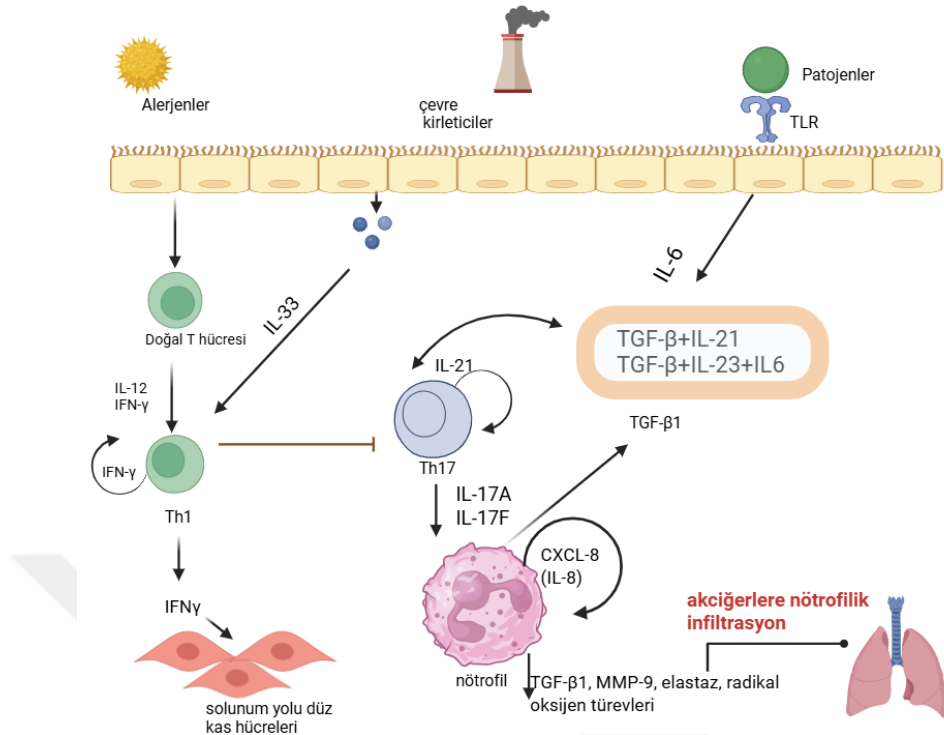
(Ig) E antikorlarını üretir (33). Üretilen IgE antikorlarının mast hücreleri yüzeyindeki IgE reseptörlerine bağlanması ile oluşan kompleks sonucunda, mast hücreleri granüllerinde bulunan monoaminler (histamin), proteoglikanlar (heparin, kondroitin sülfat), proteazlar (kimaz, triptaz, karboksipeptidaz 3, katepsin G), nöropeptidler (serotonin) gibi çeşitli maddeler salıverilmektedir. Ayrıca mast hücrelerinde prostoglandinler (PGD2, PGE2), lökotrienler (LTB4, LTC4, LTD4, LTE4), kemokinler (CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL10), büyüme faktörleri ve çeşitli sitokinler (IL-1 β , IL-6, IL-13) *de novo* sentezlenmektedir (34,35). Histamin, prostaglandin ve lökotrienler solunum yolu düz kasının kasılmasına, mikrovasküler ödem, solunum yolu mukus sekresyonunda artış ve inflamatuvar hücre infiltrasyonuna neden olmaktadır. LTC4, LTD4 ve LTE4 ise solunum yollarında konstriksiyona ve solunum yolunda duyarlılığa neden olmaktadır (36). *Native* CD4⁺ T- lenfositler dendritik hücre aktivasyonu sonucu IL-12 aracılığı ile Th1 lenfositlere farklılaşmaktadır. Efektör Th1 hücreler antiviral immüniteden sorumlu interferon (IFN)- γ üretir ve inflamatuvar yanıt oluşturur (Şekil 3) (27).



Şekil 3. Astım patogenezi (BioRender da çizildi)

2.7.1.3. Tip 2 Olmayan Astım (Nötrofilik Astım)

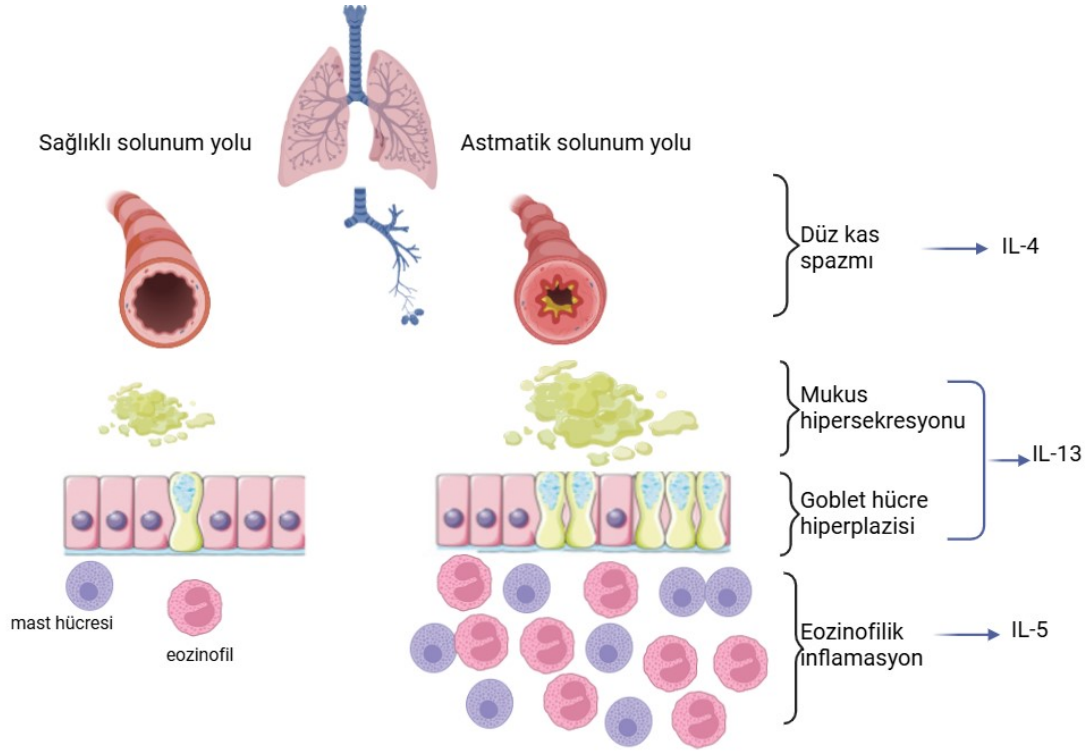
Şiddetli astım prognozu olan hastalarda, geç başlangıçlı astımda, obezite ve tütün kullanımı ile indüklenen astımda, kortikosteroid tedavisine dirençli astım fenotiplerinde ve astım alevlenmelerinde nötrofilik inflamasyonun baskın olduğu tespit edilmiştir (37,38). Astım tanılı hastalardan alınan örneklerde nötrofil sayısı hastalığın şiddeti ile pozitif korelasyon göstermektedir (39). Nötrofiller salgıladıkları kemotaktik faktörler ve granül proteinleri aracılığıyla mukus hipersekresyonu, solunum yolu *remodellingi* ve solunum yolunda hiperreaktiviteye, akciğer fonksiyonlarının azalmasına, monosit ve makrofajların inflamasyon bölgesine infiltrasyonuna sebep olmaktadır (37). Nötrofiller tarafından sentezlenen matriks metalloproteinaz (MMP)-9 ve nötrofil elastaz proteolitik enzimleri solunum yollarına hasar vererek CXCL-8 (interlökin-8) gibi kemoatraktanların sekresyonunu arttırmaktadır (40). CXCL-8 ayrıca nötrofillerin akciğere infiltrasyonuna aracılık etmektedir. Solunum yolu epitel hücreleri, T hücreleri ve makrofajların yanı sıra nötrofiller de CXCL-8 salgılayarak, solunum yolu nötrofil infiltrasyonuna katkıda bulunmaktadır. Nötrofiller ayrıca, onkostatın M sitokini gibi salgıladıkları diğer peptitler aracılığıyla epitel bariyer fonksiyonunun bozulmasına yol açmaktadır. Nötrofilik astım patogenezinde nötrofillerle Th17 hücreler arasındaki iletişim önemli rol oynamaktadır. Th17 sitokinlerinden biri olan IL-17 ile indüklenen T lenfositler ve nötrofiller CXCL-8 üretmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, IL-17'nin CXCL-8 sekresyonunu indükleyerek inflamasyon ile nötrofilik infiltrasyonun şiddetlenmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Epitel hücrelerden salıverilen IL-33'ün de Th17 hücre polarizasyonunu arttırarak, astım alevlenmelerinde nötrofilik inflamatuvar yanıtı neden olduğu bildirilmiştir (37). Nötrofilik astım patogenezinde Th17 inflamatuvar yanıtın yanı sıra Th1 inflamatuvar yanıt da gelişmektedir. Alerjenlere maruziyet sonrası ekspresyonları artan IL-12 ve IFN- γ sitokinleri doğal T hücreleri Th1 hücrelere farklılaştırmaktadır. Farklılaşan Th1 hücreler IFN- γ salıvererek Th1 farklılaşma sürecine katkıda bulunurken Th17 farklılaşmasını inhibe etmektedir. Nötrofillerden salıverilen TGF- β 1 sitokini IL-23, IL-21 veya IL-6 sitokini ile doğal T hücrelerinin Th17 hücrelere farklılaşmasını tetiklemektedir. Bu sitokinler ayrıca T hücrelerinde STAT3 ekspresyonunu indükleyerek IL-17A, IL-17F, IL-21 ve IL-22 sitokinlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır. Ekspresyonu artan IL-17A, IL-17F ve IL-22 bronşiyal düz kas hiperproliferasyonunu ve epitelial hiperplaziyi indüklemektedir (39, 41).



Şekil 4. Nötrofilik astım patogenezi (BioRender da çizildi)

2.7.1.4. Obezite İlişkili Astım

Obezite, adipöz dokudan makrofajlar, leptin, adiponektin, IL-1 β , IL-6, IFN- γ ve tümör nekrozis faktör (TNF)- α gibi birçok proinflamatuvar biyobelirteçlerin salıverildiği metabolik bir sendromdur. Birçok çalışmada, özellikle leptinin solunum yolu hiperreaktivitesine ve serum IgE seviyelerinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (42). Obeziteye eşlik eden inflamatuvar süreçlerin yanı sıra, obez bireylerde solunum yolu çapının akciğer hacmine göre orantısız olması gibi mekanik sebepler de zorlu ekspiratuvar hacim (FEV1), zorunlu vital kapasite (FVC), rezidüel hacim (RV) ve toplam akciğer kapasitesinde azalmaya sebep olmaktadır. Akciğer fonksiyonlarındaki azalmalar obez bireylerde astım gelişimi riskini artırmaktadır (43).



Şekil 5. Astımda sitokinler (BioRender da çizildi)

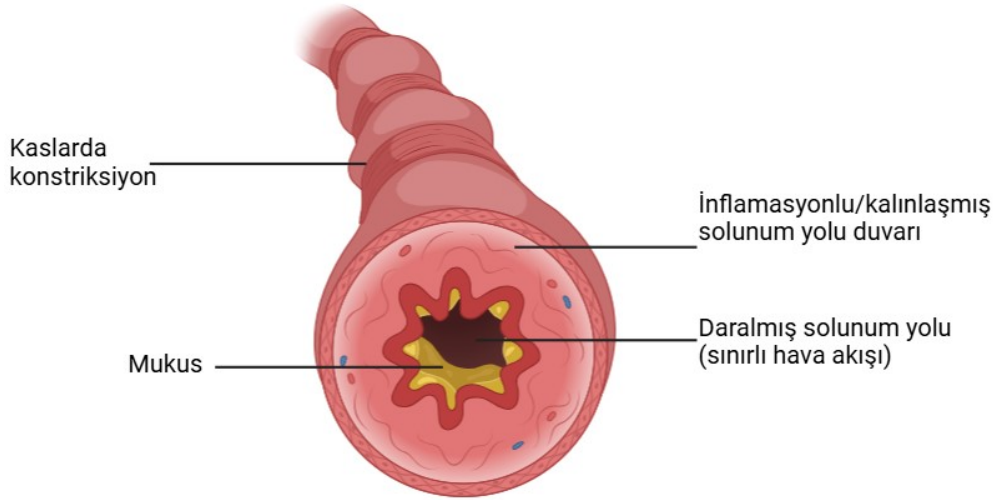
2.7.2. Astım Ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen türevleri (ROS) gibi oksidan etmenler ile antioksidan mekanizmalar arasındaki moleküler dengenin değişmesi sonucu redoks sinyalizasyonu ve moleküler hasar mekanizmalarının bozulmasıdır (45). Astımda, oksidatif stres regülasyon yollarında antioksidan enzimler olan süper oksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz, heme oksijenaz 1 (HO-1) enzim seviyelerinde azalma görülmektedir (46). Tedaviye dirençli astım tanılı hastalarda malondialdehit (MDA) ve protein oksidasyon belirteçlerinde anlamlı artış bildirilmiştir (47). Ercan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, astım tanılı çocukların plazma MDA seviyeleri sağlıklı çocuklara göre yüksek; indirgenmiş glutatyon seviyesi ise anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (48).

2.7.3. Astım ve Solunum Yolu *Remodellingi*

Astımda kronik inflamasyon sonucunda solunum yolunun proksimalinde ve distalinde solunum yolu *remodellingi* adı verilen irreversibl yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Solunum yolu *remodellingi* epitel hasarı, subepitelyal fibrozis, düz kas hücre hipertrofisi ve hiperplazisi, doku elastikiyetinin azalması ve bronkokonstriksiyona neden olur. Ayrıca epitel hücrelerin mezenşimal hücrelere dönüşümü, ekstraselüler matriks

birikimi, subepitelyal ödem, anjiyogenik faktörlerde artış, goblet hücre hiperplazisi ve mukus hipersekresyonu gelişir. Solunum yolu *remodellinginde* gözlemlenen histopatolojik değişiklikler retiküler bazal membran, lamina propria ve submukozada miyozin, α -aktin, tenaskin, fibronektin, desmin ve kolajen gibi maddelerin sentezinin artışı ile ilişkilidir (5). TGF- β , *platelet derived büyüme faktörü*, epidermal büyüme faktörü, vasküler endotelyal büyüme faktörü, kemokinler (CXCL2, CXCL3, CXCL8), IL-11 ve IL-17 profibrotik faktörler solunum yolunda kolajen sentezini indüklemektedir. Solunum yolunda tip I ve III kolajen birikimi subepitelyal fibrozise neden olur (36, 49, 50). Solunum yolu *remodellingine* neden olan başlıca mediyatör inflamatuvar hücrelerden salıverilen TGF- β 'dır. Astım patogenezinde önemli rol oynayan IL-4, IL-5 ve IL-13 bronşiyal epitel ve inflamatuvar hücrelerden TGF- β salıverilmesi sonucu subepitelyal ve peribronşiyal fibrozise neden olur (30). *Remodelling* ve solunum yolu çeperinin kalınlığı astım ile ilişkili mortalite oranı ile pozitif korelasyon göstermektedir (30,50).



Şekil 6. Solunum yolu *remodellingi* (BioRender da çizildi)

2.8. Tedavi

Astım tedavisinde hastalık belirtilerinin ve epizodik alevlenmelerin sıklığı ile şiddetinin azaltılması, hastanın yaşam kalitesinin iyileştirilmesi ve mortalitenin önlenmesi hedeflenir. Günümüzde astımın klinik tedavisi çoğunlukla semptomatiktir. Bazı ilaçlar ise hastalık patogenezi ile ilişkili solunum yolu inflamasyonunu hedeflemektedir. Güncel tedavi kılavuzlarına göre astımın küratif tedavisi mümkün değildir (52).

Astım ataklarında kullanılmak üzere etkisi hızlı başlayan ve kısa süren bronkodilatör etkili yatıştırıcı ilaçlar, solunum yolu inflamasyonunu azaltan veya ilerlemesini önleyen kontrol edici ilaçlar ve tedaviye dirençli ya da şiddetli astım hastalarında kullanılan ek tedavilerden oluşur (53). Buna göre bronkodilatasyona neden olan kısa süre etkili inhale beta-2 adrenerjik agonistler yatıştırıcı olarak kullanılırken, uzun etkili beta-2 adrenerjik agonistler, kortikosteroidler ve teofilin gibi ilaçlar kontrol edici ilaçları oluşturur. Tüm astım fenotipleri için basamaklı tedavide ilk seçenek inhale kortikosteroidlerdir. Şiddetli astım ataklarında ve tedaviye dirençli olgularda sistemik kortikosteroid ilaçlar kısa süreli tedavide kullanılmaktadır. Ancak solunum yolu inflamasyonuna nötrofilik inflamasyonun eşlik ettiği olgularda sistemik kortikosteroid tedavisinin de etkinliği sınırlıdır (54). Astım tedavisinde immunosupresan ilaçlar belirli oranda fayda sağlamakla beraber ciddi yan etkileri nedeniyle astım olgularında klinik kullanımları oldukça kısıtlıdır (55).

Beta-2 adrenerjik reseptör agonistleri solunum yolu düz kasında bulunan beta-2 reseptörler aracılı solunum yolu düz kasının gevşemesi sonucu bronkodilatasyon sağlar. Beta-2 adrenerjik reseptörler stimülatör stimülatör G proteini ile kenetli reseptörler olup, uyarılmaları ile adenilil siklaz aktive edilir. Adenilil siklaz aktivasyonu ile hücre içerisindeki siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyesi artar. Solunum yolu düz kasında cAMP düzeylerindeki artış, intraselüler kalsiyum içeriğinde azalmaya ve protein kinaz A (PKA) aktivasyonuna yol açar. PKA, miyozin hafif zincir fosfataz aktivasyonu ve miyozin hafif zincir kinaz inaktivasyonuna sebep olarak solunum yolu düz kasında gevşeme sağlar. İnhalasyonla lokal olarak kullanılabilmesi nedeniyle klinik kullanımda etkin ve güvenlidir. Beta-2 adrenerjik reseptör agonistleri; kısa etkili beta agonistler, uzun etkili beta agonistler ve ultra uzun etkili beta agonistler olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır (56).

Tablo 1. Klinik kullanımı olan beta-2 adrenerjik agonist ilaçlar (56).

Kısa etkili beta-2 agonistler	Salbutamol Terbutalin
Uzun etkili beta-2 agonistler	Salmeterol Formoterol Olodaterol Vilanterol
Ultra uzun etkili beta-2 agonistler	İndakaterol

Muskarinik tip 1 (M1) reseptör blokörleri antikolinergik ilaçlar da astımdaki fazla uyarılmış vagal tonu inhibe ederek astım tedavisinde bronkodilatör olarak tek başına ya da kombine olarak kullanılmaktadır. Kısa etkili M1 antagonistler ipratropium bromid, oksitopium bromid; uzun etkili M1 antagonistler tiotropium astım tedavisinde inhale kullanılan ajanlardır (2). Ksantin türevi teofilin ise astım tedavisinde kullanılan sistemik bronkodilatör ilaçtır. Teofilin astımdaki terapötik etkisini birkaç yolla göstermektedir. Hücre içinde fosfodiesteraz (PDE) inhibisyonu sonucu c AMP düzeylerini arttırarak bronkodilatasyona neden olur. Ayrıca, TNF- α ve lökotrienler gibi çeşitli proinflamatuvar faktörlerin üretimi ve salıverilmesini azaltarak antiinflamatuvar etkinlik gösterir. Adenozin reseptörleri üzerindeki antagonistik etki aracılığıyla bronşiyoller ve solunum yolu düz kaslarında dilatasyon sağlar. Kardiyak ve santral sinir sistemi yan etkilerinden dolayı tedavide teofilin kullanımı çok tercih edilmemekle birlikte, PDE4 inhibisyonu mekanizmasıyla etki eden bir diğer ilaç roflumilast tedavide kullanılmaktadır (55, 57). Montelukast, solunum yolu düz kası ve makrofajlarda bulunan lökotrien reseptörlerini antagonize ederek solunum yolu ödemi, düz kas konstriksiyonu ve hücrel metabolik değişiklikleri inhibe etmektedir. Lökotrien D4 ve E4 reseptörü sisteinil lökotrien reseptörlere yüksek affinite ile bağlanan montelukast, başlıca mast hücrelerinden salıverilen lökotrienlerin solunum yolundaki etkilerini azaltır (58). Makrolid grubu antibiyotik olan azitromisinin uzun süreli kullanımının astım tedavisinde ihtiyaç duyulan kortikosteroid dozunda azalma ve antiinflamatuvar etkinlik sağladığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (59). Biyolojik ajanlar, hedefe yönelik etkileri sayesinde klasik tedavilere kıyasla daha etkili tedavi seçenekleri sunarak birçok otoimmün ve inflamatuvar hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda özellikle şiddetli astım olgularında solunum yolu inflamasyonu ve hastalık patogeneğinde önemli rol oynayan IgE, sitokin (Th2 tip sitokinler) ve sitokin reseptörlerini hedefleyen monoklonal antikolar ve benzeri biyolojik tedavilerin kullanımı yaygınlaşmaktadır (60, 61). IL-9 hedefli monoklonal antikor MEDI-528'in ve TNF- α inhibitörlerinin, PGD2 hedefli ajanların astım tedavisinde kullanımı ile ilgili klinik çalışmalar devam etmektedir (62). Farmakoterapiye dirençli astım olgularında akciğere radyofrekansla elde edilen ısı enerjisinin uygulanmasını içeren bronşiyal termoplasti yöntemi de denenmektedir. Bronşiyal termoplasti, solunum yolu düz kas yoğunluğunu ve retiküler bazal membran kalınlığını azaltmaktadır (52, 60). Alerjik astım tedavisinde, sensitize edici alerjenin artan dozlarda hastaya uygulanması ile alerjene

duyarlılığı azaltmayı amaçlayan oral immunoterapi yöntemi de tercih edilen başka bir tedavi seçeneğidir (60).

Tablo 2. Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar

Farmakolojik sınıf	Etkin madde	Uygulama yolu
Kortikosteroidler	Budenosid,mometazon, siklesonid	Uzun süreli tedavide inhalasyon, ataklarda sistemik
$\beta 2$ agonistler	Salbutamol,formoterol, inkadaterol,vilanterol, olodaterol	İnhalasyon, oral
Lökotrien reseptör antagonistleri	Montelukast	Oral
Metilksantinler	Teofilin	Oral
Muskarinik kolinerjik antagonistler	İpratropium, tiotropium	İnhalasyon
Makrolid antibiyotikler	Azitromisin	Oral

Tablo 3. Astım tedavisinde kullanılan ve klinik araştırmaları devam eden biyolojik ajanlar

Hedef	Etkin madde
Dolaşımdaki serbest IgE Cε3 domaini	Omalizumab
IL-4 reseptör α alt ünite	Dupilumab AMG 317
IL-1R	Anakinra
IL-4α/IL-13α reseptör kompleksi	Lebrikizumab Tralokinumb
Anti-IL-5 immunomodülasyonu	Mepolizumab Reslizumab Benralizumab
IL-17 reseptörü	Brodalumab
Timik stromal lenfopoietin	Tezepelumab
PGD2	Fevipirant

2.9. Astımda Hücresel Metabolizma

Metabolizma hücredeki yaşamsal fonksiyonlar sırasında gerçekleşen kimyasal reaksiyonların tümünü kapsar. Buna göre hücredeki metabolik yollar hücre türü ve fonksiyonuna göre değişiklik gösterir. Yakın zamanda bazı çalışmalarda immün hücrelerin ve solunum yolu epitel hücrelerin glikoliz, yağ asidi oksidasyonu ve amino asit

metabolizması gibi biyokimyasal yollarındaki belirli değişikliklerin hücre aktivasyonu, farklılaşması ile hücresel fonksiyonları etkileyerek solunum yolu inflamasyonu ve remodellinge katkı sağladığı gösterilmiştir. Reaktif oksijen türevlerinin birikmesi sonucu gelişen oksidatif stres bronşiyal epitel hücre bütünlüğünü bozarak, adenozin trifosfat (ATP) üretimini sağlayan metabolik yollar baskılanırken, glikoz ve lipit metabolizması ile ilişkili yollar indüklenmektedir (64).

2.9.1. Glikoz Metabolizması

Solunum yolu epitel progenitör hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması için glikoz gerekir. Solunum yolunda hücreye glikoz alımını önleyen bir disregülasyon *Clara* hücrelerinin proliferasyonuna, siliya ve goblet hücrelerinin farklılaşmasına neden olarak epitel bütünlüğünün bozulmasına yol açar. Astım patogeneğinde T lenfositlerin ve diğer immün hücrelerin aracılık ettiği inflamasyon ve oksidatif stres hücre içinde ATP üretiminin oksidatif fosforilasyondan ziyade glikoza bağımlı olmasına neden olur. Aerobik koşullarda oksidatif fosforilasyonla sentezlenen ATP miktarı, glikolizle sentezlenen ATP miktarına kıyasla yaklaşık 18 kat fazladır. Buna göre oksidatif fosforilasyonla enerji üretimi verimi daha yüksektir. Glikoliz sırasında glikozdan laktik asit üretilmektedir. Ancak kanser hücrelerinde ve bazı inflamatuvar durumlarda aerobik koşullar altında dahi ATP üretimi glikolize bağımlı gerçekleşmektedir. Hücre içi metabolik yollarındaki bu değişiklik ‘aerobik glikoliz’ ya da ‘Warburg etkisi’ olarak tanımlanmaktadır. Astımlı hastalardan elde edilen bronşiyal epitel hücrelerinde ATP üretimi glikolize bağımlı gerçekleştiği için laktat düzeyleri yüksek bulunmuştur (64). Literatürde mevcut prekliniک çalışmalarda Th1, Th2 ve Th17 gibi efektör T lenfositlerde ATP üretimi çoğunlukla glikoliz aracılığı ile gerçekleşirken, regülatör T hücrelerde lipit metabolizmasına bağımlıdır. İnflamatuvar hücrelerde glukoz taşıyıcısı tip I (GLUT1) ekspresyonunun indüklenmesi ile hücre içine glikoz girişinin artması T lenfosit proliferasyonu ile proinflamatuvar sitokin üretimini artırmaktadır (65).

2.9.2. Lipit Metabolizması

İmmün sistem hücrelerindeki lipit metabolizması hücresel fonksiyonları etkilemektedir. Hücrede stearoil koenzim A desaturaz tekli doymamış yağ asitlerinin biyosenteğinde görevlidir. Astımlı hastalardan elde edilen bronşiyal örneklerde bu enzimin ekspresyonu düşük bulunmuştur. Ayrıca astımda stearoil koenzim A disfonksiyonu da gelişmektedir. Benzer şekilde astım olgularında asetil karboksilaz beta ile yağ asidi

biyosentezinden sorumlu diğer bazı enzimlerin disfonksiyonu solunum yolu hiperreaktivitesi ve antiviral immün yanıtın azalması ile ilişkilendirilmiştir (66). Sistemik dolaşımda bulunan dendritik hücre vb. antijen sunan hücrelerin immunojenik aktivasyonu lipid metabolizmasındaki değişikliklerle ilişkili olarak regüle edilmektedir. Farklı dendritik hücre fenotiplerinde aktive olan metabolik yolların değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bazal durumda veya aktive olmamış dendritik hücreler mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla ATP üretmektedir. Ancak, infeksiyöz ajanlar veya türevleri ile TLR'lerin uyarılması sonucu hücrede glikolitik yollar aktive olur ve hücrenin immunolojik aktivitesi artar. Buna göre yağ asidi metabolizmasındaki değişiklikler makrofajların aktivasyonunu ve farklılaşmasını indükleyerek proinflamatuvar sitokin salıverilmesine yol açar (67). Ayrıca hücrede araşidonik asit türevi yağ asitleri prostaglandin ve lökotrienlere dönüşerek eozinofillerin apoptozisini engelleyerek eozinofiliye neden olur (64,68).

2.9.3. Aminoasit Metabolizması

Astımda solunum yolu inflamasyonu ve *remodelling* ile ilişkilendirilen aminoasitler glutamin, L-tirozin, metionin, L-arjinin, L-sitrülin, hidrokspirolin ve prolindir (69). Alerjik astım patogenezi ile ilişkili Th2 tip inflamatuvar yanıtta hücre içi arjinin metabolizması önemli rol oynamaktadır. Astım hastalarında indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve arjinaz enzimlerinin disregülasyonu arjinin ve nitrik oksit düzeylerinin kontrole göre değişmesine sebep olurken, kolajenin ana bileşeni olan hidrokspirolin ve prolin düzeylerindeki değişikliklerin solunum yolu *remodellingi* ile ilgili olduğu önerilmiştir (64,69). Astım hastaları ve sağlıklı gönüllülerden izole edilen periferik kan örneklerinden yapılan metabolomik analizlerde treonin, valin, izolösin ve glutamat düzeyleri anlamlı şekilde farklı bulunmuştur (70).

2.10. Deneysel Astım Modelleri

Deneysel astım modelleri hastalık patogenezinin incelenmesinde veya terapötik hedeflerin, ilaç adayı moleküllerin prelinik değerlendirilmesinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Deneysel astım modellerinde hastalık patogenezinde rol oynayan solunum yolu inflamasyonu vb. faktörler taklit edilmeye çalışılır. Hücre kültüründe bronşiyal epitel hücreleri ile oluşturulan in vitro deneysel modellerin yanı sıra (71), literatürde fare, sıçan ve kobay gibi rodentlerde oluşturulan çok sayıda farklı in vivo deneysel model mevcuttur (72). Astım patogenezinin altında yatan moleküler yolları, astımın klinik özelliklerini ve epizodik alevlenmeleri tüm yönleriyle tam olarak yansıtan deneysel astım modeli

bulunmamaktadır. Literatürde tanımlanmış deneysel modellerde çeşitli alerjenler, iritan madde veya virüs ile bakteri bileşeni aracılığı ile solunum yolu inflamasyonu indüklenerek klinik astımın yansıtılması amaçlanmaktadır.

2.10.1. Alerjik (Atopik) Astım Modeli

Tavuk yumurtasının beyaz kısmında bulunan ovalbumin proteini (73,74), ev tozu akarı (75) veya fungal ekstraktlar (76) gibi alerjenlerle deney hayvanlarında alerjik solunum yolu inflamasyonu modeli oluşturulabilmektedir. Bu deneysel modellerde sensitizasyon fazında deney hayvanına alerjen uygulaması yapılarak immün sistem aktive edilir. Ovalbumin (OVA) gibi küçük molekül yapısında alerjenlerin immün sistemi aktive edebilmesi için alüminyum hidroksit ($Al(OH)_3$) gibi maddeler haptan olarak kullanılır ve deney hayvanına eş zamanlı uygulanır. Bu aşamada antijen sunan hücreler ve diğer inflamatuvar hücreler tarafından salıverilen sitokinler T lenfosit aktivasyonuna ve efektör T lenfosit farklılaşmasına sebep olur. Ardından aktive olan B lenfositler tarafından IgE vb. antikolar üretilerek sistemik dolaşıma salıverilir. Sataşma fazı ise görece daha yüksek dozda alerjen deney hayvanına sistemik ya da lokal olarak uygulanır. Sensitizasyon fazında immün sistemi aktive edilmiş deney hayvanına sataşma fazında alerjen uygulaması solunum yolu inflamasyonuna sebep olur. Deney hayvanlarının solunum yolu ve akciğer dokularından izole edilen biyolojik örneklerde IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi sitokinler ile IgE düzeyi artar, efektör Th2 lenfosit farklılaşması ve eozinofil infiltrasyonu görülür. Goblet hücre hiperplazisi ve mukus hipersekresyonu meydana gelir. Sonuç olarak solunum yolunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında sitokin düzeyi artışı, bronşiyal hiperreaktivite ile daha uzun süreli modellerde solunum yolu remodellingi gözlenir (77). Solunum yoluna intratrakeal trimellitik anhidrit gibi iritan maddelerin uygulanması ile mesleki maruziyetle indüklenen deneysel astım modeli oluşturulmaktadır. Aynı amaçla tolüen diizosiyanat da kullanılmaktadır (78). Çalışmalarda astım patogenezinin nötrofil infiltrasyonun katkı sağladığı ve efektör Th1 ve Th17 lenfositlerin astımda nötrofilik hücre aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Diğer bazı deneysel modellerde ise lipopolisakkarit (LPS) veya *polyinosinic-polycytidylic acid* vb. maddelerle TLR aktivasyonu aracılığı ile solunum yolu inflamasyonu indüklenmektedir. LPS gram negatif bakterilerin dış membranında yer alan endotoksin bileşenidir. LPS, TLR4 reseptörünün agonistidir; epitel hücre, monositler, makrofajlar,

nötrofiller ve dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunan TLR4'leri aktive ederek doğal immün sistemi indükler. Ayrıca Th1 aracılı nötrofilik infiltrasyona neden olur (79).

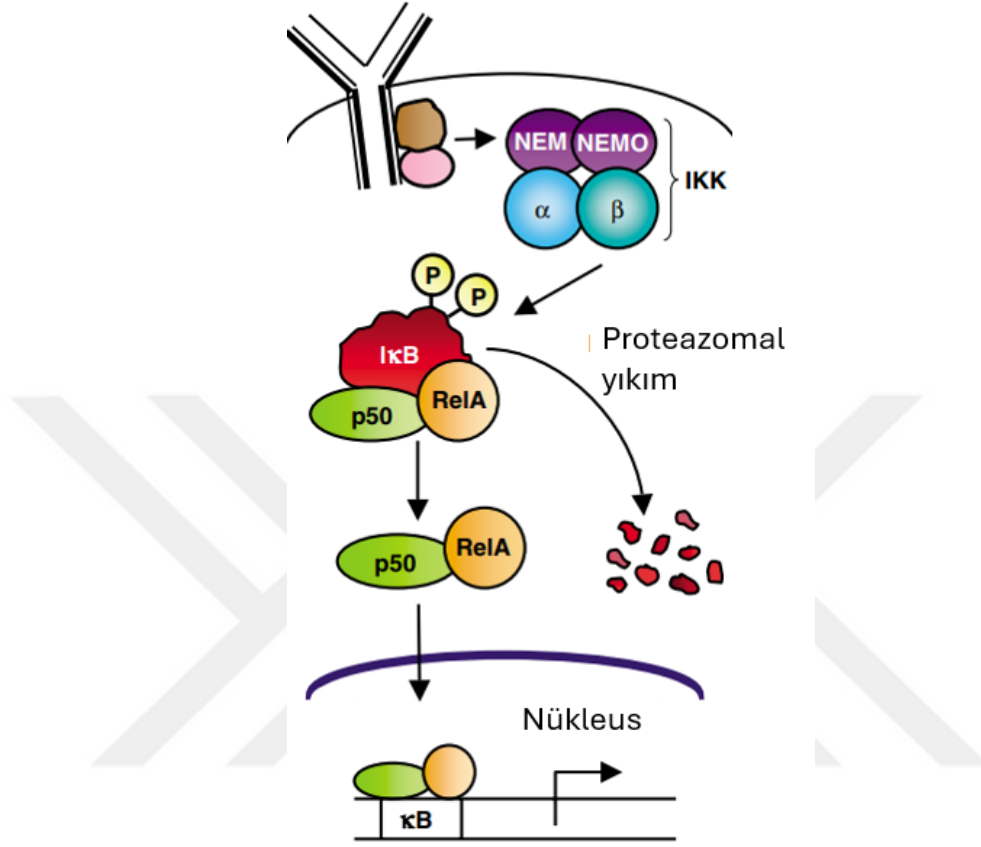
2.10.2. OVA ve LPS Modeli

Deneysel hayvan çalışmalarında, OVA-LPS kombinasyonunun uygulandığı mürin modellerinde Th2 aracılı eozinofili ve pulmoner nötrofili geliştiği gösterilmiştir. OVA-LPS kombine uygulanan sıçanlarda akciğer fonksiyon parametreleri (tidal volüm, respiratuar oran) modülasyonu sadece OVA ya da sadece LPS uygulanan sıçanlarla karşılaştırıldığında OVA-LPS'in daha şiddetli bronkokonstriksiyona sebep olduğu bildirilmiştir. OVA-LPS uygulanan sıçanlardan alınan BAL örneklerinde, tekli uygulama yapılan sıçanlara göre eozinofil, nötrofil, lensofit sayısında artış rapor edilmiştir. OVA-LPS uygulaması inflamatuvar sitokinlerin (IL-4, IL-5 ve IL-13) seviyelerinde sadece OVA ya da sadece LPS gruplarına göre anlamlı artış sağlamıştır. Thakur ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, OVA-LPS uygulanan sıçanların akciğerlerinde yapılan histopatolojik incelemelerde artmış epitelyal proliferasyon, düz kas hiperplazisi, artmış lökosit infiltrasyonu gösterilmiştir (6).

2.11. Nükleer Faktör Kappa B (Nf- κ B) Yolağı

Birçok farklı memeli hücre türünde NF- κ B yolağı bulunmaktadır. Sinyal yolağı inaktif haldeyken NF- κ B, inhibitör protein I κ B ile kompleks halinde bulunur. Sinyal yolağı aktive edilince bir genetik transkripsiyon faktörü olan NF- κ B hücre çekirdeğine transloke olarak proinflamatuvar sitokin, kemokin, adezyon molekülü, büyüme faktörü ve enzimin ekspresyonunu indükler (80). NF- κ B sinyal yolağı doğal bağışıklık sistemini aktive eden bakteriyel veya viral patojenler, LPS, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri veya ultraviyole ışın tarafından aktive edilir (81). Nf- κ B/Rel ailesi beş transkripsiyon faktöründen oluşmaktadır: c-Rel, Nf- κ B1 (p50/p105), Nf- κ B2 (p52/p100), RelA (p65) ve RelB (4-12). Hücrede Nf- κ B sinyalizasyonu kanonik ve kanonik olmayan iki ayrı yolak ile seyreder. Kanonik olan ve olmayan yolaklar IKK α veya IKK β kinaz alt birimleri ile regülatör alt birim (IKK γ)'nın farklı kombinasyonlarını kullanır. Patojenler, LPS, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler kanonik NF- κ B sinyal yolağını aktive ederken; lenfotoksin B, CD40 ligand ve B lenfosit aktivatörü faktörlerinin etkilerine kanonik olmayan yolak aracılık eder (82). TLR'lerin aktivasyonu IKK kompleksini indükler. IKK, IKK β 'yı iki farklı serin bölgesinden fosforile ederek

ubikitinasyonuna ve proteazomlar tarafından yıkılmasına neden olur. Serbest haldeki NF- κ B çekirdeğe transloke olur (83-85).



Şekil 7. NF- κ B kanonikal yolağı (Gilmore'dan, 84).

2.11.1. Astım ve Nf- κ B Yolağı

Astımlı hastalardan izole edilen bronşiyal epitel hücrelerde NF- κ B ekspresyonu kontrole göre yüksek bulunmuştur (86). Mast hücrelerinden salıverilen histamin solunum yolu hücrelerinde NF- κ B aktivasyonu aracılığı ile TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, monosit kemoatraktan protein-1, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükleyerek kronik solunum yolu inflamasyonu ve obstrüksiyona neden olur (87). Farelerde OVA ile indüklenen astım modelinde NF- κ B inhibitörü dehidroksimetileopksi kinomisin tedavisi BAL sıvısında Th2 sitokin düzeyini, eozinofilik solunum yolu inflamasyonunu ve solunum yolu hiperreaktivitesini azaltmıştır (88). Tully ve arkadaşları tarafından evsel toz akarı ile bronşiyal epitel hücre hattında *in vitro*, farelerde ise *in vivo* deneysel astım modeli oluşturulmuştur. Çalışmada astım

patogenezinde *CC10-IκB* geninin silinmesi ile NF-κB aktivasyonunun rolü incelenmiştir. NF-κB aktivasyonu ile ilişkili genin silinmesi sonucu eozinofilik inflamasyon azalırken, nötrofilik inflamasyon gelişmemiştir (89). OVA ile indüklenen deneysel fare astım modelinde, NF-κB inhibisyonu ile solunum yolu duyarlılığında iyileşme, serum IgE seviyesinde azalma, akciğer dokusu ve BAL sıvısında IL-5, IL-13 sitokin seviyesinde azalma kaydedilmiştir (90). Astım atağı nedeniyle ölen insanlardan izole edilen akciğer biyopsi örneklerinde yapılan analizlerde, sağlıklı bireylere kıyasla bronşiyal epitelyumda sitoplazmik ve nükleer p65 oranı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (91).

2.12. Keap1/Nrf2/HO-1 Yolağı

Nükleer faktör eritroid-2 ilişkili faktör 2 (Nrf2), stres ile indüklenen cap ‘n’ collar transkripsiyon faktörleri grubuna aittir. Nrf2, aktivasyonundan sorumlu bölgesinde lösin ve çinko bulundurmaktadır. Maf proteinleri ile heterodimerizasyon oluşturan Nrf2, oksidatif strese karşı hemeoksijenaz-1 (HO-1) regülasyonunu sağlayarak endojen antioksidan mekanizmalarda rol oynayan temel transkripsiyon faktörüdür (92,93). Nrf2, altı fonksiyonel Neh bölgesinden (Neh 1-6) oluşmaktadır. Bazal koşullarda Neh2 bölgesinin amino-terminal ucundan Kelch-like associated protein (Keap-1) ile bağlı bulunmaktadır. Bazal durumda Keap-1 ile bağlı haldeki Nrf2 ubiquitinlenerek yıkılır. Oksidatif stres durumunda ise Keap-1 kompleksinin konformasyonel değişikliğe uğraması Nrf2’nin stabilize olmasını sağlar (94). Çekirdeğe transloke olan Nrf2, Maf proteinleri ile heterodimerizasyon oluşturur. Maf-Nrf2 kompleksi antioksidan yanıt elemanlarına bağlanır ve genetik transkripsiyonu (HO-1, NAPH kinon oksidoredüktaz, tioredoksin redüktaz 1, glutatyon peroksidaz ve faz II detoksifikasyon enzimleri) aktive eder (94-96). Nrf2’nin hücre içinde redoks reaksiyonlarının regülasyonu, ksenobiyotiklerin metabolizması, protein homeostazı, DNA onarımı, karbonhidrat ve lipid metabolizması, demir homeostazi ile mitokondriyal fonksiyonları ile ilişkili 250 farkı genin transkripsiyonunu regüle ettiği gösterilmiştir (97).

2.12.1. Astım ve Keap1/Nrf2/HO-1 Yolağı

Astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, akut respiratuvar sendrom ve pulmoner fibrozis gibi kronik solunum yolu hastalıklarının patogenezinde hücre içi mekanizmalarda Nrf2’nin rolü önemlidir. Preklinik kronik solunum yolu hastalığı modellerinde Nrf2 indükleyici ajanlar ve Nrf2 geni silinen deney hayvanları ile elde edilen sonuçlar Nrf2’nin potansiyel bir terapötik hedef olduğunu göstermiştir (98). Çalışmalarda Nrf2 aktivasyonu,

antijen maruziyeti sonucu gelişen eozinofilik inflamasyonu ve solunum yolu duyarlılığını azaltarak deneysel astım parametrelerinde iyileşme sağlamaktadır (99). Deneysel astım modellerinde Nrf2 aktivatörü tedavisi IL-4, IL-5, IL-13 ve eotaksin ekspresyonunu, BAL sıvısında inflamatuvar hücre sayısını, IgE düzeyini ve akciğer dokusunda histopatolojik değişiklikleri azaltmıştır (100). Benzer şekilde Nrf2 geni silinmiş farelerde OVA uygulaması sonucu BAL sıvısı örneklerinde inflamatuvar hücre aktivasyonu ve hücre infiltrasyonu artmıştır (101). Preklinik nötrofilik inflamasyon modellerinde ise Nrf2 geninin silinmesi sonucu eozinofilide azalma, nötrofil infiltrasyonunda ise artış meydana gelmiştir. Ayrıca Th2 ve Th17 hücre sitokinleri ile IL-6, TNF- α ve IFN- γ sekresyonu artarken, solunum yolu duyarlılığında anlamlı değişiklik saptanmamıştır (102). Şiddetli ve orta şiddetli astım tanılı çocuklarla yapılan çalışmada, şiddetli astım hastalığında Nrf2 ekspresyonunun arttığı ancak Nrf2 aktivasyonunun ve Keap1 protein seviyesinin gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği kaydedilmiştir (103).

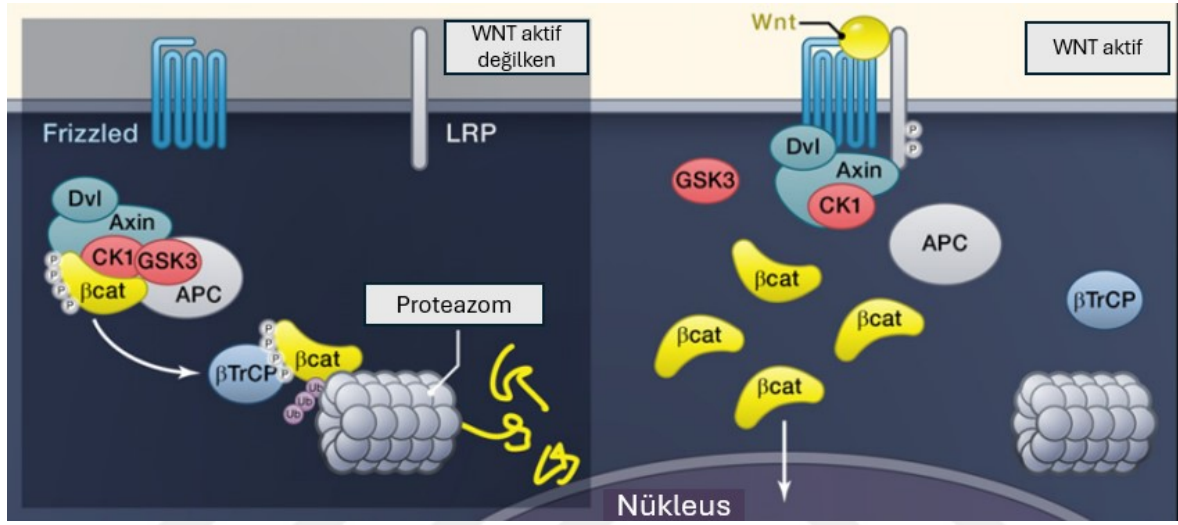
2.13. Wnt/ β -katenin Yolağı

Wnt yolağı ile ilişkili Wingless (Wnt) geni ilk kez *Drosophila melanogaster*'in mutagenesis görüntülemesi sırasında keşfedilmiştir ve int-1 olarak adlandırılmıştır (104,105). Wnt sinyal yolağı hücre içinde β -katenin bağımlı (kanonikal) ve β -kateninden bağımsız (kanonikal olmayan) Wnt yolaklarından oluşmaktadır. Kanonikal Wnt yolağı Wnt ligandlarının Frizzled reseptörü ile düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein 5/6 (LRP5/6) ko-reseptörü aktive etmesi sonucu β -katenin yıkım kompleksini inhibe eder ve sonuçta β -katenin çekirdeğe transloke olur (106). Wnt yolağı β -katenin aktivasyonu yoluyla hücre proliferasyonu ve farklılaşması, embriyogenezis, fibrozis ve inflamasyonla ilişkili genetik transkripsiyonu regüle eder. Kanonikal olmayan Wnt yolağı ise hücre içi kalsiyum iyonlarının konsantrasyonlarında bazı değişikliklere, c-Jun N-terminal kinaz (JNK), kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII), Rac veya protein kinaz C (PKC) aktivasyonuna neden olmaktadır. Kanonikal yolak başlıca hücre proliferasyonunu regüle ederken, kanonikal olmayan Wnt yolağı hücre migrasyonunda önemlidir (107). Kanonikal ile kanonikal olmayan Wnt sinyal yolağı hücre içinde benzer fonksiyonları aktive edebilirken, iki yolak arasında negatif düzenleme de mevcuttur (108). Wnt sinyal yolağı memeli canlılarda 19 farklı üyeden oluşan, 350-400 aminoasit uzunluğunda, glikoprotein yapısında endojen agonistler tarafından aktive edilir (109). Wnt ligandları hücre içinde ribozomda sentez edildiklerinde 40 kDa büyüklüğünde aminoasit

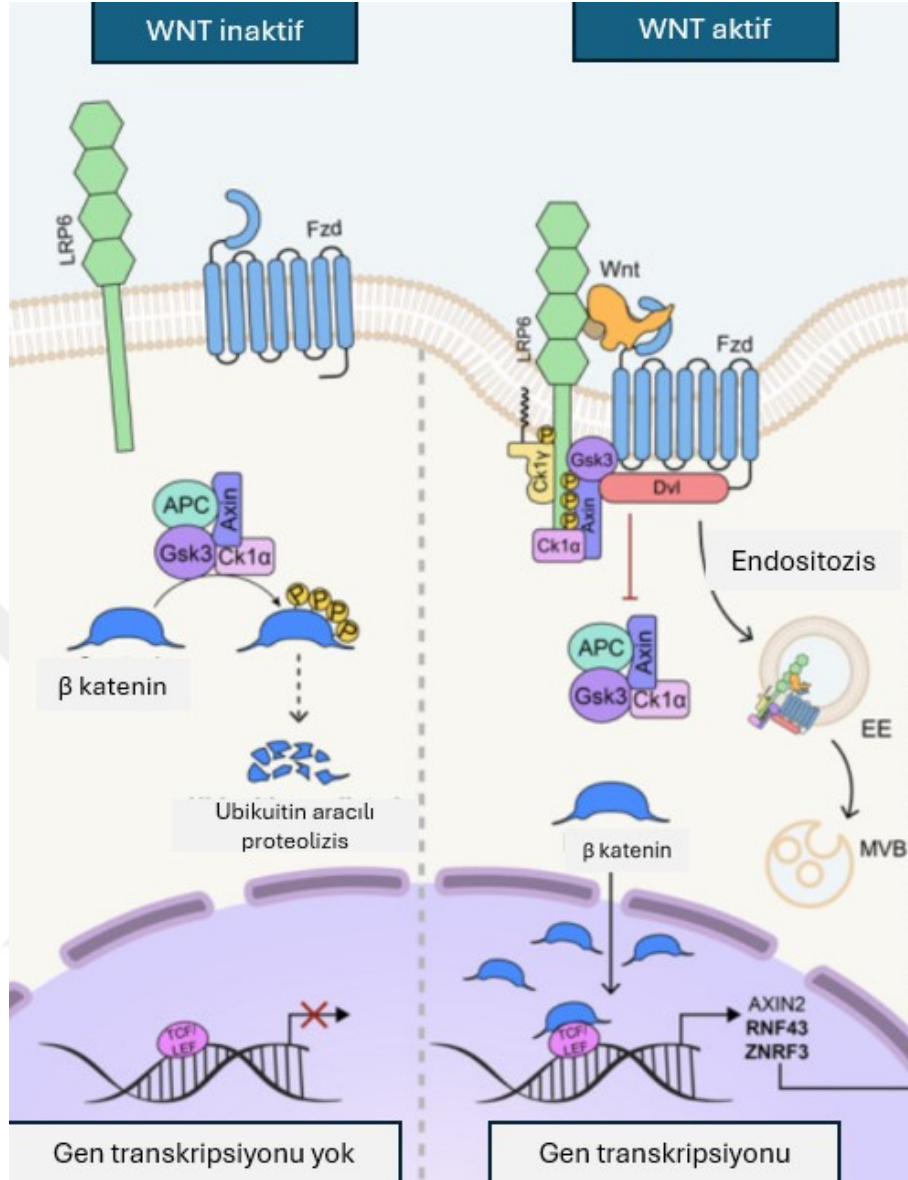
zinciri yapısındadır. Sonrasında endoplazmik retikulumla taşınarak bu yapıya palmitoil transferaz enzimi tarafından palmitoleik asit eklenerek posttranslasyonel modifikasyona uğrarlar. Bazı Wnt ligandlarına ise glikolizasyon ile posttranslasyonel modifikasyon uygulanmaktadır. Wnt ligandlarına palmitoleik asit eklenmesi yapıya lipofilik özellik kazandırmaktadır. Ayrıca ligandları sentezi, yapısal özelliklerinin korunması ve fonksiyonları için de gereklidir. Posttranslasyonel modifikasyonlardan sonra golgi cisimciğine taşınarak vezikül içine alınır ve ekstraselüler ortama salıverilir (110-112). Wnt-1, Wnt-2, Wnt-3, Wnt-3A, Wnt-7 ve Wnt-8 çoğunlukla kanonik yolağı; Wnt-4, Wnt-5A, Wnt-5B, Wnt-11 ise kanonik olmayan yolağı tercih etmektedir (113). Frizzled reseptörü G protein kenetli reseptör ailesinden olup, 7-transmembran yapısına ve düşük nanomolar konsantrasyonlarda bile Wnt bağlama duyarlılığına sahip N-terminal sisteinden zengin bölgeye (CRD) ye sahiptir. 10 adet Frizzled reseptörü tanımlanmıştır (110,114). Wnt sinyal yolağı aktive edilmediğinde sitozoldeki β -katenin, aksin, adenomatöz poliposis koli (APC), glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) ve kazein kinaz-1 (CK-1)'den oluşan yıkım kompleksi tarafından inhibe edilerek yıkılmaktadır. GSK-3'ün N terminal ucu aracılığıyla Ser33, Ser37 ve Thr41 aminoasitleri ve CK-1 tarafından Ser45 aminoasitleri fosforillenir ve fosforillenen β katenin E3-ligaz β -TrCP tarafından ubiquinizasyona uğrayarak yıkılır. Ortamda Wnt ligandları olduğunda Wnt yolağı aktive olur. Frizzled reseptörü ve LRP5/6 dimerize olur. LRP'nin sitoplazmik kuyruğu ve Dishevelled proteini fosforillenir. Fosforillenen Dishevelled proteini Frizzled reseptörünün sitoplazmik kısmına bağlanır. Fosforillenen LRP kısmı ise aksin ile etkileşerek GSK-3 β ve CK-1'i inhibe eder. Fosforile olmayan β -katenin sitozolde stabilize edilir ve Nup62, Nap153 ve RANBP2 nükleoproteinlerine bağlanarak nükleusa transloke olup uğrayan β -katenin T hücre faktör/lenfoid arttırıcı faktör ailesinin (TCFs/LEFs) transkripsiyon faktörlerine bağlanır. Bağlanma sonrasında bu transkripsiyon faktörleri transkripsiyonel aktivatörlere dönüşür ve c-myc, siklin D1, survivin gibi çeşitli genlerin ekspresyonunu sağlar. TCF/LEFs ailesinin LEF1, TCF1, TCF3 ve TCF4 olmak üzere şimdiye kadar dört üyesi tanımlanmıştır (115-119).

Kanonik Wnt sinyal yolağındaki mutasyonlar embriyogenezde kemik yoğunluğu ve yapısında bozulmalar, doğum defektleri, malignensi, tip II diyabet, inflamatuvar ve fibrotik solunum yolu hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkili bulunmuştur (120, 121). Kanonik Wnt yolağında bulunan sklerostin, Dickkopf 1-3, frizzled ilişkili protein 1 (Sfrp-1) β -kateninin çekirdeğe translokasyonunu engelleyerek veya Wnt proteinlerinin

reseptör/koreseptörlerle etkileşimini azaltarak Wnt yolağını inhibe eder (122). Wnt ligandlarını hedefleyen monoklonal antikorlar, LRP6 inhibitörleri, β -katenin yıkım kompleksini stabilize eden bileşikler (XAV939), β -kateninin transkripsiyon faktörü olarak etkisini inhibe eden bileşikler (ICG-001) etkinlik ve güvenilirlik yönünden çeşitli prelinik ve klinik çalışmalarda araştırılmaktadır. Ancak henüz klinik kullanımları Amerika Birleşik Devletleri İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) tarafından onaylanmamıştır (123, 124).



Şekil 8. Wnt/ β -katenin yolağı (Clevers'den, 125).



Şekil 9. Wnt/ β - katenin yolağı aktivasyonu ve inaktivasyon (Colozza'dan, 126).

2.13.1. Astım ve Wnt/ β -katenin Yolağı

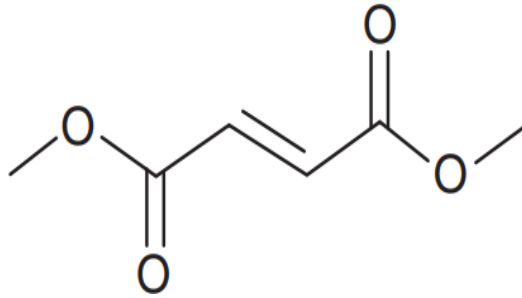
Wnt/ β -katenin yolağı embriyogenezde fetal akciğer gelişimi ve hücre farklılaşmasında önemlidir. Farklı Wnt ligandları farklı hücre tiplerinde eksprese edilmektedir. Örneğin fetal akciğer dokusunda Wnt-2, siliyal epitel hücrelerde ve alveolar tip 2 hücrelerde Wnt-3, trakeada Wnt-4, mezenkimal ve solunum yolu epitel hücrelerinde Wnt-5A eksprese edilmektedir (127). Astımla ilişkili solunum yolu fonksiyonlarının azalması Wnt inhibitör faktör (WIF) ve Wnt-1 indüklenebilir sinyal yolağı proteini (WISP) genlerindeki mutasyonlarla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (128). Astım hastalarından elde edilen bronşiyal biyopsi örneklerinde Th2 tip inflamasyonun Wnt-5A seviyesi ile pozitif

korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (129). Farede OVA ile indüklenen deneysel astım modelinde, deksametazonun Wnt-7B, LRP5, β -katenin ve siklinD1 düzeylerini artırarak solunum yolunda doku onarımını inhibe ettiği gösterilmiştir (130). Sağlıklı bireyler ve astım hastalarından elde edilen tükürük örnekleri ile yapılan bir çalışmada, astım hastalarında Wnt-7A ve Wnt-5A ekspresyonu ve β -katenin düzeyi yüksek bulunmuş, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivitesinin arttığı ileri sürülmüştür. Ayrıca *silencing* ribonükleik asit (RNA) ile Wnt/ β -katenin sinyal yolağının inhibisyonu akciğer örneklerinde kolajen sentezi ve subepitelyal fibrozisi azaltmıştır (131). OVA ile deneysel astım modeli uygulanan fare akciğer dokusunda Wnt-5A ve β -katenin düzeyleri yüksek bulunmuştur. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının D vitamini ile inhibe edilmesi akciğer dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrozisi azaltmıştır (115). Toluen diizosiyanat ile indüklenen deneysel astım modelinde, XAV-939 ve ICG-001 uygulaması solunum yolu *remodellingi* ile ilişkili matriks metalloproteinaz (MMP)-2, MMP-9, fibronektin, TGF- β 1 ve vasküler endotelial büyüme faktörü düzeylerini azaltmıştır. Ayrıca akciğer dokusunda yapılan histopatolojik analizlerde kolajen birikimi ve goblet hücre hiperplazisi düşük bulunmuştur. XAV-939 ve ICG-001 uygulanan farelerden alınan BAL sıvısı örneklerinde IFN- γ ve IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi Th2 tip sitokinlerin düzeyi ile nötrofil ve eozinofil sayıları düşük bulunmuştur (132). Jia ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, sıçanlarda OVA ile indüklenen astım modelinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibitörü rekombinant Dickkopf ilişkili protein I uygulaması sonucu akciğer dokusunda kolajen birikimi ve α -düz kas aktin yoğunluğu azalmıştır. OVA uygulanan sıçanlarda β -katenin, fosforile β -katenin, *c-myc*, *siklin D1* ekspresyonu kontrole göre yüksek bulunmuştur (133). Diğer inflamatuvar solunum yolu hastalıklarını yansıtan deneysel modellerde ise Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivitesi ile ilgili farklı sonuçlar elde edilmiştir. Chen ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada, deneysel akciğer hasarı modelinde GSK-3 β düzeyinin arttığı, β -katenin düzeyinin ise azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada SB216763 ile GSK-3 β 'nın inhibisyonu ile Wnt/ β -katenin yolağının aktive edilmesi sonucu β -katenin ve *siklin D1* düzeyleri artmıştır. Ayrıca BAL sıvı örneklerinde IL-1 β , IL-6, TNF- α ve proapoptotik Bax protein düzeyleri azalmıştır. Bununla birlikte kapiller permeabilite, ödem, konjesyon ve alveolar hasar azalmış; akciğerde doku onarımı artmıştır (134). Kronik obstrüktif akciğer hastalarından alınan akciğer biyopsi örneklerinde β -katenin, Frizzled reseptör 4, GSK-3 β ekspresyonu düşük bulunmuş ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivasyonunun azaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışma

kapsamında insan bronşiyal epitel hücrelerin sigara ekstraktına maruz bırakılması ile yapılan analizlerde Wnt-3A, Frizzled reseptör 1, Frizzled reseptör 4, β -katenin, TCF4, siklin D1, MMP-2, MMP-9 seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. SB216763 uygulanması ile Wnt yolağının aktive edilmesi β -kateninin çekirdeğe translokasyonunu arttırarak TNF- α ve IL-1 β ekspresyonlarını azaltmıştır (135).

2.14. Dimetil Fumarat

Dimetil fumarat (DMF), fumarik asite karboksilik asit eklenmesi ile oluşan ester türevidir. Oral yoldan uygulanmasını takiben esterazlar aracılığı ile aktif monometil fumarat metabolitine dönüşen bir ön ilaçtır. DMF antioksidan ve antiinflamatuvar etkili bir ilaçtır. FDA tarafından multiple sklerozis (MS) ve psöriazis tedavisinde klinik kullanımı onaylanmıştır (136). Oral uygulanan DMF hızlı bir şekilde metabolize edildiği için sistemik dolaşımında analitik yöntemlerle tespit edilmesi zordur. Oral dozun ancak %0.1'inden daha azı idrarda tespit edilebilmektedir (137). Molekül ağırlığı 144.13 g/mol, erime sıcaklığı 102-106 °C'dir. Suda ve su: etil alkol karışımında çözünürlüğü azdır (138). DMF'nin yarı ömrü 12 dakikadır, ancak monometil fumarat metaboliti serum proteinlerine %30-50 oranında bağlandığı için aktif metabolitin yarı ömrü (36 saat) daha uzundur (139).



Şekil 10. DMF kimyasal yapısı (Papadopoulou'dan, 139)

DMF, fumarik asite metabolize olarak hücre içinde sitrik asit döngüsüne girmektedir (7). Çalışmalarda DMF'nin Nrf-2 aktivasyonunu sağlayarak glutatyon (GSH) üretimini stimüle ettiği ve ROS ile indüklenen sitotoksisteyi azalttığı önerilmiştir. Ayrıca DMF'nin antiinflamatuvar etkileri Nf- κ B downregülasyonu ve antiapoptotik protein Bcl-2 inhibisyonuna da atfedilmiştir (140). Zhen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, renal iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan farelere DMF tedavisi (25 mg/kg, per oral)

uygulandığında Nrf2, HO-1, NADPH kinin oksidoredüktaz düzeyleri artmış, renal hasar ise azalmıştır. Buna göre DMF'nin terapötik etkilerine Nrf2'nin aracılık ettiği ileri sürülmüştür (141). Ovalbumin ile astım modeli oluşturulan deneysel çalışmada, DMF tedavisi (100 mg/kg, per oral) ile serum IgE seviyelerinde azalma, gözlemsel fenotipik astım semptomlarının başlangıcında gecikme, akciğer dokularında peribronşiyal ve perivasküler inflamasyonda ve BAL örneklerinde eozinofilik infiltrasyonda azalma gözlemlenmiştir. Nazal mukoza ile yapılan histopatolojik analizlerde tedavi grubunda nazal mukoza kalınlığında, inflamatuvar hücre infiltrasyonunda, inflamatuvar yanıtta ve goblet hücre sayısında azalma bildirilmiştir. Akciğer dokularından alınan örneklerde DMF tedavisinin, ovalbumin uygulaması ile artış gösteren IL-4 ve IL-13 ekspresyonlarını protein seviyesinde azalttığını ancak mRNA seviyesinde bir değişiklik yapmadığını kaydetmişlerdir. Cen ve ekibi, *in vitro* çalışmalarında DMF ile doz bağımlı olarak Nrf2 seviyelerinde artış ve DMF'nin Nrf2 aktivasyonu aracılığıyla regülatör T hücrelerinin seviyesini modüle ettiğini göstermiştir (142). Jaiswal ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, evsel toz akarı ile sensitize edilen farelerde DMF tedavisi (0.5 mg/kg, intranasal) ile yapılan analizlerde BAL sıvısında eozinofil, alveolar makrofaj, lenfosit sayısında azalma ve akciğer dokularında peribronşiyal ve perivasküler inflamasyonda, muköz hücre metaplazisinde iyileşme olduğu belirtilmiştir. DMF tedavi gruplarında solunum yolu duyarlılığında, CCL24 ve CCL22 kemokin seviyelerinde ve Th2 sitokin ekspresyon seviyelerinde azalma görülmüştür. Farelerden alınan akciğer ve mediastinal lenf nodları ile yapılan çalışmalarda DMF'nin dendritik hücrelerin mediastinal lenf noduna migrasyonunu sağlayarak Th2 yanıtı aracılık ettiği gösterilmiştir (143). Dizel egzoz parçacıkları ile farelerde solunum yolu inflamasyonu indüklenen başka bir deneysel çalışmada, tedavi gruplarına oral yoldan DMF (30 mg/kg) uygulanmıştır. DMF tedavisi ile BAL sıvısında inflamatuvar hücre sayısında, akciğer dokusunda histopatolojik değişikliklerde, oksidatif ve nitrozatif stres belirteçlerinde azalma kaydedilmiştir (144). Seidel ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, insan primer solunum yolu düz kas hücrelerinin TNF- α ve IFN- γ inkübasyonu CXCL10 sekresyonunu indüklemiştir. Ortama DMF eklendiğinde hücrelerde HO-1 enzim seviyeleri konsantrasyona bağımlı artmış, CXCL10 düzeyleri ise azalmıştır (7). Başka bir *in vitro* çalışmada ise DMF uygulaması, *platelet derived büyüme* faktörünün insan primer düz kas hücrelerindeki proliferatif etkisini hücrelerdeki HO-1 enzim seviyesini arttırarak inhibe ettiği ileri sürülmüştür (145). Chen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, hidroksikarbolik asit

reseptör 2 (Hca2) delesyonu yapılan fareler ile DMF'nin deneysel alerjik ensefalomiyelitteki etkinliği araştırılmıştır. Kontrol grubundaki farelerde DMF tedavisi (30 mg/kg, per oral) ile motor fonksiyonlarda iyileşme ve spinal kord dokusuna immün hücre infiltrasyonunda azalma görölürken, Hca2^{-/-} farelerde DMF terapötik etki göstermemiştir (146). Deneysel otoimmün nörit modelinde oral yoldan uygulanan DMF tedavisinin (25 mg/kg) koruyucu ve tedavi edici etkinliği incelenmiştir. Koruyucu DMF tedavisi hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasını geciktirmiş, periferik sinir hasarını azaltmıştır. Farelerden izole edilen siyatik sinir ve dalak örneklerinde yapılan analizlerde, koruyucu ve tedavi edici DMF uygulamasının M1 makrofaj (proinflamatuvar) sayısını azaltırken, M2 makrofaj (antiinflamatuvar) aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Mürin makrofaj hücre hattı RAW 264.7 kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmada, LPS ile M1 makrofaj fenotipi indüklenerek DMF'nin makrofaj polarizasyonuna etkisi araştırılmıştır. *In vitro* DMF uygulaması ile indüklenebilir nitrik oksit sentaz (i NOS) ve TNF- α ekspresyonunun azaldığı, arjinaz 1 ve IL-10 ekspresyonunun ise arttığı gösterilmiştir (147). Sisplatin ile indüklenen deneysel böbrek hasarında DMF tedavisi Nf- κ B aktivasyonunu azaltarak antiinflamatuvar etki göstermiş ve böbrek hasarını azaltmıştır (148).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasallar

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 4. Kullanılan kimyasallar, marka ve kodları

	Kimyasallar	Marka/Kod
<i>In vivo</i> astım modelinin oluşturulması ve tedavisi	Lipopolysaccharides <i>Escherichia coli</i> (O127:B8)	Sigma, L4516
	Ovalbumin	Sigma, S7951
	Alüminyum hidroksit	Sigma, 239186
	Karboksimetil selüloz	ISOLAB Chemical
	Dimetil fumarat	Abdi İbrahim
	Ketalar® (Ketamin HCl)	Pfizer
	Rompun ® (Ksilazin)	Bayer
<i>In vitro</i> trakea hiperreaktivitesinin ölçümü	Sodyum klorür (NaCl)	ISOLAB Chemical
	Potasyum klorür (KCl)	ISOLAB Chemical
	Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	ISOLAB Chemical
	Glikoz monohidrat	ISOLAB Chemical
	Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	ISOLAB Chemical
	Karbakol	Sigma, 212385
	5-hidroksitriptamin	Sigma, H9523
	Kaptopril	Sigma, C4042
	Bradikinin	Sigma, 05-23-05000
	İndometazin	Sigma, 17378
Doku homojenatlarında protein seviyelerinin tespiti (Western Blot)	Dithiothreitol (DTT)	Sigma, 43815
	Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) tetrasodyum tuz	ZAG Kimya, 10378-23-1
	Fosfat tamponlu salin tablet	Sigma, P4417
	Glisin	Sigma, G8898
	HEPES	Sigma, 54457
	Hidroklorik asit (HCl)	Sigma, 3203331
	Metanol	ISOLAB 67-56-1
	PMSF (Fenil metil sülfonil florid)	Sigma, 78830
	Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad, 1610374
	Ponceau S	Sigma, P7170
	Proteaz inhibitör kokteyl	Sigma, P8340
	Amonyum per sülfat (APS)	Bio-Rad, 161-0700
	Bromofenol blue	Biomatik, A2223

Tablo 4 (Devam)

Doku homojenatlarında protein seviyelerinin tespiti (Western Blot)	Yağsız süt tozu	Alfasol®
	Sığır serum albümin (BSA)	Capricorn Scientific, BSA-1U
	Tween 20	Sigma, P1379
	Tris-Baz (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma, T1503
Histopatolojik analiz	Triton X 100	Sigma, T8787
	Entellan	Merck, 107961
	Etanol (absolü)	ISOLAB, 920.026, 64-17-5
	Etanol (%96)	ISOLAB, 920.052, 67-56-1
	Formaldehit	Tekkim, TK-911012
	Metanol	ISOLAB, 947.046, 67-56-1
	Parafin (granül)	Tekkim, 200661.00502
Metabolomik analiz	Ksilen	VWR (28973.363)
	Metanol (%70)	ISOLAB, 67-56-1
	N-metil-N-trimetilsililtrifloroasetamid	Sigma, 69479

3.1.2. Antikorlar

Western Blot deneylerinde kullanılan antikorlar Tablo 5’te sunulmuştur.

Tablo 5. Kullanılan antikorlar, marka ve kodları

Antikor	Katalog numarası
Anti-Nrf-2 antikor (anti-rabbit)	BT Lab, BT-AP06174
Anti-β katenin antikor (anti-rabbit)	Cell Signaling #8814
Anti- β aktin antikor (anti-mouse)	Cell Signaling, #3700
Anti-Wnt 5A/B antikor (anti-rabbit)	Cell Signaling, #2530
Anti-HO-1 antikor (anti-rabbit)	Cell Signaling #4396
Anti Nf-κB p65 antikor (anti rabbit)	Cell Signaling #3034
Anti p- Nf-κB p65 (ser276) antikor (anti rabbit)	Bioss Antibodies bs-3543R
Anti-rabbit sekonder	IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG, LI-COR
Anti-mouse sekonder	IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG (H + L), LI-COR

3.1.3. Analiz setleri

Western Blot deneylerinde kullanılan analiz setleri Tablo 6’ da sunulmuştur.

Tablo 6. Western blot deneylerinde kullanılan analiz setleri

Analiz seti	Katalog numarası
Elektroforez jeli hazırlama seti (TGX FastCast Acrylamide Kit, %10)	BIO-RAD, 1610173
Total protein düzeyi ölçümü analiz seti	Pierce ® TM BCA Protein Assay Kit

3.1.4. Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan cihazlar Tablo 7’de sunulmuştur.

Tablo 7. Kullanılan cihazlar, marka ve kodları

Cihaz	Marka/Model
Buz makinesi	Hoshaizaki, Japonya
Buzdolabı (+4°C)	Arçelik, Türkiye
Deiyonize su cihazı	Sartorius, Almanya
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-80 °C)	Thermo Fischer Scientific/TSX40086V
Dikey elektroforez ve transfer sistemi	BIORAD/MINI PROTEAN TETRA CELL, ABD
Elektroforez güç kaynağı	BIORAD, ABD
Gaz kromatografisi- kütle spektrofotometrisi (GC-MS) cihazı	QP2010 Ultra, Shimadzu
Görüntüleme sistemi	LICOR/ODYSSEY CLX
Hassas terazi	SARTORIUS/ ARIUM COMFORT 1 H20.I.1.UV
Homojenizatör	Heidolph, Almanya
Isıtıcı	Witeg, Almanya
Işık mikroskobu	Olympus BX51; Olympus Co., Tokyo, Japan
Kaba terazi	CROWN, SF-400
Lam	ISOLAB-075.05.004, Türkiye
Lamel	ISOLAB-075.01.007, Türkiye
Mikroplaka okuyucu	BMG LABTECH/SPECTROSTRA NANO
Mikrotom	RM 2255; Leica Inst., Nussloch, Almanya
Mikrotom bıçağı	Feather, FE 2007500011
Miyograf sistemi	DMT/DMT620M
Orbital karıştırıcı	BIOSAN, MR-1
Otomatik pipetler	GILSON/PIPETMAN NEO P100N
Sıvı azot tankı	Thermo Scientific/TY509X4
Soğutmalı santrifüj cihazı	HERMLE/Z 32 HK
Uçurtmalı santrifüj cihazı	N-BIOTEK, NB-503CIR
Ultrasonik homojenizatör	BANDELIN, SONOPULS 2 000.2
Vorteks	ISOLAB, Türkiye

3.1.5. Çözelti ve tamponlar

3.1.5.1. Krebs-Henseleit (KH) çözeltisi

KH çözeltisi için 6.902 g NaCl (128 mM), 0.350 g KCl (4.7 mM), 0.163 g KH_2PO_4 (1.2 mM), 0.246 g MgSO_4 (1.2 mM), 2.1 g NaHCO_3 (25 mM) ve 1.98 g glikoz (11.1 mM) sırasıyla hassas terazide tartılıp 800 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. Hazırlanan çözeltinin içinden yaklaşık 20 dakika karbojen gaz karışımı (%95 O_2 -%5 CO_2) geçirildi. Ayrı bir cam behere aktarılan 0.368 g CaCl_2 distile suda çözündürüldü. Elde edilen CaCl_2 çözeltisi, içinden karbojen gazı geçirilen KH çözeltisine damla damla eklendi ve son olarak hacim distile su ile 1 000 mL'ye tamamlandı. KH çözeltisi +4 °C'de muhafaza edildi ve her deney günü taze hazırlandı.

Indometazin Çözeltisi

Indometazinin (molekül ağırlığı:357.8 g/mol) suda çözünürlüğünün düşük olmasından ötürü çözünürlüğünü artırmak amacıyla sodyum karbonat kullanılmıştır. 21.47 mg indometazin tartılarak mikrosantrifüj tüpüne alındı. Aynı miktarda sodyum karbonat içeren çözelti üzerine eklenerek (2 mL) eklenerek pH 6.5-8 aralığına getirildi. 30 mM indometazin içeren çözeltiden KH çözeltisine 100 μL eklenerek, son konsantrasyon 3 μM olacak şekilde indometazin içeren KH çözeltisi hazırlandı.

3.1.5.2. Western Blot Stok Çözelti ve Tamponlar

1 M Tris-Cl (pH:7.4) Tamponu

121.1 g Tris (tris-(hidroksimetil) aminometan) bazı (molekül ağırlığı:121.14 g/mol) bazı, 800 mL deiyonize su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. Çözeltinin pH'si, damla damla derişik HCl (2 M) eklenerek 7.4 değerine ayarlandı ve hacim deiyonize su ile 1 000 mL'ye tamamlandı. Çözelti deney gününe kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi.

10x Tris-Glisin Tamponu

30.3 g Tris bazı (molekül ağırlığı: 121.14 g/mol) ve 144 g glisin (molekül ağırlığı:75.07 g/mol) 800 mL deiyonize su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. Hacim deiyonize su ile 1 000 mL'ye tamamlandı. Çözelti deney gününe kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi.

0.5 M Tris-HCl (pH:6.8) Tamponu

6.057 g Trizma bazı, 90 mL deiyonize su içerisinde tamamen çözündürüldü. Çözeltinin pH değeri derişik HCl ile 6.8 değerine ayarlandı. Hacim 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Triton-X 100 (%20) Çözelti

20 mL Triton-X 100'e deiyonize su eklenerek hacim 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti deney gününe kadar 2-8 °C'de muhafaza edildi.

5 M Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi

29.22 g NaCl 100 mL deiyonize suda çözündürülerek hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

0.5 M EDTA Çözeltisi

20.81 g EDTA tetrasodyum tuzu (molekül ağırlığı: 416.20 g/mol), deiyonize suda çözündürüldü. pH değeri, derişik NaOH çözeltisi ile 8.0'e ayarlandı ve hacim 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

50 mM Sodyum Pirofosfat (NaPPi) Çözeltisi

1.115 g NaPPi (molekül ağırlığı: 444.06 g/mol), 50 mL deiyonize suda çözündürülerek 1.5 mL'lik hacimlerde mikrosantrifüj tüplerine bölüştürüldü. Deney gününe kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

1 N Sodyum Hidroksit Çözeltisi

4 g NaOH (molekül ağırlığı: 40 g/mol), deiyonize suda çözündürülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

200 mM Sodyum Ortovanadat (Na₃VO₄) Çözeltisi

3.68 g Na₃VO₄ (molekül ağırlığı: 183.91 g/mol), 90 mL deiyonize suda çözündürülerek pH değeri 1 N HCl ile 10.0'a ayarlandı. Sarı renk oluşumu gözlemlendikten sonra çözelti renksiz hale gelinceye dek kaynatıldı ve soğutuldu. pH kontrolü tekrar yapıldı. Çözelti eşit hacimlerde mikrosantrifüj tüplerine bölüştürülerek -20°C'de muhafaza edildi.

1 M Sodyum Florür (NaF) Çözeltisi

4.2 g NaF (molekül ağırlığı:41.99 g/mol), 100 mL deiyonize suda çözündürülerek eşit hacimlerde mikrosantrifüj tüplerine bölüştürüldü. Deney gününe kadar -20°C’de muhafaza edildi.

100 mM PMSF Çözeltisi

0.174 g PMSF (molekül ağırlığı:174.19 g/mol), 10 mL etanol içerisinde çözündürülerek 0.5 mL’lik hacimlerde mikrosantrifüj tüplerine bölüştürölüp -20°C’de muhafaza edildi.

5x Yükleme Çözeltisi

Çözeltilde 0.25 M Tris-Cl (pH:6.8), %10 SDS, %50 gliserol, %0.01 bromofenol mavisi olacak şekilde 10 mL hacimde yükleme tamponu hazırlandı. Hazırlanan çözelti eşit hacimde (1’er mL) mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve -20°C’de muhafaza edildi. Çalışma çözeltisi hazırlanmadan önce, her bir mikrosantrifüj tüpünde son konsantrasyon 0.5 M DTT (molekül ağırlığı: 154.25 g/mol) olacak şekilde DTT eklendi.

10x TBS Çözeltisi

110 g NaCl (molekül ağırlığı:58.44 g/mol) ve 29.71 g Tris bazı (molekül ağırlığı:121.14 g/mol) 800 mL deiyonize suda çözündürüldü. Derişik HCl ile çözelti pH’ı 7.6’ya ayarlanarak toplam hacim deiyonize suyla 1 000 mL’ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%20’lik Tween 20

20 mL Tween 20 alınarak deiyonize suyla 100 mL hacme tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%20’lik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi

1 g SDS, 5 mL deiyonize suda çözdürülerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%10 Amonyum Persülfat (APS) (1 mL)

1 mL distile suda 100 mg APS (molekül ağırlığı: 228.18 g/mol) çözdürüldü ve 2-8 °C’de muhafaza edildi.

3.1.5.3. Western Blot Çalışma Çözeltileri ve Tamponlar

Homojenizasyon Tamponu

2.5 mL Tris HCl (50 mM, pH:7.4), 1.5 mL NaCl (150 mM), 2.5 mL Triton X-100 (%1), 100 µL EDTA (1 mM, pH:7.0), 5 mL NaPPi (5 mM), 5 mL proteaz inhibitör kokteyli (%1), 5 mL gliserol (%10), 500 µL NaVan (2 mM), 1 mL NaF (20 mM), 500 µL PMSF (1 mM) olacak şekilde çözeltiler birleştirildi. Son hacim deiyonize su ile 50 mL'ye tamamlandı. Homojenizasyon işlemi sırasında öncesinde çözelti taze olarak hazırlandı. Homojenizasyon işlemi boyunca tampon çözelti buz içerisinde muhafaza edildi.

Elektroforez Yürütme Tamponu

10x Tris Glisin çözeltisine (100 mL) %20 derişimli SDS çözeltisi (500 µL) eklenerek distile su ile son hacim 1 000 mL'ye tamamlandı.

Transfer Çözeltisi

Western blotlama transfer işleminden önce 10x Tris-Glisin çözeltisine 200 mL metanol eklendi. Toplam hacim deiyonize suyla 1 000 mL'ye tamamlanarak çözelti konsantrasyonu 1x olacak şekilde seyreltilti. Çözelti her seferinde taze olarak hazırlanarak transfer işlemine kadar 2-8 °C'de muhafaza edildi.

TBS-T Çözeltisi

10X TBS stok çözeltisinden 100 mL alınarak 800 mL deiyonize suyla dilüe edildi. Çözeltide Tween 20 çözeltisinin son konsantrasyonu %0.05 olacak şekilde Tween 20 eklendi. Toplam çözelti hacmi deiyonize suyla 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Bloklama Çözeltisi

2.5 g yağsız süt tozu 50 mL %0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. Hazırlanan çözelti 2-8 °C'de muhafaza edildi.

%0.1 Tween 20 İçeren TBS Çözeltisi

10x TBS çözeltisi 1/10 dilüe olacak (x konsantrasyon) şekilde deiyonize suyla seyreltilti ve 100 µL Tween 20 1xTBS çözeltisi ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%3'lük Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi

1.5 g BSA %0.1 Tween 20 içeren 50 mL TBS çözeltisi içerisinde dilüe edildi. Hazırlanan çözelti 2-8 °C'de muhafaza edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Hayvanları

Çalışmada, 8-12 haftalık 20-25 g ağırlığı aralığında dişi Balb/c fareler kullanıldı. Fareler KTÜ Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Deney protokolü süresince KTÜ Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde 12 saat gece/gündüz siklusunda ve uygun sıcaklık (22 ± 1 °C) ve nem (%60) koşullarında barındırıldılar. Hayvanların altlıkları her gün düzenli olarak değiştirildi. Standart yem ve suya ulaşımaları ad *libitum* sağlandı. KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan etik kurul onayı ile deneylere başlandı (Dosya No:2024/32, Ek-1).

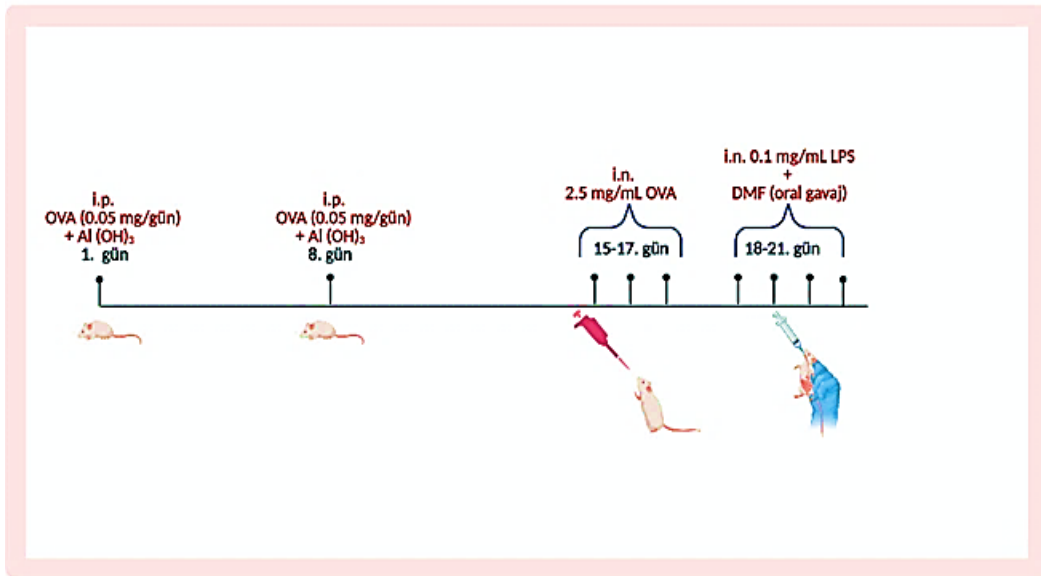
3.2.2. Deneysel Astım Modelinin Oluşturulması ve Deney Protokolü

Deneysel astım modeli sensitizasyon (duyarlılaştırma) ve sataşma fazı olmak üzere iki fazdan (21 gün) oluşmaktadır. Sensitizasyon amacıyla farelere, deney protokolünün 1. ve 8. günlerinde intraperitoneal (i.p.) ovalbumin (OVA) (0.05 mg/mL, grade II, Sigma Aldrich) 200 µL fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) içerisinde ve alüminyum hidroksit ($Al(OH)_3$) (5 mg/mL, Sigma Aldrich) uygulandı. Sataşma fazında farelere 15-17. günlerde intranasal (i.n.) OVA (2.5 mg/mL, 20 µL PBS içerisinde), 18-21. günlerde ise i.n. LPS (*Escherichia coli*, O127:B8; 0.1 mg/mL, 20 µL PBS içerisinde) uygulandı. Kontrol grubundaki farelere ise deney protokolünün 1. ve 8. günlerinde 200 µL serum fizyolojik içerisinde i.p. OVA (0.05 mg/mL); 15-21. günlerde 20 µL i.n. PBS uygulandı (149).



Resim 1. Farelere çözeltilerin intranasal yoldan uygulanmasının temsili görüntüsü

Deney hayvanları randomize olarak beş gruba ayrıldı (Tablo 8) . Tedavi gruplarına göre, 18-21. Günlerde i.n. LPS uygulaması ile arasında 1 saat olacak şekilde DMF (30 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün) veya taşıyıcı [%0.5 karboksimetilselüloz (CMC)] günde bir kez oral gavaj (per oral, p.o.) olarak uygulandı. Kontrol grubuna sadece DMF yüksek doz (100 mg/kg/gün) verilerek değerlendirildi (150,151). Tüm ilaç uygulamaları ve cerrahi işlemlerin aynı saatlerde yapılmasına dikkat edildi. Son LPS/PBS/DMF uygulamasından 24 saat sonra (22. gün) farelere i.p. anestezi (ketamin 90 mg/kg ve ksilazin 10 mg/kg) uygulaması yapıldı. Anestezi derinliğinin sağlanması ardından supin pozisyonu verilen farelerden trakea ve akciğerler izole edildi. Bu amaçla farelerin servikal ve toraks bölgeleri insizyonla açıldı. Servikal kısımda timus ve ekstraservikal kaslar doku pensi yardımıyla kanamamasına özen gösterilerek kenara itildi ve trakea kıkırdak dokusu ortaya çıkarıldı. Ardından makas yardımıyla göğüs kafesi kesilerek açıldı. Doku pensi yardımıyla krikoid kıkırdaktan tutularak trakea ve akciğer dokuları izole edildi. Pulmoner arter kesilerek kalp dokusu akciğerden ayrıldı. Trakea +4 °C'ye soğutulmuş KH çözeltisi içeren petri kabına aktarıldı. Akciğer dokusu ise soğuk PBS ile hızlıca yıkandıktan sonra sağ ve sol lob şeklinde iki parçaya ayrıldı. Akciğerin sağ lobu örnek saklama tüpü içinde sıvı azot ile hızlıca dondurularak -80 °C'de muhafaza edildi. Akciğerin sol lobu ise formaldehit çözeltisi içinde fikse edilerek histopatolojik analizler için kullanıldı. Farelere trakea ve akciğer dokularının izole edilmesini takiben servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı.



Şekil 11. Farede OVA ve LPS ile indüklenen astım modelinin deneysel protokolü

Tablo 8. Deneysel astım modelinde DMF tedavisinin etkinliğini araştırmak amacıyla oluşturulan deney grupları

Deney grubu	n
Kontrol	8
Kontrol+100 mg/kg/gün p.o. DMF (%0.5 CMC içerisinde), (DMF)	8
OVA-LPS, (OL)	8
OVA-LPS+30 mg/kg/gün p.o. DMF (%0.5 CMC içerisinde), (OL+DMF30)	8
OVA-LPS+100 mg/kg/gün p.o. DMF (%0.5 CMC içerisinde), (OL+DMF100)	8
Toplam	40

3.2.3. In Vitro Trakea Hiperreaktivitesinin Değerlendirilmesi

Farelerden izole edilen trakea halka preparatları bir ucu izometrik kuvvet-yer değiştirme transdüsörüne; diğer ucu ise yer değiştirme cihazına bağlanacak şekilde yatay olarak KH çözeltisi içeren 5 mL'lik wire-miyograf banyolarına takıldı. Banyoların içerisindeki KH çözeltisi sürekli karbojen (%95 O₂ ve %5 CO₂) ile gazlandırılarak, sıcaklığı termostatik kontrol ile 37 °C'de sabit tutuldu. Trakea halkalarına 1 000 mg bazal gerim uygulandı ve banyolardaki KH çözeltisi 20 dakika aralıklarla yenilenerek dokuların 1 saat boyunca dengeye gelmesi sağlandı. Bronşiyal epitelden salıverilen prostanooidlerin solunum yolu düz kasının kontraktilesi üzerine etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla deney protokolü boyunca banyolardaki KH çözeltisine 3 µM İndometazin içerecek şekilde indometazin çözeltisi eklendi. Trakea halkalarından konsantrasyona bağımlı (10⁻⁸-10⁻⁴) karbakol (CCh) kasılma yanıtı alındı. Ardından dokular organ banyoları içindeki KH çözeltisi 15 dakika aralıklarla değiştirilip yıkanarak 1 saat dinlenmeye bırakıldı. Bazal gerime ulaşan trakea halkalarından konsantrasyon bağımlı (10⁻¹⁰-10⁻⁴ M) 5-hidroksitriptamin (5-HT) kasılma yanıtı alındı. Dokular 15 dakika aralıklarla KH çözeltisi ile yıkanarak dinlendirildi. Bazal gerim değerine ulaşan trakea halkaları, Bradikinin inaktivasyonunu önlemek amacıyla endojen kininaz enzim inhibitörü Kaptopril (3x10⁷ M) ile 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda dokulardan bradikinin ile indüklenen konsantrasyona bağımlı (10⁻⁸-10⁻⁴ M) kasılma yanıtı alınarak kaydedildi. Dokular KH çözeltisi ile yıkanarak bazal gerime ulaşması beklendi. Deney protokolünün sonunda dokuların kontraktıl özelliklerinin test edilmesi amacıyla dokulardan 60 mM KCl ile indüklenen kasılma yanıtı alındı. Dokulardaki gerim değişiklikleri izometrik kuvvet

transdüseri aracılığı ile ölçülerek LabChart® 8.0 (AD Instruments Ltd., Hastings, U.K.) programı ile g cinsinden kaydedildi (152, 153).



Resim 4. İzole organ banyosu deneylerinin yürütüldüğü miyograf cihazının temsili görüntüsü

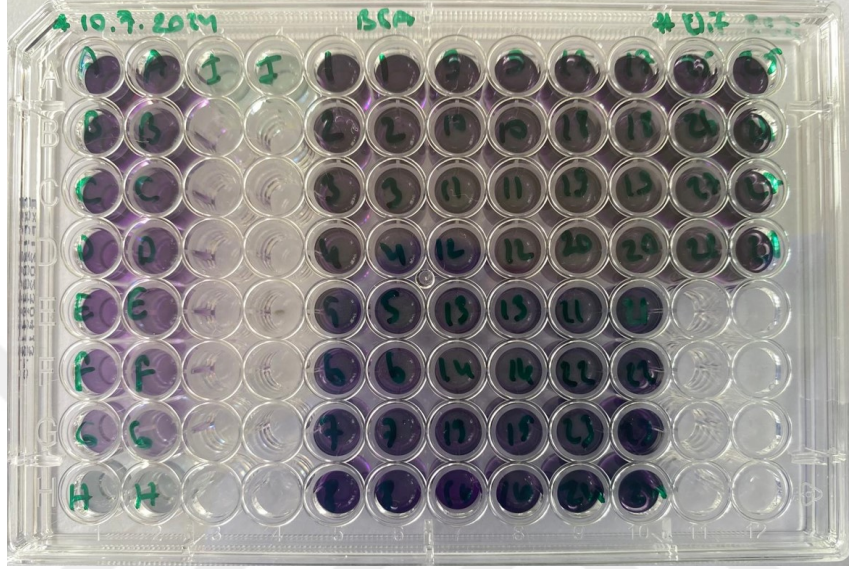
3.2.4. Total Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Sıvı azot içerisinde hızla dondurularak deney gününe kadar -80 °C’de saklanan akciğer dokuları, buz içerisinde tutulan falkon tüplerine yerleştirildi ve üzerine 10 mg/mL homojenizasyon tamponu eklendi. Akciğer dokuları cerrahi makas ile kesilerek küçük parçalara ayrıldıktan sonra mekanik homojenizatör ile 2 0000 rpm’de 25 sn (5’er kez 5 sn) homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi tamamlandıktan sonra homojenatlar 10 000g’de +4°C’de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatantlar mikrosantrifüj tüplerine eşit hacimde bölüştürülerek aktarıldı ve moleküler analizler yapılana kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.5. Total Protein Miktar Tayini

Total protein konsantrasyonlarının tayininde, Thermo Fisher Scientific ® Pierce BCA protein assay kit analiz seti kullanıldı. Deney protokolü analiz seti içinde yer alan kullanım kılavuzuna uygun şekilde gerçekleştirildi. Bu amaçla analiz seti içinde bulunan bovine serum albümini (BSA) stok çözeltisi (2 mg/mL) PBS ile seri dilüsyonla seyreltilip 0,25-2 000 µg/mL’lik BSA standart çözeltileri hazırlandı. Analiz seti içinde temin edilen çözelti A (bicinchoninic asit) ve çözelti B [bakır (II) sülfat] 50:1 oranında karıştırılarak çalışma çözeltisi elde edildi. BSA standart çözeltileri ve numuneler 25 µL hacminde 96 kuyucuklu mikropalakaya çift tekrarlı bir şekilde eklendi. Ardından standart çözelti veya numune içeren tüm kuyucuklara 200 µL çalışma çözeltisi ilave edildi. Mikropalkanın kapağı kapatılarak alüminyum folyoya sarıldı ve 37 °C’ye ayarlanmış su banyosunda 30

dakika inkübe edildi. Sonuçta oluşan mor renkli BCA-Cu⁺ kompleksinin absorbansı 562 nm dalga boyunda ölçüldü. BSA standart çözeltilerinin absorbans değerlerine göre, konsantrasyona bağlı absorbans eğrisi çizildi. Konsantrasyona bağlı absorbans eğrisi kullanılarak numunelerin total protein konsantrasyonu belirlendi.



Resim 5. Farelerden izole edilen akciğer dokusu homojenatlarında total protein tayininde kullanılan 96-kuyucuklu mikrolakanın temsili görüntüsü

3.2.6. Western blot yöntemi

3.2.6.1. Jellerin hazırlanması

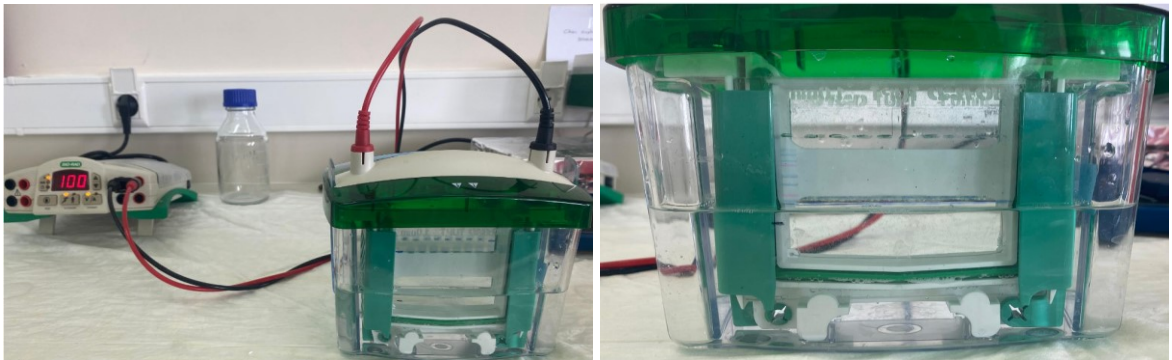
Jel dökme için kullanılan cam plakalar (ön cam ve 1 mm'lik ara parça camı) %70 derişimli etanol çözeltisi ile silindikten sonra jel döküm ünitesine yerleştirildi. Hazırlanan sistemde saf su ile sızdırma kontrolü yapıldı. *BioRad® TGX Stain-Free FastCast %10 Acrylamide Kit* poliakrilamid hazır jel dökme seri kullanıldı. Ayırma jeli için resolver A ve B çözeltilerinden 3'er mL 15 mL'lik falkon tüp içine aktarıldı, içine 30 µL %10'luk amonyum per sülfat (APS) çözeltisinden ve 3 µL N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) ilave edildi. Karışım hızlıca pipetlenerek homojen hale getirildikten sonra baloncuk oluşmamasına özen gösterilerek pipet yardımıyla camların arasına uygulandı. Ardından stacker A ve B çözeltilerinden 3'er mL, %10'luk APS çözeltisinden 10 µL ve TEMED 2 µL içeren yükleme jel karışımı da camların arasındaki üst kısma uygulandı. Camların arasına örnek yükleme kuyucuklarını oluşturmak için 10 dişli tarak yerleştirildi. Poliakrilamid jellerin polimerizasyonu için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.

3.2.6.2. Örneklerin Hazırlanması

Akciğer homojenatlarından elde edilen örneklerin total protein konsantrasyonları üzerinden her bir örnekte 30 µg protein içeren hacim hesaplandı. Örnekler hesaplanan hacimde 0,50 mL’lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Örnekler 5 µL Laemmli (yükleme) tamponu eklenip, deiyonize su ile hacim 30 µL’ye tamamlandı. Örnekler vorteksledikten sonra masaüstü santrifüj ile 1 000 rpm de 30 saniye santrifüjlendi. Örnekler 95 °C’de 5 dakika bekletilerek denatüre edildi ve ardından tekrar vortekslenerek santrifüjlendi.

3.2.6.3. Elektroforez

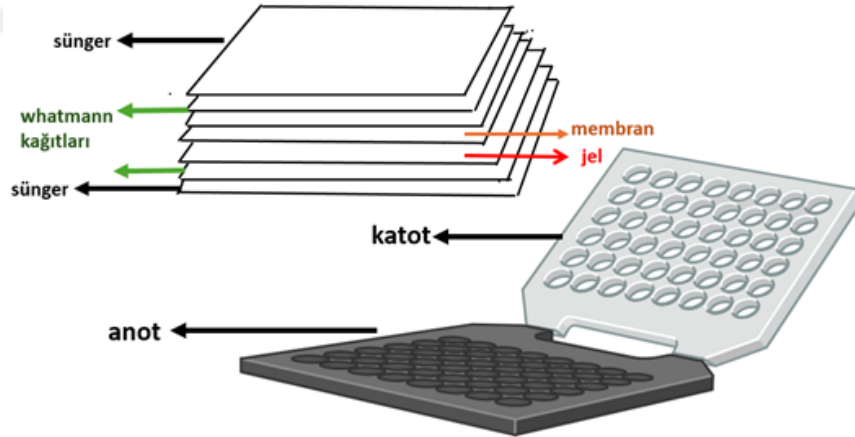
Cam plakaların arasında polimerleşen jeller deiyonize su ile yıkandı. Jel kuyucuklarının tabanının hizası asetatlı kalemle işaretlendi. Jeller Bio-Rad Mini-PROTEAN® elektroforez sisteminin yeşil renkli elektrot ünitesine yerleştirildi. Elektrot ünitesi ise elektroforez tankı içine uygun şekilde konumlandırıldı. Elektrot ünitesinin iç haznesine, jel kuyucuklarını tamamen örtecek seviyede elektroforez tamponu ilave edildi. Ardından elektroforez tankının dış haznesine işaretli yere kadar elektroforez tamponu eklendi. Jellerin içindeki taraklar kuyucukların şeklini korumaya özen göstererek çıkarıldı. Jellerdeki ilk kuyucuklara 3 µL protein moleküler ağırlık standardı (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad, 1610374) yüklendi. Ardından örnekler (30 µL) jeldeki çalışma düzenine göre kuyucuklara yüklendi. Tankın kapağı akım yönüne uygun şekilde yerleştirilerek 100 voltta elektroforez başlatıldı. Moleküler ağırlık standardının sürüklenmesi izlenerek ilgili bölgede proteinlerin ayrımı gerçekleşince elektroforez sonlandırıldı.



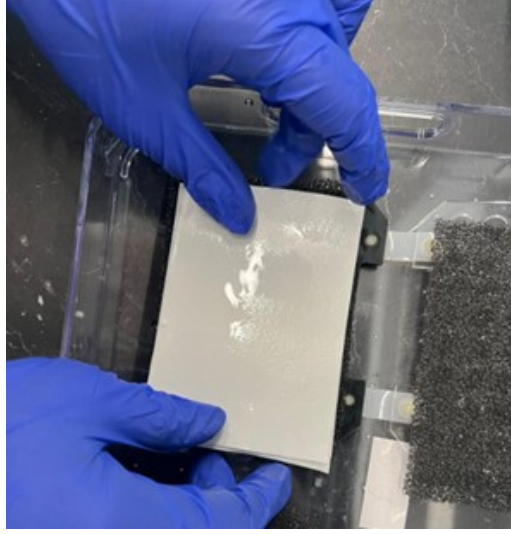
Resim 6. Western blotlama deneylerinde uygulanan elektroforez işlemine ait temsili görüntü

3.2.6.4. Jelden Membrana Transfer İşlemi

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra tanktan çıkarılan jeller deiyonize su ile yıkandı, cam plakalar dikkatli bir şekilde ayrılarak jeller soğuk (4 °C) transfer çözeltisi içine alındı. Jel boyutuna uygun şekilde kesilen poliviniliden florür (PVDF) membranlar, metanol içerisinde 15 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda karıştırılarak aktive edildi. Ardından poliakrilamid jellerdeki proteinler PVDF membrana ıslak transfer yöntemi ile aktarıldı. Bu amaçla transfer kasetleri siyah renkli kısım alta gelecek şekilde açıldı. Transfer kaseti içine sırasıyla sünger, whatmann kağıdı, jel, membran, whatmann kağıdı ve sünger yerleştirilerek kapatıldı. Membran, jel üzerine yerleştirildikten sonra iki yüzey arasında oluşan hava kabarcıkları, bir transfer rulosu (roller) kullanılarak uzaklaştırıldı. Tankın içine manyetik çubuk, soğutucu akü (buz aküsü) ve transfer kasetleri yerleştirildikten sonra kapak akım yönüne uygun şekilde kapatıldı. Transfer işlemi süresince tank, buz dolu bir kap içerisinde tutuldu ve içerisindeki çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Proteinlerin jelden membrana transfer işlemi 80 voltta 2 saatte gerçekleştirildi.



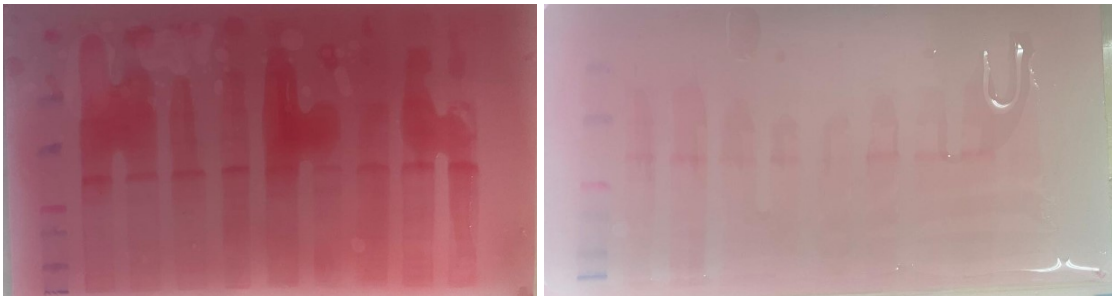
Şekil 12. Western blotlama deneylerinde uygulanan jelden membrana transfer (ıslak transfer) işleminde kaset içeriği.



Resim 7. Western blotlama deneylerinde uygulanan jelden membrana transfer (ıslak transfer) işlemine ait temsili görüntü.

3.2.6.5. Proteinlerin Jelden Membrana Transfer İşleminin Doğrulanması

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra kasetler açılarak membranlar başka bir kaba transfer edildi. Proteinlerin membrana transfer doğruluğunu teyit etmek için membran üzerine Ponceau S çözeltisi uygulandı. Ponceau S çözeltisi ile protein bantları membran üzerinde pembe renkli izlenmektedir. Ardından membranlar deiyonize su ile yıkanarak Ponceau S çözeltisi uzaklaştırıldı ve kısa süreli metanol çözeltisine maruz bırakıldı. Membranlar oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek metanol uzaklaştırıldı. Sonrasında membranlar, 3 kez 5 dakika boyunca TBS-T çözeltisiyle yıkandı.



Resim 8. Western blotlama deneylerinde proteinlerin jelden membrana transfer doğruluğunu teyit etmek için uygulanan Ponceau S çözeltisi ile boyama işlemine ait temsili görüntü.

3.2.6.6. Bloklama

Membranlar spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin kapatılması amacıyla oda sıcaklığında 90 dakika boyunca orbital karıştırıcı ile karıştırılarak bloklama çözeltisi (10 mL) ile inkübe edildi.



Resim 9. Western blotlama deneylerinde spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin kapatılması için uygulanan bloklama işlemine ait temsili görüntü.

3.2.6.7. Primer Antikorla İnkübasyon

Primer antikorlar, %0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisinde hazırlanan %3'lük BSA içerisinde kılavuzlarında belirtilen dilüsyon oranına göre hazırlandı. Dilüsyon oranları anti-Nrf-2 1:1 000, anti- β katenin 1:1 000, anti- β aktin 1:1 000; anti-Wnt 5A/B 1:1 000, anti Nf- κ B p65 1:1 000, anti p- Nf- κ B p65 (ser276) 1:1 000, anti-HO-1 1:1 000 şeklindedir. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanıldı. Primer antikor çözeltileri eklenen membranlar bir gece boyunca (12-16 saat) +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolduktan sonra membranlar 30 dakika (3 kez 10'ar dakika) TBS-T ile yıkandı.



Resim 10. Western blotlama deneylerinde membranların primer antikor ile inkübasyon işlemine ait temsili görüntü.

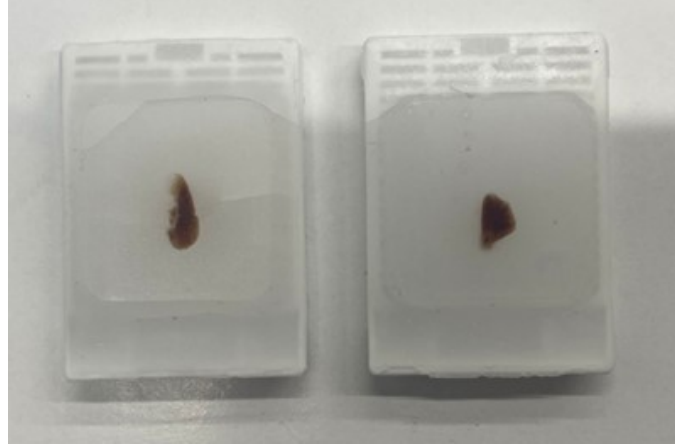
Ardından primer antikorun kaynağına uygun şekilde seçilen sekonder antikor çözeltileri (IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG ve IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG) 1:10,000 dilüsyon oranında hazırlandı. Membranlar sekonder antikor çözeltileri ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor inkübasyonları sırasında membranların yerleştirildiği kutular alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan muhafaza edildi.

3.2.6.8. Görüntüleme

Sekonder antikor inkübasyonu tamamlandıktan sonra membranlar 30 dakika (3 kez 10'ar dakika) TBS-T çözeltisi ile yıkandı. LI-COR görüntüleme cihazının yüzeyi %70'lik alkolle silindi. Membran temiz bir pens yardımıyla TBS-T içerisinden alınarak protein bantları cihazın iç yüzeyine bakacak şekilde yerleştirildi. Cihazın silikon parçası membran üzerine yerleştirildi. Membran ve silikon yüzey arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek üstünden rulo ile hafifçe geçildi. Cihazda 84 µm çözünürlük ve membran büyüklüğü ayarları yapılarak, bant yoğunluklarının hesaplanmasında ImageStudio 6.0 programı kullanıldı. Görüntüledikten sonra membranlar, 30 dakika (3 kez 10'ar dakika) TBS-T içerisinde yıkandı. TBS-T ile nemli bırakılan membranlar, streç filme sarılarak kaldırıldı.

3.2.7. Histopatolojik analiz

Farelerden izole edilen akciğer dokularının sol lobu %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Dokular su ile yıkanarak formaldehit uzaklaştırıldı. Dehidratasyon (doku içeriğindeki suyun alkolle yer değiştirmesi) işlemi için dokular artan derişimlerdeki (%70, %90, %96 ve %99) etanol çözeltilerinde sırasıyla bekletildi. Saydamlaştırma aşamasında ise doku içeriğindeki etanolün uzaklaştırılıp yerine ksilenin infüze etmesi amacıyla dokulara ksilen uygulandı. Ardından doklar doku takip kasetleri içinde eriyik halde bulunan parafine transfer edilerek 60 °C'ye ayarlanmış etüvde 2-4 saat bekletildi. Doku takip kasetleri içine yerleştirilen dokulara uygulanan parafinin, oda sıcaklığında beklendikten sonra katılaşması sağlandı. Böylece dokulara infüze etmiş olan ksilenin yerine parafinin geçirilerek, kesit almaya uygun sertlik ve saydamlıkta parafin bloklar elde edildi. Parafin bloklar kesim yüzeyi altta kalacak şekilde mikrotoma yerleştirildi ve üst yüzeyi tıraşlanarak temizlendi. Parafin bloklar mikrotom ile kesilerek 5 µm kalınlığında doku kesitleri cam lam üzerine alındı. Doku kesitleri 60 °C'lik etüvde 1-2 dakika bekletildi. Deparafinizasyon işlemi için doku kesitlerine ksilen (10 dakika) uygulandı. Ardından doku kesitleri azalan derişimlerdeki (%99, %96, %90 ve %70) etanol çözeltilerinde sırasıyla 5'er dakika bekletildi. Sonrasında doku kesitleri deiyonize suya transfer edilerek hidrate edildi. Kesitler hematoksilen çözeltilisinde 5 dakika bekletildi ve deiyonize suya daldırılarak yıkandı. Ardından eozin çözeltilisine daldırılarak 1 dakika bekletildi ve deiyonize su ile yıkandı. Hematoksilen-eozin ile boyama sonrası doku kesitlerinin dehidratasyonu ve temizlenmesi için artan derişimlerdeki (%70, %90, %96 ve %99) etanol çözeltilerinde ve ksilende 5'er dakika bekletildi. Cam lam üzerindeki doku kesiti üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı. Akciğer doku kesitleri, mikroskop altında incelenerek peribronşiyal ve parankimal inflamasyon; inflamatuvar hücre yoğunluğu ve dokuya hücre infiltrasyonu parametreleri temelinde kör şekilde değerlendirildi (154, 155).



Resim 11. Histopatolojik analiz için hazırlanan parafin bloklar

Tablo 9. Akciğer dokularındaki histopatolojik skora için yarı-kantitatif değerlendirme sistemi

Skorlar	Peribronşiyal/parankimal inflamasyon derecesi
0	Yok
1	Hafif
2	Orta
3	Şiddetli
4	Çok şiddetli

3.2.8. Metabolomik Analiz

Deney gününe kadar -80 °C’de tutulan izole fare akciğer dokuları hızlı bir şekilde cam havan içine alınarak üzerine sıvı azot eklendi. Dokular sıvı azot içinde havan eli yardımıyla öğütülerek katı toz haline getirildi. Katı toz halindeki akciğer dokuları hassas terazi ile tartılarak her birinden 50 mg mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Örnekler 1 mL ekstraksiyon çözeltisi (hacimce 9:1 oranında metanol-su) eklendi ve ultrasonik homojenizatör (3 kez, 15 saniye süreyle) ile homojenize edildi. Akciğer homojenatları 15 000 rpm’de 20 dakika santrifüjlendi ve elde edilen süpernatantlar metabolomik analiz yapmak için mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Süpernatantlar uçurtmalı santrifüj (N-BIOTEK, NB-503CIR) ile kurutulduktan sonra %1 trimetilklorosilan ve N-metil-N-trimetilsililtrifloroasetamid ile muamele edilerek metoksaminasyon ve türevlendirme uygulandı. Hazırlanan örneklerde metabolit analizleri GC-MS QP2010 Ultra sisteminde yapıldı. Metabolomik analizlerin sonucunda elde edilen verilerin dönüştürülmesi, pik

hizalaması ve normalizasyon işlemleri MS-DIAL yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen veri matrisi üzerinde değişkenlik analizi yapmak amacıyla *SIMCA-P+* yazılımı (version 13.0; Umetrics, Umea, İsveç) kullanıldı. Bu kapsamda, varyans homojenliği kontrolü, aykırı değerlerin belirlenmesi, örneklerin gruplandırılması ve veri setindeki genel eğilimlerin değerlendirilmesi amacıyla Temel Bileşenler Analizi (PCA) uygulandı. Kısmi En Küçük Kareler Ayırma Analizi (PLS-DA) ise verilerin gruplar arasında sınıflandırılmasını sağlayarak potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesini kolaylaştırdı. Verilere ait projeksiyondaki değişken önemi grafikleri oluşturularak bu grupların ayırımında en önemli metabolitlerin tespit edilmesi sağlandı. Metabolomik analiz için metabolitler hücredeki fonksiyonel özelliklerine ve metabolik reaksiyonlardaki rolüne göre sınıflandırıldı. Çalışmada aminoasit metabolizması, yağ asidi metabolizması, glikoz metabolizması, gen ekspresyonu gibi temel metabolik yollar değerlendirildi (156).

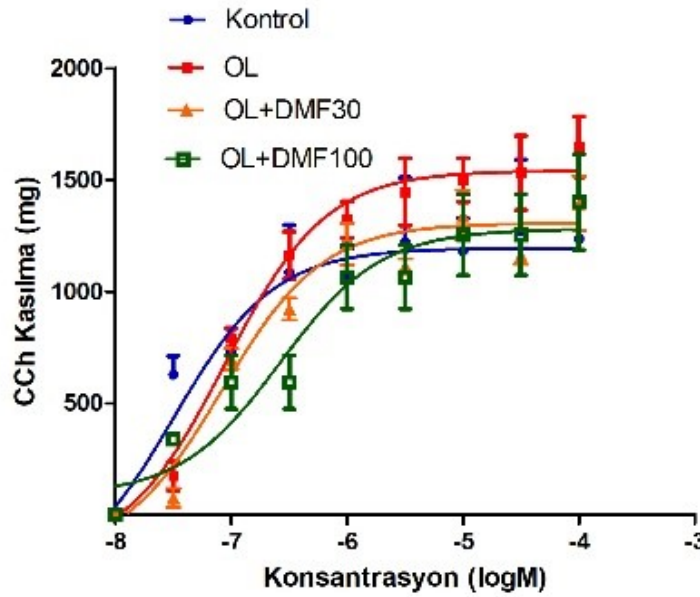
3.2.9. İstatistiksel Analiz

İzole organ banyosu deneylerinde trakea halkalarında karbakol kasılma yanıtı ‘g’ olarak, 5-HT ve bradikinin kasılma yanıtları ise maksimum karbakol kasılmasının yüzde (%)’si olarak verildi. Agonistler ile elde edilen konsantrasyona bağımlı yanıt eğrilerinden elde edilen maksimum kasılma yanıtları Emaks değerleri, maksimum yanıtın yarısını oluşturan agonistlerin konsantrasyonunun (EC_{50}) negatif logaritması ise pD_2 değeri olarak sunuldu. Western blotlama deneylerinde ise protein ekspresyonları, yükleme kontrolü olarak kullanılan beta-aktin protein seviyelerine göre normalize edildikten sonra, her membrandaki kontrol örneğine göre nispi olarak hesaplandı. Histopatolojik değerlendirmede akciğer doku kesitlerinin mikroskopik değerlendirmesinden elde edilen semi-kantitatif skorlar verildi.. Deneylerden elde edilen değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak sunuldu. Değerlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilks veya Kolmogorov-Smirnov yöntemi ile test edildi. İstatistiksel analizde ikili grup karşılaştırılmasında Student t-testi, çoklu grup karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi post hoc Tukey kullanıldı. $P<0.05$ ise ortalamalar arası fark anlamlı kabul edildi. Veriler GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Prism (Graphpad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) programı kullanılarak analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Fare Trakea Halka Preparatlarında Agonist Aracılı Kasılma Fonksiyonunun Farmakodinamik Analizi

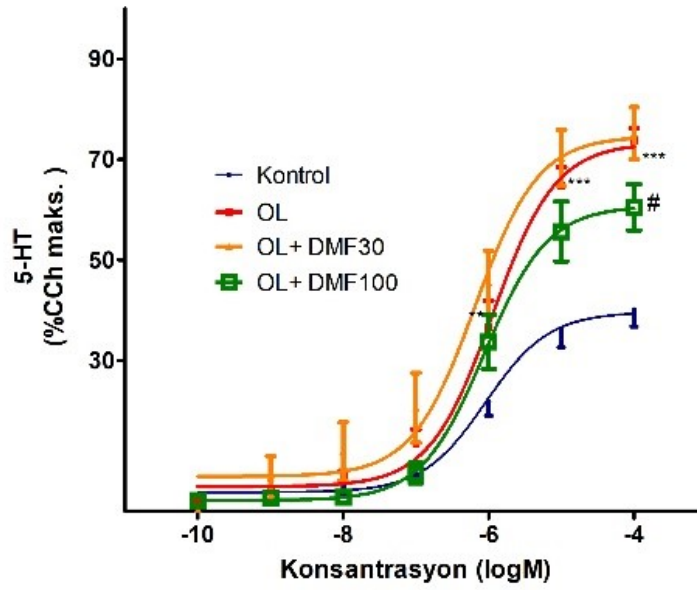
Çalışmada kontrol, kontrol+DMF, OL, OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarındaki farelerden izole edilen trakea halkalarının kontraktıl fonksiyonları, izole organ banyosu sistemi kullanılarak değerlendirildi. Fare trakea halkalarında karbakol (10^{-8} - 10^{-4} M) ile indüklenen konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtları benzer bulundu, deney gruplarının ortalama maksimum kasılma yanıtı (E_{maks}) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Dokuların Cch yanıtları arasında anlamlı farklılık görülmemesinden ötürü submaksimal karbakol yanıtı esas alınarak 5-HT ve bradikinin yanıtları maksimum CCh yanıtının yüzdesi olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 13. Kontrol, OL, OL+DMF30, OL+DMF100 deney gruplarındaki farelerden izole edilen trakea halkalarında karbakol (10^{-8} - 10^{-4} M) ile indüklenen konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtları. Değerler 'mg' cinsinden ifade edildi ve ortalama $\pm$ SH olarak sunuldu (n=6-8/grup)

Tablo 10. Farelerden izole edilen trakealardan elde edilen karbakol indüklü kasılma yanıtlarının E_{maks} değerleri.

Karbakol	Kontrol	OL	OL+DMF30	OL+DMF100
E_{maks}	1.236±0.15	1.711±0.1323	1.394±0.1217	1.4±0.2153

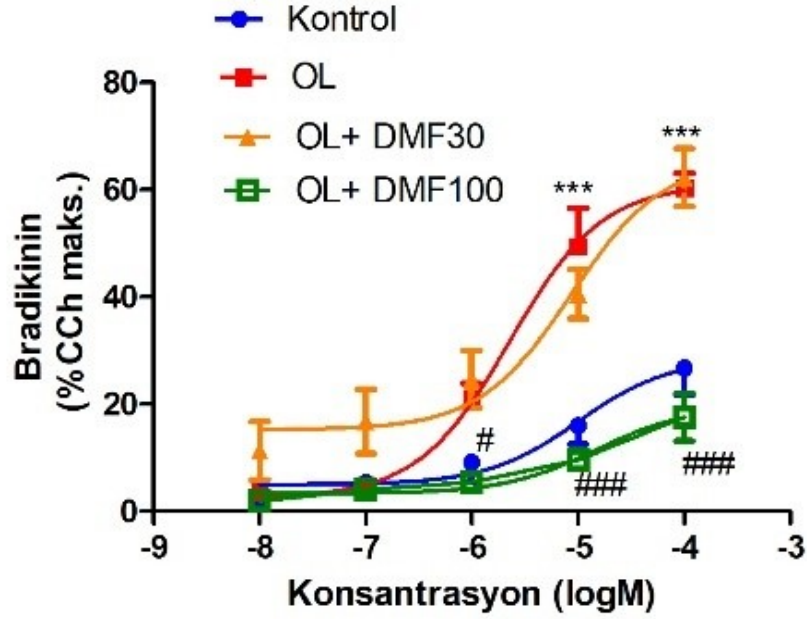


Şekil 14. Kontrol, OL, OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarındaki farelerden izole edilen trakea halkalarında 5-HT (10^{-10} - 10^{-4} M) ile indüklenen konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtları. Değerler karbakol ile indüklenen maksimum kasılma yanıtı değerinin yüzde (%) cinsinden ifade edildi ve ortalama $\pm$ SH olarak sunuldu (n=6-8/grup, **p<0.01, ***p<0.001 kontrole kıyasla, #p<0.05 OL grubuna kıyasla).

OVA ve LPS uygulaması ile in vivo deneysel astım oluşturulan OL grubunda 5-HT (10^{-6} - 10^{-4} M) ile indüklenen kasılma yanıtları kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. OL ve OL+DMF30 deney grupları arasında 5-HT kasılma yanıtları açısından anlamlı fark saptanmazken, OL+DMF100 grubunda 10^{-4} M konsantrasyonda 5-HT ile indüklenen kasılma yanıtı OL grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldı. Ayrıca OL+DMF100 grubunda 5-HT (10^{-6} - 10^{-4} M) kasılma yanıtı değerleri kontrole göre yüksek bulundu. Buna göre DMF tedavisi OL grubunda kontrole göre artan 5-HT kasılma yanıtını düşük dozda etkilemezken, yüksek dozda ancak kısmen azaltabilmiştir.

Tablo 11. Farelerden izole edilen trakealardan elde edilen 5-HT indüklü kasılma yanıtlarının $E_{\max}$ (%) değerleri.

5-HT	Kontrol	OL	OL+DMF30	OL+DMF100
$E_{\max}$	%43 $\pm$ 4.728	%73.86 $\pm$ 2.416	%75.20 $\pm$ 5.164	%60.46 $\pm$ 4.589



Şekil 15. Kontrol, OL, OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarındaki farelerden izole edilen trakea halkalarında bradikinin (10^{-8} - 10^{-4} M) ile indüklenen konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtları. Değerler karbakol ile indüklenen maksimum kasılma yanıtı değerinin yüzdesi (%) cinsinden ifade edildi ve ortalama $\pm$ SH olarak sunuldu. (n=6-8/grup, ***p<0.001, #p<0.05, ###p<0.001).

Farelerden izole edilen trakea halkalarının kasılma duyarlılığını değerlendirmek amacıyla konsantrasyona bağımlı bradikinin kasılma yanıtları kaydedildi. Buna göre, deneysel astım indüklenen OL grubunda bradikinin (10^{-5} - 10^{-4} M) ile indüklenen kasılma yanıtları kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek ölçüldü. Ayrıca düşük doz DMF tedavisi uygulanan OL+DMF30 grubunda da bradikinin kasılma yanıtları OL grubu ile benzerdi, bradikinin ile kasılma oranı kontrole kıyasla anlamlı miktarda arttı. Yüksek doz DMF tedavisi uygulanan OL+DMF100 grubunda ise bradikinin (10^{-5} - 10^{-4} M) ile indüklenen kasılma yanıtları OL grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı oranda azaldı. Dahası, OL+DMF100 grubunda bradikinin kasılma yanıtlarında kontrole kıyasla anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 12. Farelerden izole edilen trakealardan elde edilen bradikinin indüklü kasılma yanıtlarının E_{maks} (%) değerleri.

Bradikinin	Kontrol	OL	OL+DMF30	OL+DMF100
E_{maks}	%30.41 $\pm$ 5.357	%60.38 $\pm$ 2.738	%62.32 $\pm$ 5.410	%17.61 $\pm$ 4.459

Tablo 13. Kontrol ve DMF 100 mg/kg/gün grubu farelerden izole edilen trakealarda elde edilen karbakol, 5-HT ve bradikinin kasılma yanıtlarının E_{maks} ve pD_2 değerleri (n=4)

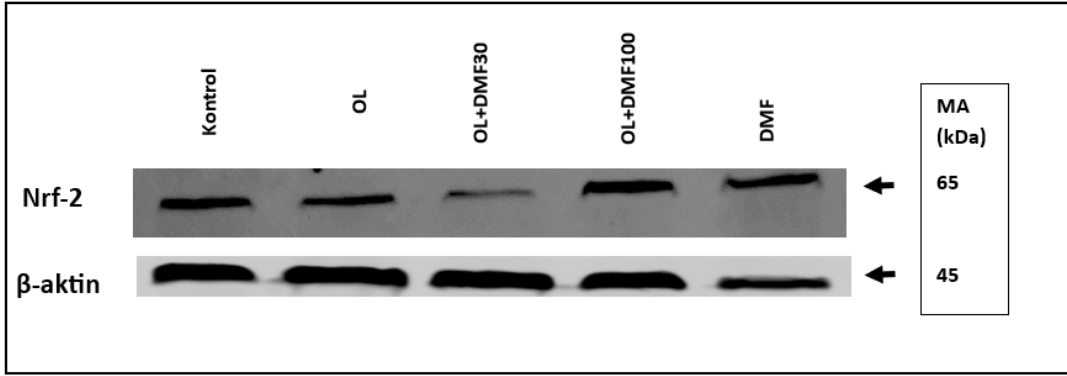
Kontrol+DMF 100 mg/kg	Karbakol	5-HT	Bradikinin
E_{maks}	0.8220±0.0802	%47.21±9.134	%28.67±6.048

4.2. Fare Total Akciğer Homojenatlarında Protein Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi İle Semi-Kantitatif Değerlendirilmesi

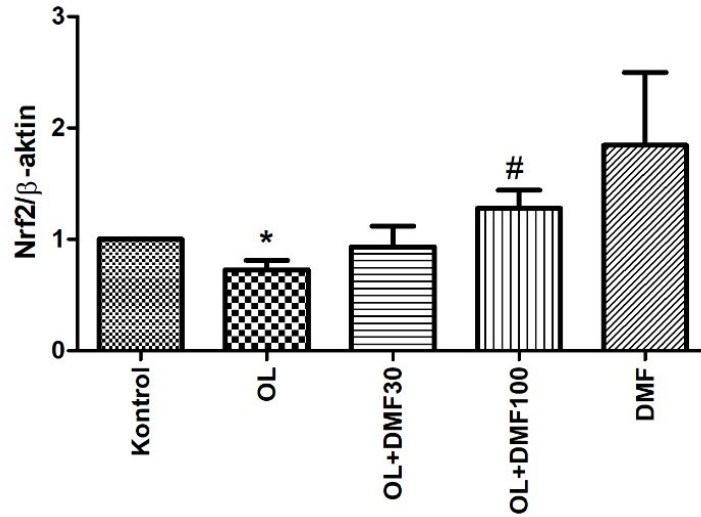
Ötenazi edilen hayvanlardan hızlıca akciğer dokuları izole edilerek Western blot deneylerine kadar -80 °C’de saklandı. Toplanan akciğer dokularında Nrf-2 ve HO-1 (Nrf2/Keap1 sinyal yolağı belirteçleri), Nf-κ B p65 ve p- Nf-κ B p65 (enflamatuvar yolak belirteçleri) , β-katenin ve Wnt-5A/B (Wnt yolağı biyobelirteçleri) , β-aktin proteinlerinin ekspresyonu western blot yöntemi ile yarı kantitatif olarak analiz edildi ve karşılaştırıldı. Tüm proteinlerin ekspresyonları, literatürden elde edilen bilgiler doğrultusunda astım modeli ve DMF tedavisi ile değişmediği bilinen β-aktin (housekeeping protein) protein ekspresyonuna göre değerlendirildi.

4.2.1. Fare Total Akciğer Homojenatlarında Nrf2/Keap-1/HO-1 Sinyal Yolağı Protein Ekspresyonu

Çalışmada, fare *in vivo* deneysel solunum yolu inflamasyonu modelinde, hücre içi antioksidan mekanizmaları indükleyen Nrf2/Keap1 sinyal yolağının aktivasyonu western blot analizi ile değerlendirildi. Buna göre OL grubundan izole edilen akciğer örneklerinde Nrf2 düzeyi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı. Nrf2 ekspresyonu OL+DMF30 grubunda OL grubuna göre anlamlı bir fark göstermedi, ancak OL+DMF100 grubunda OL grubuna kıyasla anlamlı bir artış saptandı (Şekil 17, *p<0.01, #p<0.05).

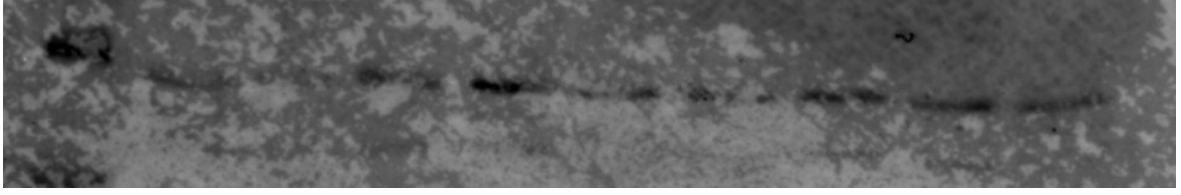


Şekil 16. Farelerden izole edilen akciğer dokularında Nrf2 protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü



Şekil 17. Farelerden izole edilen akciğer dokularında Nrf2 protein ekspresyonunun yarı kantitatif analiz grafiği (n=4-8/grup). Her bir kuyucuktaki protein ekspresyonu β-aktin ile normalize edilmiş ve kontrol grubundaki protein ekspresyonunun oranı olarak ifade edilmiştir. Veriler ortalama ±S.H olarak sunulmuştur (* p<0.01 kontrole kıyasla, # p<0.05 OL grubuna kıyasla)

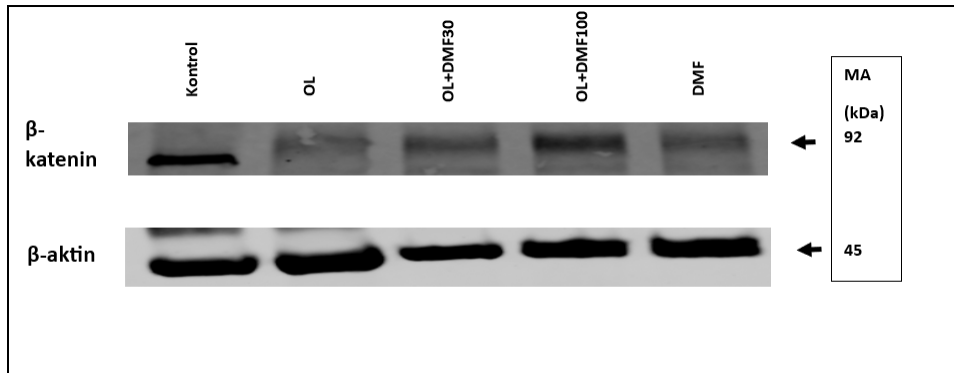
Deney gruplarındaki farelerden izole edilen akciğer homojenatlarında Nrf2'nin nükleer translokasyonu ile ekspresyonu artan HO-1 proteinin ekspresyonu da incelenmiştir. Elde edilen temsili görüntüde özellikle 100 mg/kg/gün DMF tedavisinin HO-1 eksoresyonunu arttırdığı izlenmekle birlikte (Şekil 18), tekrarlı deneylerimizde membrandan uygun şekilde görüntü alınamamasına bağlı olarak deney sonucu analiz edilememiştir.



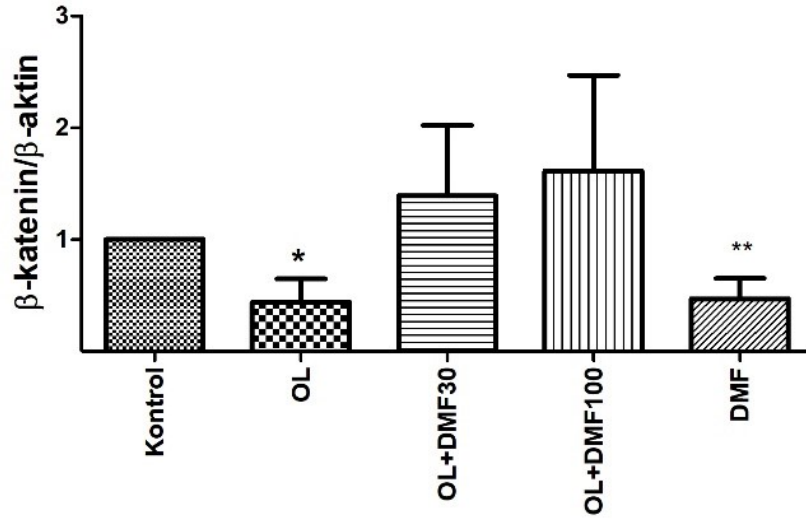
Şekil 18. Farelerden izole edilen akciğer dokularında HO-1 protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü

4.2.2. Fare Total Akciğer Homojenatlarında Kanonikal Wnt Sinyal Yolağı Protein Ekspresyonu

Çalışmada farede OVA ve LPS uygulaması ile indüklenen deneysel solunum yolu inflamasyonu modelinde akciğer dokusunda Wnt sinyal yolağında rol oynayan proteinlerin ekspresyonu western blot yöntemi ile incelendi. Deneylerimizden elde edilen sonuçlara göre, OL grubundan izole edilen akciğer homojenatlarındaki defosforile (aktif) β -katenin düzeyi kontrole kıyasla anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$). OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarında ise defosforile (aktif) β -katenin ekspresyonundaki azalmayı önledi, böylece OL+DMF30 ve OL+DMF100 gruplarında β -katenin düzeyi kontrol grubu ile benzer bulundu. Yalnızca DMF tedavisi uygulanan deney grubundaki farelerdeki β -katenin düzeyi ise kontrol grubuna göre anlamlı azaldı ($p<0.01$) (Şekil 20).

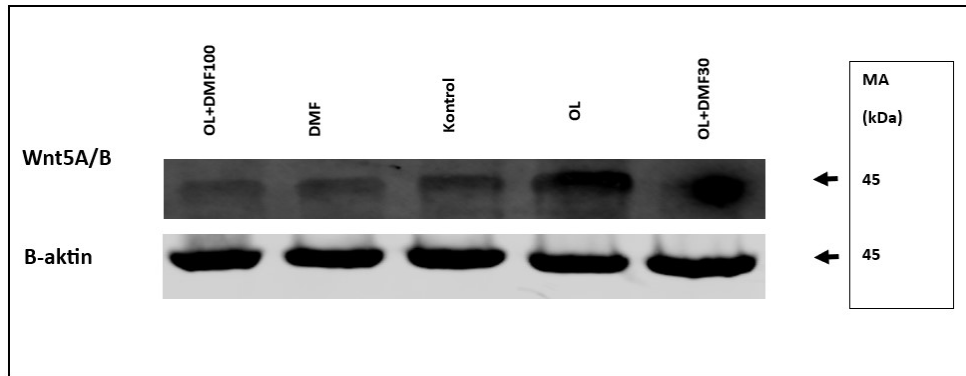


Şekil 19. Farelerden izole edilen akciğer dokularında β -katenin protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü

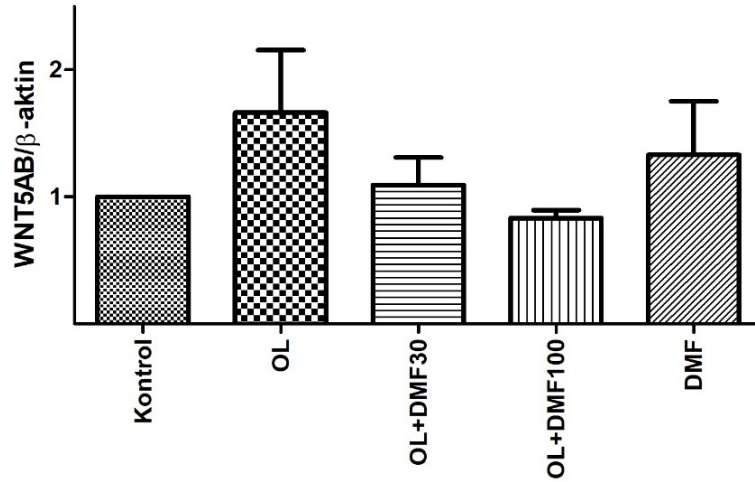


Şekil 20. Farelerden izole edilen akciğer dokularında β -katenin protein ekspresyonunun yarı kantitatif analiz grafiği (n=4-8/grup). Her bir kuyucuktaki protein ekspresyonu β -aktin ile normalize edilmiş ve kontrol grubundaki protein ekspresyonunun oranı olarak ifade edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak sunulmuştur (*p<0.05, ** p<0.01, kontrole kıyasla)

Ayrıca farelerden izole edilen akciğer homojenatlarında kanonik ve kanonik olmayan Wnt yolağının agonisti Wnt-5A/B'nin ekspresyon düzeyi ölçüldü. Deney grupları arasında Wnt-5A/B düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05) (Şekil 22).



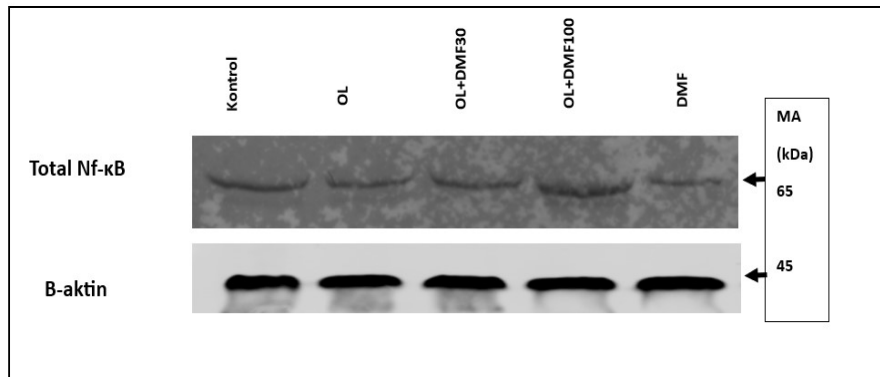
Şekil 21. Farelerden izole edilen akciğer dokularında Wnt-5A/B protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü.



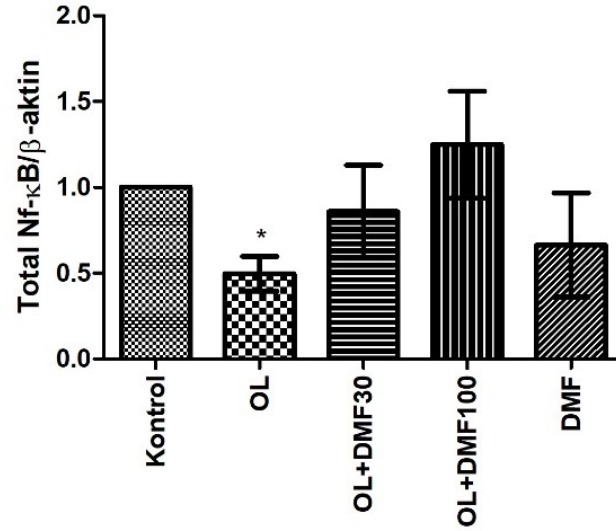
Şekil 22. Farelerden izole edilen akciğer dokularında Wnt-5A/B protein ekspresyonunun yarı kantitatif analiz grafiği (n=4-8/grup). Her bir kuyucuktaki protein ekspresyonu β-aktin ile normalize edilmiş ve kontrol grubundaki protein ekspresyonunun oranı olarak ifade edilmiştir. Veriler ortalama ±S.H olarak sunulmuştur.

4.2.3. Fare Total Akciğer Homojenatlarında Kanonikal Nf-Kb Sinyal Yolu Protein Ekspresyonu

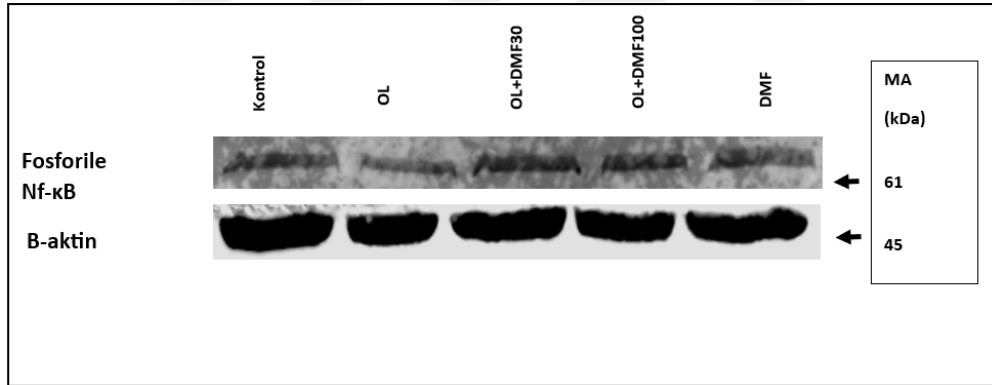
Çalışmada farede oluşturulan deneysel solunum yolu inflamasyonunda Nf-κB sinyal yolu ile ilişkili proteinlerin ekspresyonu ölçülerek bu sinyal yolunun aktivasyonu incelendi. Buna göre serin 276 bölgesinden fosforile edilmiş Nf-κB p65 proteini düzeylerinde deney grupları arasında anlamlı fark saptanamadı ($p>0.05$). Ancak total Nf-κB düzeyi OL grubunda kontrole kıyasla anlamlı şekilde azaldı ($p<0.05$). DMF tedavisi uygulanan OL+DMF30, OL+DMF100 ve kontrol DMF gruplarında ise total Nf-κB düzeyleri kontrol grubu ile benzer bulundu ($p>0.05$) (Şekil 24).



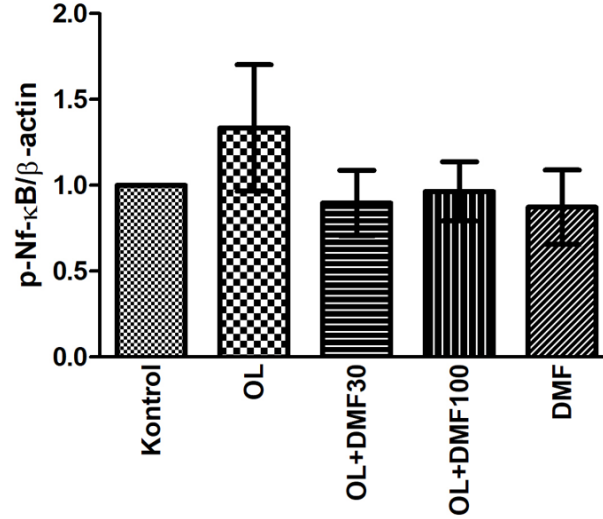
Şekil 23. Farelerden izole edilen akciğer dokularında total Nf-κB protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü



Şekil 24. Farelerden izole edilen akciğer dokularında total Nf-κB protein ekspresyonunun yarı kantitatif analiz grafiği (n=4-8/grup). Her bir kuyucuktaki protein ekspresyonu β-aktin ile normalize edilmiş ve kontrol grubundaki protein ekspresyonunun oranı olarak ifade edilmiştir. Veriler ortalama ±S.H olarak sunulmuştur. (*p<0.05, kontrol grubuna kıyasla)

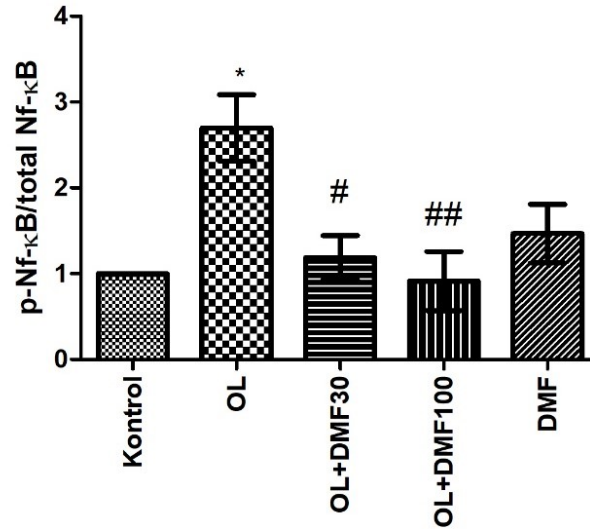


Şekil 25. Farelerden izole edilen akciğer dokularında fosforile Nf-κB protein ekspresyonunun temsili membran görüntüsü



Şekil 26. Farelerden izole edilen akciğer dokularında fosforile Nf-κB protein ekspresyonunun yarı kantitatif analiz grafiği (n=4-8/grup). Her bir kuyucuktaki protein ekspresyonu β-aktin ile normalize edilmiş ve kontrol grubundaki protein ekspresyonunun oranı olarak ifade edilmiştir. Veriler ortalama ±S.H olarak sunulmuştur.

Bununla birlikte fosforile Nf-κB (serin 276) miktarının total Nf-κB düzeyine oranı Nf-κB sinyal yolağının aktivasyonunun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Deneylerimizde fosforile Nf-κB düzeyinin total Nf-κB düzeyine oranı OL grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.05$). DMF tedavisi ile OL+DMF30 ($p<0.05$) ve OL+DMF100 ($p<0.01$) gruplarında fosforile Nf-κB'nin total Nf-κB düzeyine oranı OL grubuna göre anlamlı şekilde azaldı ve kontrol grubu değerlerine geri döndü. Kontrol ve kontrol+DMF gruplarında ise fosforile Nf-κB'nin total Nf-κB düzeyine oranı benzer bulundu ($p>0.05$) (Şekil 27).

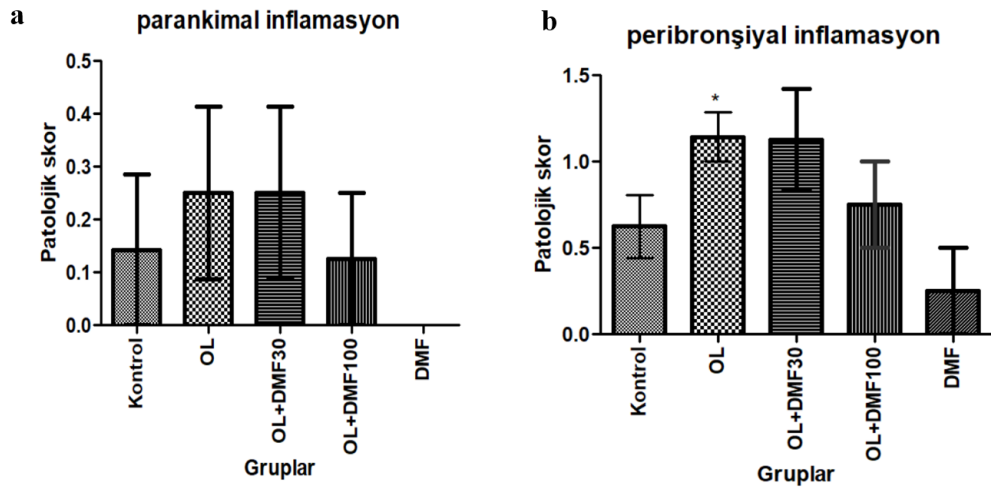


Şekil 27. Farelerden izole edilen akciğer dokularında fosforile Nf-κB protein ekspresyonunun total Nf-κB protein ekspresyonuna oranı (n=4-8/grup). (*p<0.05 kontrol grubuna kıyasla, #p<0.05, ##p<0.01 OL grubuna kıyasla)

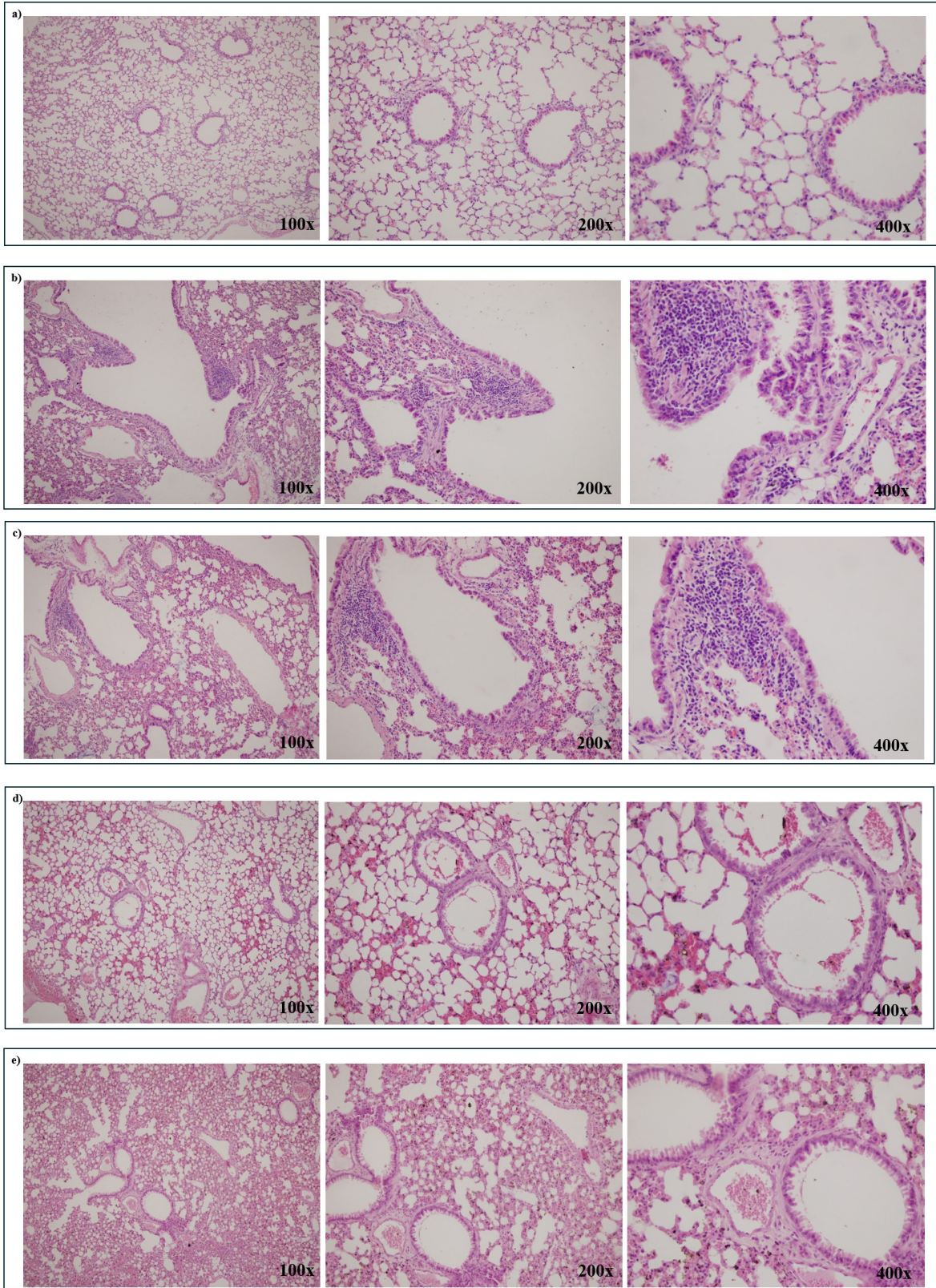
4.3. İzole Fare Akciğer Dokularının Histopatolojik Analizi

Çalışmada farelere OVA ve LPS uygulanarak in vivo deneysel solunum yolu inflamasyonu indüklendi. Farelerden izole edilerek fikse edilip parafine gömülen akciğer dokularından hazırlanan kesitler histopatolojik olarak incelendi. Bu amaçla akciğer kesitleri hematoxilen-eozin ile boyandıktan sonra mikroskop ile peribronşiyal ve parankimal inflamasyon parametrelerine göre puanlanarak değerlendirildi.

Akciğer kesitlerinde belirlenen parankimal inflamasyonla ilişkili puanlar deney grupları arasında benzer bulundu ($p>0.05$). Ancak OL grubunda peribronşiyal inflamasyon puanları kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek belirlendi ($p<0.05$). Ayrıca, OL+DMF30 grubunda peribronşiyal inflamasyon düzeyi OL grubunda gözlenen değerlere yakın düzeyde izlenirken, OL+DMF100 grubunda azalsa da OL grubuna kıyasla anlamlı azalma görülmedi (Şekil 28).



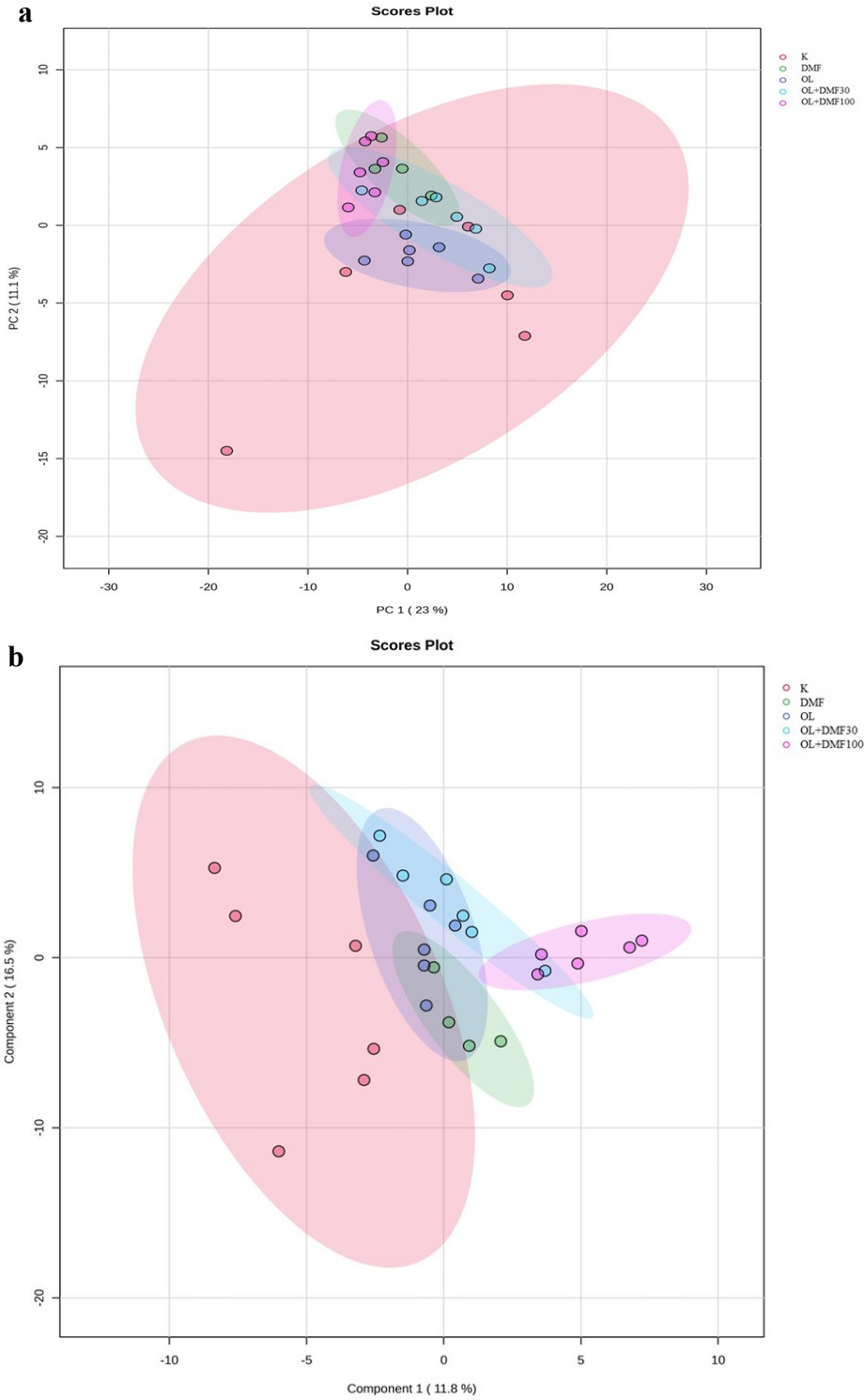
Şekil 28. (a) Farelerden elde edilen akciğer örneklerinde parankimal inflamasyon skorları. (b) Farelerden elde edilen akciğer örneklerinde peribronşiyal inflamasyon skorları. Değerler yarı-kantitatif olarak ifade edildi ve ortalama $\pm$ SH olarak verildi. (* $p < 0.05$, kontrol grubuna kıyasla)



Resim 12. Akciğer dokularında histopatolojik analiz görüntüleri. (a) Kontrol grubu histopatolojik analiz görüntüleri. (b) OL grubu histopatolojik analiz görüntüleri. (c) OL+DMF30 grubu histopatolojik analiz görüntüleri. (d) OL+DMF100 grubu histopatolojik analiz görüntüleri. (e) DMF grubu histopatolojik analiz görüntüleri.

4.4. İzole Fare Akciğer Dokularının Metabolomik Analizi

Çalışmada OVA ve LPS uygulaması ile *in vivo* deneysel solunum yolu inflamasyonu indüklenen farelerin akciğer sol lobu izole edilerek homojenize edildi. Akciğer homojenatlarında karbonhidrat, yağ asidi, aminoasit ve protein metabolizması ile enerji üretimi gibi başlıca biyokimyasal sinyal yollarında önemli rol oynadığı bilinen metabolitler kantitatif analiz edildi. Ölçüm sonuçlarına göre uygulanan temel bileşenler analizinde (PCA) metabolitlerin deney grupları içinde homojen dağılım gösterdiği tespit edildi (Şekil 30). Ardından yapılan kısmi en küçük kareler ayırmacı analizinde (PLS-DA) ise deney grupları metabolit içerikleri yönünden ayrıştırılarak, gruplar arasındaki farklılığı sağlayan metabolitler belirlendi (Şekil 30). PLS-DA analizinde projeksiyondaki değişkenlerin önemi (*Variable Importance in Projection, VIP*) puanları tespit edildikten sonra, bu değerin birden büyük (>1) olduğu metabolitler deney grupları arasında ayrımı sağlayan biyobelirteç metabolitler olarak belirlendi.

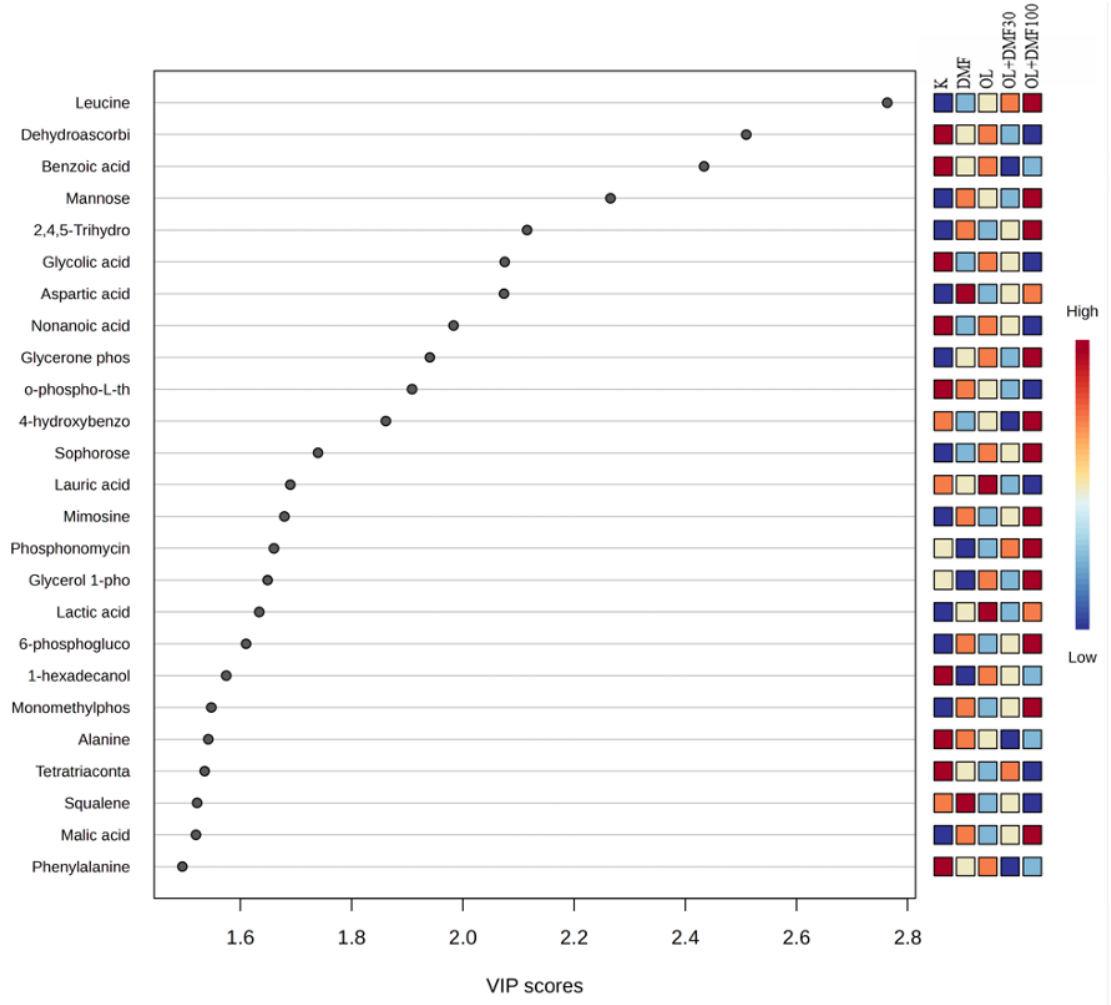


Şekil 29. Kontrol, kontrol+DMF, OL, OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarındaki farelerden elde edilen akciğer homojenatlarının metabolomik analizinden elde edilen temel bileşenler analizi (PCA) grafiği (a) ve kısmi en küçük kareler ayırıcı analizi (PLS-DA) grafiği (b).

Akciğer homojenatlarında GC-MS ile yapılan metabolomik analizler sonucunda tanımlanan metabolitler Tablo 14’te sunulmuştur.

Tablo 14. GC-MS analizi sonucunda akciğer homojenatlarında tanımlanan metabolitler

10-hydroxydecanoic asit	Glikoz	Oksalik asit
1-heksadekanol	Glikoz 6 fosfat	Palmitik asit
1-metil nikotinamid	Glukuronik asit	Palmitoleik asit
1-metilhidantoin	Glutamik asit	Pantotenik asit
2,4,5-Trihidroksipentanoik asit	Glutamin	Pinekolik asit
2,4-Bishidroksibutanoik asit	Gliseraldehit	Porfin
2-amino-2-metil 1,3-propanediol	Gliserik asit	Prolin
2-hidroksipüridin	Gliserol	Pürin ribozid
2-keto-L-glukonik asit	Gliserol 1-fosfat	Piroglutamik asit
3,4-dihidroksifenil glukol	Gliseron fosforik asit	Pirofosfat
3-aminoizobütirik asit	Glisin	Ribitol
3-fosfogliserat	Glisin deüteryum d5	Ribonik asit gamma lakton
4-aminofenol	Glikolik asit	Riboz 5 fosfat
4-hidroksibenzoik asit	Halostakin	Ribuloz 5 fosfat
5-aminoimidazol 4-karboksamid	Heptadekanoik asit	Sakkarik asit
5-aminovalerik asit	Homoserin	Sellobioz
5-beta-androstan-3,17-dion	Hidroksiüre	Serin
5-beta-kolestan-3-alpha-7-alpha-12-alfa-triol	Hipotaurin	Sedoheptüloz anhidrit monohidrat
5'-deoksi-5'-(metiltiyo) adenzin	İminodiasetik asit	Sitramalik asit
6 fosfoglukonik asit	Inosin	Sitrik asit
Asetil L serin	Izolösin	Sistein
Adenzin-5-monofosfat	Izomaltoz	Sistidin
Alanin	Kaprik asit	Sitidin 5 monofosfat
Allo-inositol	Kreatinin	Skualen
Alloz	Ksilitol	Stearik asit
Araşidik asit	Kolesterol	Stigmasterol
Askorbik asit	Laktoz	Sophoroz
Aspartik asit	Laktuloz	Sükkinik asit
Behenik asit	Laurik asit	Sükroz
Benzen-1,2,4-triol	Lösin	Şikimik asit
Benzoik asit	Linoleik asit	Tagatoz
Beta-alanin	Lisin	Taloz
Beta-glutamik asit	Liksoz	Tartarik asit
Beta-gliserolfosfat	Malik asit	Testosteron
Bifenil	Malonik asit	Tetatriaseton
Dehidroaskornik asit	Maltoz	Threitol
D-Glukoz-6-fosforik asit	Maltotrioz	Treo-beta hidroksiaspartik asit
Dioktil ftalat	Mannitol	Threonik asit
Eritroz-4-fosfat	Mannoz	Threonin
Estron	Melezitose	Threoz
Fenilalanin	Metionin	Timin
Fitalik asit	Metil linoleat	Tirozin
Fluroglukinol	Metil oleat	Uracil
Fosfonomisin	Metil palmitat	Üre
Fosforik asit	Metil stearat	Uridin 5'-monofosfat
Fruktoz	Metil beta-D-galactopiranozid	Valine
Fumarik asit	Mimozin	N-asetil-D-mannoz amin
Galaktinol	Monometilfosfat	N-asetil-L-glutamik asit
Galaktoz	Miyo-inositol	N-Dotriakontan
Galakturonik asit	Miristik asit	N-etilglisin
Glukoheptonik asit	Nonanoik asit	N-metil-DL-glutamik asit
Glukonik asit	Oksaloasetik asit	O-fosfo-L-serine
Glukonik asit lakton	Oleik asit	O-fosfo L-treonin
Glukopiranoz	Ornithin	O-fosfokolamin



Şekil 30. Kontrol, DMF, OL, OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarının metabolomik analizinde, gruplar arası ayrımı sağlayan metabolitlerin *Variable Importance in Projection (VIP)* puanları ile metabolitlerin düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik.

Buna göre lösin, dehidroaskorbik asit, benzoik asit, mannoz, 2,4,5-trihidroksipentanoik asit, glikolik asit, aspartik asit, nonanoik asit, gliseron fosfat, O-fosfo-L-tirozin, 4-hidroksibenzoik asit, soforoz, laurik asit, mimozin, fosfomisin, gliserol-1-fosfat, laktik asit, 6-fosfoglikoz, 1-heksadekanol, monometilfosfat, alanin, tetratriakontan, skualen, malik asit ve fenilalanin gibi metabolitlerin düzeyleri deney grupları arasında farklılık gösterdi (Şekil 30).

4.4.1. Aminoasit Metabolizmasında Rol Oynayan Metabolitlerin Analizi

Lösin ve aspartik asit düzeyi OL grubunda kontrole kıyasla arttı, DMF tedavisi ise doza bağımlı şekilde daha fazla artırdı. Alanin, fenilalanin ve O-fosfo-L-tirozin düzeyleri

ise OL grubuna göre kontrol grubunda daha düşük bulundu. DMF tedavisi ise bu metabolitlerin düzeyini OL grubuna göre azalttı (Şekil 31-36).

4.4.2. Karbonhidrat Metabolizmasında Rol Oynayan Metabolitlerin Analizi

Kontrol+ DMF grubu akciğer dokularında D-glikoz-6-fosfat, glikoz-6-fosfat, mannoz, malik asit, pürin ribozid, glikoz, 2-keto-L-glukonik asit, bifenil, laktik asit, galaktoz, sitidin, liksoz, sitramalik asit, 3-fosfogliserol, aspartik asit, pirofosfat, 6-fosfoglukonat seviyesi kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmıştır. Benzoik asit, glukuronik asit, fruktoz, gliserol, dehidroaskorbik asit, glukopiranoz ve fruktoz seviyelerinde ise anlamlı azalma gözlemlenmiştir. D-glukoz-6-fosfatın seviyesinin ise gruplar arasında çok güçlü ayırt edici özellik taşıyan (VIP>2.4) seviyede olduğu tespit edilmiştir. Karbonhidrat metabolizması ile glikolizde önemli mannoz, soforoz, gliseron fosfat, gliserol-1-fosfat ve laktik asit metabolitleri OL grubu farelerin akciğer homojenatlarında kontrole kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulundu. DMF tedavisi ile OL+DMF30 grubunda bu metabolitlerin düzeylerini OL grubuna göre azaltırken, aksine tedavi uygulaması OL+DMF100 grubunda metabolit düzeylerinin artmasına sebep oldu. Benzer şekilde mannoz, soforoz, gliseron fosfat ve laktik asit kontrol+DMF grubunda kontrol grubuna kıyasla artarken, gliserol-1-fosfat düzeyi azaldı. Ayrıca akciğer dokusunda 6-fosfoglukoz ve malik asit metabolitlerinin düzeyleri OL grubunda kontrole göre arttı. OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarında ise bu metabolitlerin düzeylerinde OL grubuna kıyasla doza bağımlı şekilde artış saptandı. Ayrıca glikolik asit düzeyi OL grubunda kontrole göre düşük bulundu, DMF tedavisi de glikolik asit düzeyini OL grubuna kıyasla doza bağımlı şekilde azalttı (Şekil 31-36).

4.4.3. Lipit ve Yağ Asidi Metabolizmasında Rol Oynayan Metabolitlerin Analizi

Nonanoik asit ve 1-heksadekanol düzeyleri OL grubunda kontrole kıyasla düşük bulundu. DMF tedavisi ise bu metabolitlerin düzeylerini OL grubuna göre doza bağımlı şekilde azalttı. DMF tedavisi uygulanan kontrol+DMF grubunda da benzer şekilde nonanoik asit ve 1-heksadekanol düzeyleri kontrole kıyasla düşük bulundu. Laurik asit düzeyi OL grubunda kontrole göre yüksek ölçüldü. OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarında ise laurik asit düzeyi OL grubuna göre doza bağımlı şekilde azaldı. DMF tedavisi uygulanan kontrol+DMF grubunda da benzer şekilde nonanoik asit, 1-heksadekanol ve laurik asit düzeyleri kontrole kıyasla düşük bulundu. Tetratriakontan ve skualen metabolit düzeyleri ise OL grubunda, kontrole kıyasla azaldı. Ancak OL+DMF30

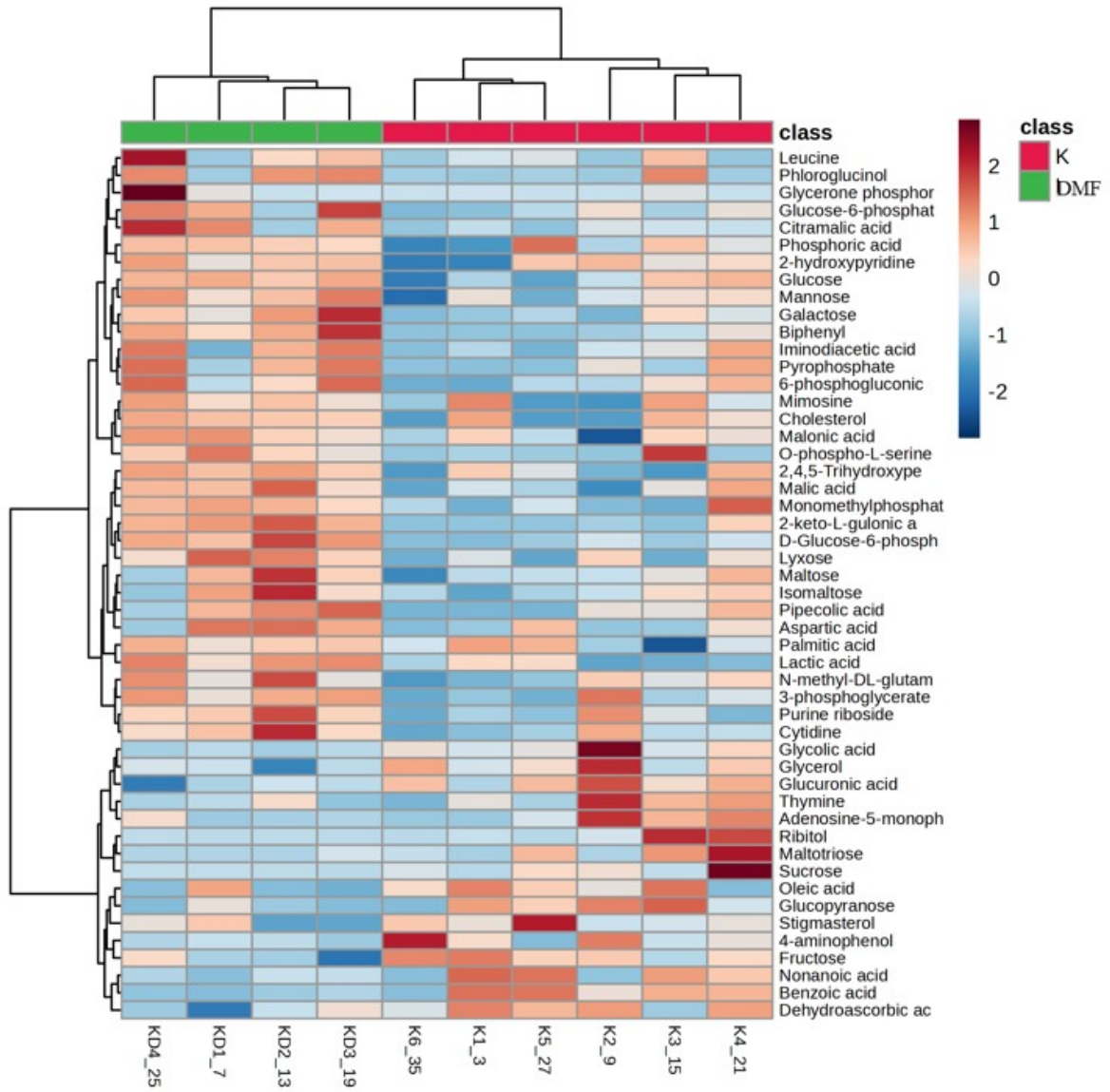
grubunda tetratriakontan ve skualen düzeyleri OL grubuna göre artarken, OL+DMF100 deney grubunda düşük bulundu. Kontrol+DMF deney grubunda tetratriakontan düzeyi kontrole göre azalırken, skualen düzeyi arttı (Şekil 31-36).

4.4.4. Aromatik ve Sekonder Metabolitlerin Analizi

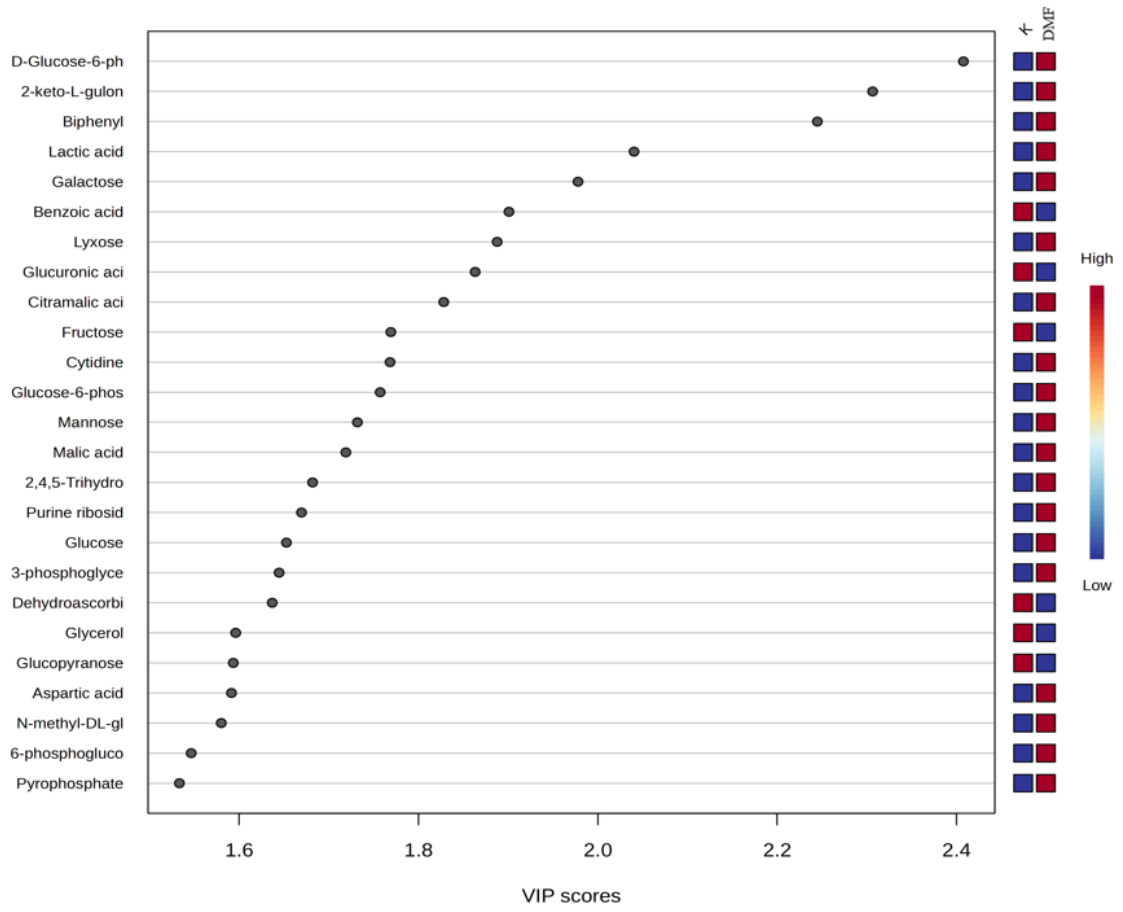
Benzoik ve 4-hidroksibenzoik asit düzeyleri OL grubunda kontrol grubuna göre azaldı, ayrıca OL+DMF30 deney grubunda OL grubuna göre daha düşük bulundu. OL+DMF100 grubunda ise benzoik asit OL grubuna göre azalırken, 4-hidroksibenzoik asit düzeyi tersine OL grubuna göre yüksek bulundu. Kontrol+DMF deney grubunda ise DMF tedavisi benzoik ve 4-hidroksibenzoik asit düzeylerini kontrole göre azalttı. Mimosin ve 2,4,5-trihidroksipentanoik asit metabolitleri OL grubunda kontrole kıyasla yüksek bulundu. DMF tedavisi ise bu metabolitlerin düzeyini OL grubuna göre doza bağımlı şekilde artırdı. Ayrıca kontrol+DMF deney grubunda bu metabolitlerin düzeyi kontrole göre yüksek bulundu (Şekil 31-36).

4.4.5. Diğer: Dehidroaskorbik Asit, Monometil Fosfat ve Fosfonomisin

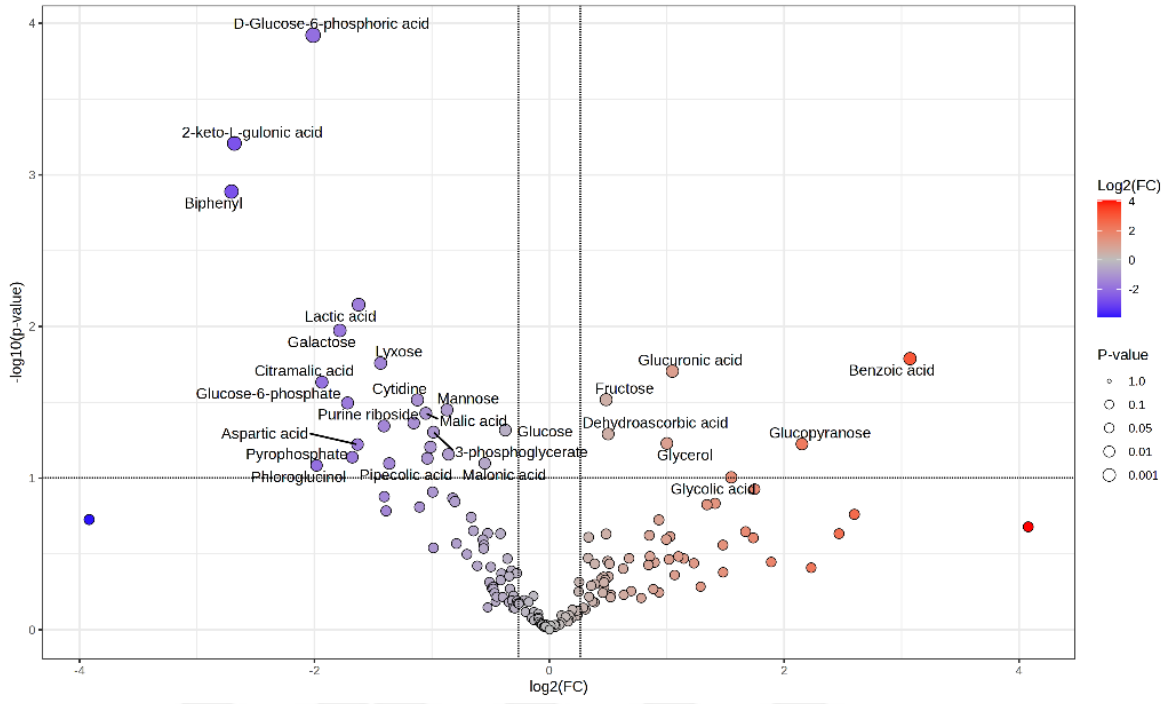
Hücre içi antioksidan savunma sistemlerinde önemli bir metabolit olan dehidroaskorbik asit düzeyi OL grubunda kontrole göre düşük bulundu. OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarında da OL grubuna göre doza bağımlı şekilde azaldı. Dehidroaskorbik asit düzeyi kontrol+DMF grubunda kontrole göre daha düşük ölçüldü. Ancak monometil fosfat metabolitinin düzeyi OL grubunda kontrole göre arttı. DMF uygulaması ise OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarında monometil fosfat düzeyini DMF dozuna bağlı şekilde OL grubuna göre artırdı. DMF tedavisi ise kontrol+DMF grubunda da monometil fosfat metabolitinin kontrol grubuna göre artmasına neden oldu. Fosfonomisin metaboliti OL grubunda kontrole göre azaldı. DMF tedavisi de OL+DMF30 ve OL+DMF100 deney gruplarında OL deney grubuna göre fosfonomisin düzeylerini DMF dozuna bağlı şekilde artırdı. Kontrol+DMF grubunda ise fosfonomisin düzeyi kontrol grubuna göre düşük bulundu (Şekil 31-36).



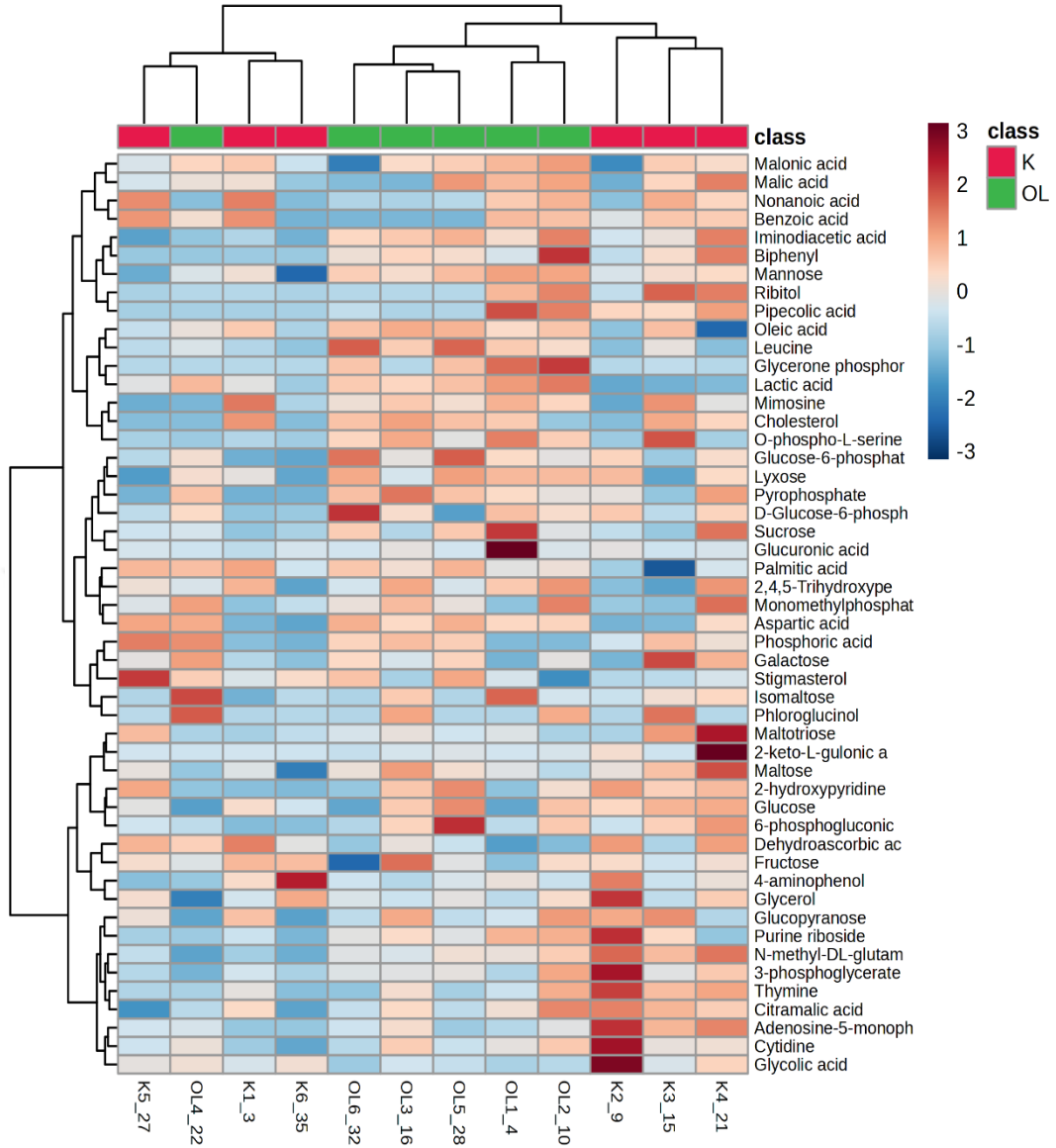
Şekil 31. Kontrol ve kontrol+ DMF gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarındaki metabolit ekspresyonlarının ısı haritası (heat map) ile gösterimi.



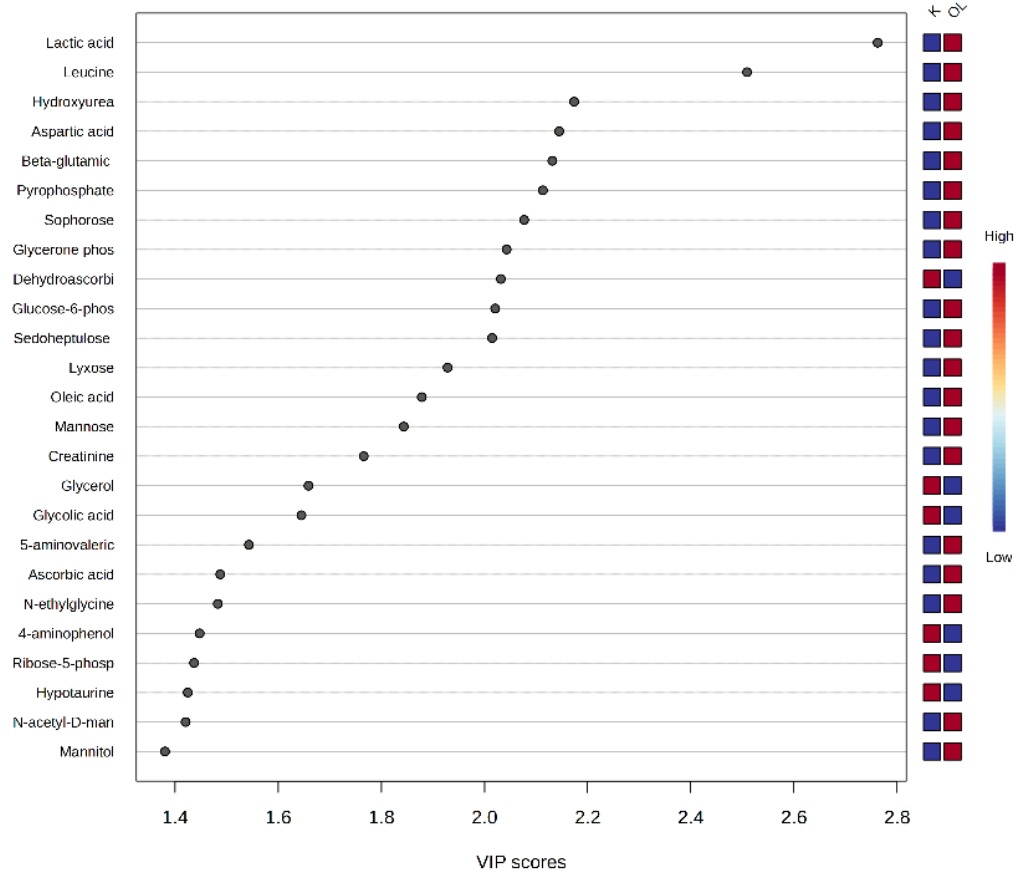
Şekil 32. Kontrol ve kontrol+DMF deney gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarının metabolomik analizinde, gruplar arası ayrımı sağlayan metabolitlerin VIP puanları ile metabolitlerin düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik.



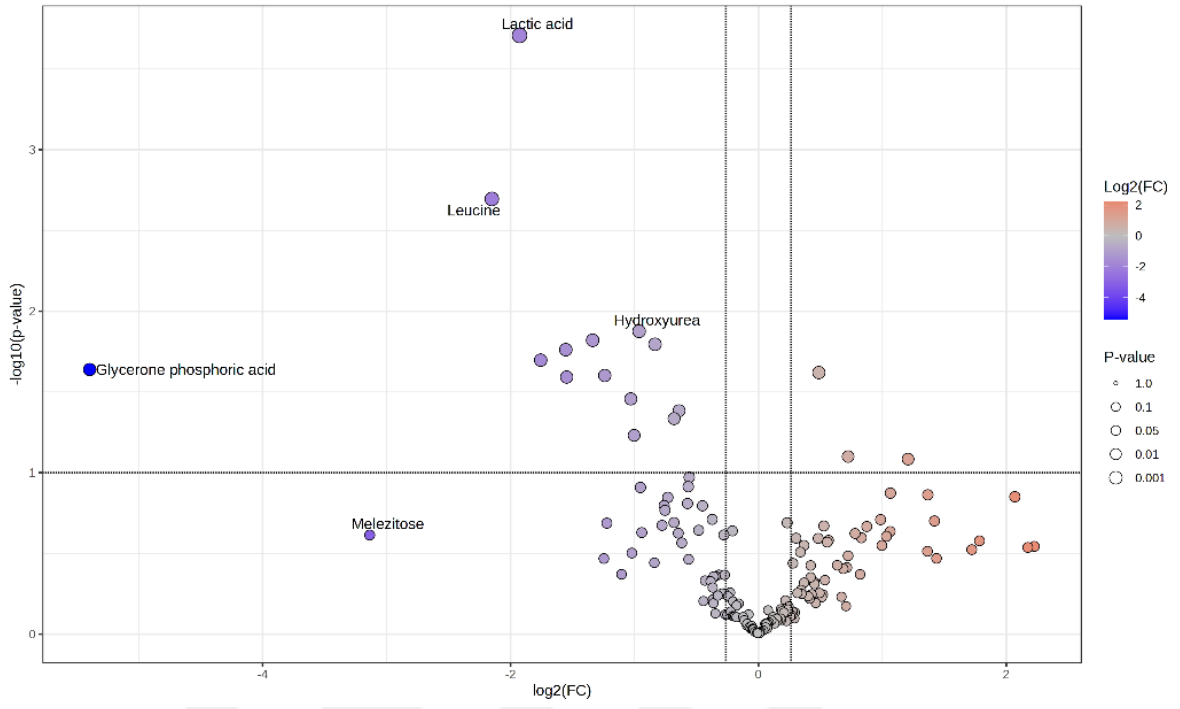
Şekil 33. Kontrol ve kontrol+DMF deney gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarının karşılaştırmalı metabolomik analizine ait yanardağ (volcano plot) grafiği.



Şekil 34. Kontrol ve OL gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarındaki metabolit ekspresyonlarının ısı haritası (heat map) ile gösterimi.



Şekil 35. Kontrol ve OL deney gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarının metabolomik analizinde, gruplar arası ayrımı sağlayan metabolitlerin *VIP* puanları ile metabolitlerin düzeylerinin karşılaştırılmasını gösteren grafik.



Şekil 36. Kontrol ve OL deney gruplarından elde edilen akciğer homojenatlarının karşılaştırmalı metabolomik analizine ait yanardağ (volcano plot) grafiği.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada OVA ile sensitize edilen farelere ardışık olarak i.n. OVA ve LPS uygulaması yapılarak solunum yolu enfeksiyonu ile tetiklenen deneysel astım modeli oluşturuldu. Klinikte MS ve psöriazis gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olan DMF'nin solunum yolu inflamasyonu ile ilişkili hastalıklarda olası etkinliğini değerlendirmek amacıyla farede indüklenen deneysel astım modelinde DMF tedavisinin solunum yolu hiperreaktivitesi, peribronşiyal ve parankimal inflamasyon ile immunometabolizma üzerine etkileri ve bu etkiye aracılık eden olası etki mekanizmaları incelendi.

Astım nefes darlığı, öksürük, hırıltılı solunum, mukus üretiminde artış ve solunum yolu hiperreaktivitesi gibi klinik belirtilerle karakterize edilen bir hastalıktır. Klinikte alerjik astım, nötrofilik astım ve obezite ile ilişkili astım gibi farklı astım fenotipleri mevcuttur. Hastalık belirtilerinin daha sık ve şiddetli görüldüğü epizodik alevlenme dönemleri alerjen maruziyeti veya solunum yolu enfeksiyon gibi faktörlerle tetiklenir. Farede sistemik veya solunum yoluna lokal olarak OVA uygulanması; Th2 hücrelerinin farklılaşmasına, Th2 tipi sitokinlerin üretiminde artışa, solunum yolunda eozinofili, histopatolojik değişiklikler ve bronşiyal hiperreaktivite gibi klinik astıma benzer özelliklerin ortaya çıkmasına yol açan, literatürde yaygın olarak kullanılan ve kabul edilmiş bir deneysel modeldir (157, 158). LPS ise gram negatif bakteri hücre duvarı bileşenidir ve TLR4 reseptörleri aracılığı ile immün sistemi aktive ederek inflamatuvar yanıt oluşturur. Aynı zamanda hava kirliliği ve sigara dumanı kronik maruziyette solunum yolu inflamasyonuna neden olan faktörlerde de belirli oranda LPS kontaminasyonu bulunmaktadır. LPS uygulaması bakteriyel enfeksiyona bağlı gelişen doğal immün reaksiyonu oldukça iyi yansıtan, literatürde uzun zamandır kapsamlı şekilde benimsenmiş inflamasyon modeli oluşturur. Klinikte astım belirtilerinin daha belirgin hale geldiği epizodik alevlenme döneminin deneysel olarak oluşturulması için OVA ve LPS kombinasyonu kullanılmaktadır. Böylece Th2 ve Th1 tip lenfosit aracılı inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır. Bu deneysel modelde hem eozinofili hem de nötrofil aktivasyonu gelişmektedir (6, 149).

Çalışmada deneysel astım modeli oluşturulan farelerden izole edilen trakea dokularının karbakol, 5-HT ve bradikinin ile indüklenen konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtları izole organ banyosu yöntemi ile incelendi. Farede OVA ve LPS ile oluşturulan

solunum yolu inflamasyonunda karbakol ile indüklenen kasılma yanıtları değişmezken, 5-HT ve bradikinin kasılma yanıtlarının kontrole karşı arttığı ve bu modelde 5-HT ve bradikinine karşı trakeal hiperreaktivite geliştiği gösterildi.

Solunum yolu remodellingi ve sinir inervasyonundaki değişiklikler solunum yolu düz kasının kasıcı uyaranlara duyarlılığının artmasına ve bronşiyal hiperreaktiviteye neden olmaktadır (159, 160). Çeşitli çalışmalarda deneysel inflamasyon modellerinde solunum yolu düz kasında *in vitro* karbakol kasılma yanıtının değişmediği gösterilmiştir (161-163). Deneysel astım modellerinde rodentlerde solunum yollarında ve pulmoner damarlarda; insanlarda astım patogenezinde önemli rol oynayan başta histamin olmak üzere lökotrien C4, platelet aktive edici faktör ve adenosin yanıtlarının çok zayıf olmasından ötürü karbakol ve 5-HT indüklü yanıtlar astım araştırmalarında önemlidir (164). Astım patogenezinde ve astım ile ilişkili solunum yolu inflamasyonunda 5-HT_{2A} reseptörleri önemli rol oynamaktadır. Birçok prelinik çalışmada, farelerden izole edilen trakea ve bronş preparatlarında 5-HT reseptörlerinin aracılık ettiği konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtı gösterilmiştir (165-167). Çeşitli deneysel astım modellerinde yapılan *ex vivo* çalışmalarda, trakea ve bronşiyol dokuların 5-HT_{2A} reseptör antagonisti ketanserin ile inkübasyonu 5-HT ile indüklenen kasılma yanıtlarını azaltmıştır (168). Ayrıca farelerden izole edilen trakea ve bronş preparatlarında, 5-HT presinaptik 5-HT_{2A} reseptörlerini aktive ederek kolinerjik sinir uçlarından asetilkolin salıverilmesini artırmaktadır; salıverilen asetilkolin ise muskarinik (M3) reseptörler üzerinden 5-HT ile indüklenen kasılma yanıtına aracılık etmektedir (169). Diğer bazı çalışmalarda ise izole fare trakeasında 5-HT₃ reseptörlerinin de 5-HT kasılmasına aracılık ettiği raporlanmıştır (170).

Astım patogenezinde bradikinin solunum yolunda inflamatuvar yanıtları tetikleyerek bronkokonstriksiyona neden olduğu bilinmektedir. Astım hastalarından elde edilen BAL sıvı örneklerinde kinin düzeylerinin ve akciğer düz kas hücrelerinde B2 reseptör ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre yüksek bulunmuştur (171, 172). LPS ile indüklenen akut solunum yolu inflamasyon modellerinde, LPS'nin B1 reseptörleri upregüle ettiği ve bradikininin B1 reseptörler aracılı inflamatuvar yolları aktive ettiği gösterilmiştir (173). Fare trakeasında bradikinin B2 reseptörleri aracılığı ile konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtı oluşturur (174). Ancak kinin benzeri bir madde olan bradikinin solunum yolunda eksprese edilen kininaz enzimi aracılığı ile hızlıca inaktive

edilmektedir (175). Çalışmada kininaz enzim inhibitörü kaptopril ile inkübe edilen fare trakea halkalarından bradikinin kasılma yanıtları alınmıştır.

Çalışmamızda DMF'nin karbakol, 5-HT ve bradikinin ile indüklenen trakeal kontraktilite üzerine etkileri araştırılmıştır. Jaiswal ve arkadaşları tarafından yapılan deneysel çalışmada, ev tozu akarı ile sensitize edilen deney farelerine 0.5 mg/kg DMF i.n. uygulanmıştır. Metakolin testi ile havayolu duyarlılığı değerlendirilen farelerde, provokasyon testi ile elde edilen direnç değerlerinde azalma görülmüştür (143). Çalışmamız kapsamında, DMF 5-HT ve bradikinin ile artmış kontraktıl yanıtlarda özellikle yüksek doz (100 mg/kg) ile anlamlı azalma sağlamıştır. 100 mg/kg DMF tedavisi ile, bradikinin ile indüklenen trakeal kontraktilitede kontrole yakın iyileşme gözlemlenmiştir.

Çalışmada deneysel astım modeli ile solunum yolu inflamasyonu uygulanan farelerde DMF tedavisinin etkilerine aracılık eden olası hücresel mekanizmaları incelemek amacıyla akciğer homojenatlarında, Nrf2/Keap1 sinyal yolağı ile ilişkili proteinlerin ekspresyonu incelendi. Sonuçlarımız, yüksek doz sistemik DMF tedavisinin solunum yolu inflamasyonu sonucu ortaya çıkan Nrf2 ekspresyonundaki inhibisyonu önlediğini göstermektedir.

Nrf2, hücre içinde antioksidan mekanizmaları ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu indükleyen bir transkripsiyon faktörüdür (176). Bazal koşullarda Nrf2, inhibitör protein Keap1 ile kompleks oluşturarak sitoplazmada stabil şekilde tutulur (177). Duan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, OVA ile oluşturulan astım modelinde Nrf2 ekspresyonunun kontrole kıyasla azaldığı gösterilmiştir (178). Ayrıca bir diğer çalışmada OVA uygulanan farelerden izole edilen akciğer dokusunda Nrf2 ekspresyonunun baskılandığı, O-metillenmiş flavon türevi olan eupatilin tedavisinin ise Nrf2 ekspresyonunu aktive ederek inflamatuvar sitokin ve ROS üretimini, aynı zamanda akciğerdeki histopatolojik değişiklikleri önlediği raporlanmıştır (179).

Benzer şekilde Cen ve arkadaşları HEK293T hücrelerinde DMF'nin doza bağımlı şekilde Nrf2 sinyal yolağını aktive ederek hücre içi antioksidan yanıt elemanlarının ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir. Aynı çalışmada CD4-spesifik Nrf2 geni silinmiş farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modeli uygulanmış; bu farelerde DMF tedavisi, *naive* farelerde gözlenen koruyucu etkinin aksine, artmış IgE düzeyleri, sitokin salıverilmesi, mukus üretimi, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve solunum yolu inflamasyonunu önlememiştir (180).

Buna göre sonuçlarımız literatürdeki verilerle uyumludur. Deneysel astım modelinde Nrf2 ekspresyonunun indüklenmesi DMF'nin solunum yolu inflamasyonundaki terapötik etkilerine katkı sağlıyor olabilir.

Çalışmada astım modeli oluşturulan farelerden izole edilen akciğer dokusunda sistemik DMF tedavisinin Wnt sinyal yolağı üzerine etkisi incelendi. Sonuçlarımız inflamasyon ile ilişkili olarak akciğer homojenatlarında aktif β -katenin düzeyinin azaldığını gösterdi. İntragastrik olarak uygulanan DMF tedavisi ise hem düşük hem de yüksek dozda inflamasyon sonucu değişen aktif β -katenin düzeylerini kontrol grubundaki seviyelere benzer hale getirdi. Kanonik ve kanonik olmayan Wnt yolağının agonisti Wnt-5A/B'nin akciğer dokusundaki ekspresyonu ise solunum yolu inflamasyonu veya DMF tedavisi ile değişmedi. Ayrıca bu çalışmada farelerden elde edilen akciğer homojenatlarında Nf- κ B sinyal yolağında rol oynayan proteinlerin ekspresyon düzeyi incelendi. Elde edilen bulgularımız solunum yolu inflamasyonu ile ilişkili olarak Nf- κ B sinyal yolağının aktive olduğunu, sistemik DMF tedavisinin ise hem düşük hem de yüksek dozda Nf- κ B yolağının aktivasyonunu önlediğini gösterdi.

Wnt sinyal yolağının embriyogenezis, fibrozis ve inflamasyonda önemli rol oynadığı bilinmektedir (116). Wnt yolağı solunum epiteli, dendritik hücre, makrofaj, T lenfosit ve fibroblast gibi birçok farklı hücre türünde proliferasyonu ve hücre farklılaşmasını indükler (181). Ayrıca kronik inflamatuvar solunum yolu hastalıklarında fibrotik değişiklikler ile inflamatuvar yanıtı indüklediği gösterilmiştir (131). Wnt sinyal yolağı memeli canlılarda farklı alt tipleri bulunan glikoprotein yapısında endojen agonistler tarafından aktive edilir. Wnt yolağı agonistleri hücre membranında yerleşik Frizzled reseptörü ve LRP5/6 koreseptörü ile etkileşerek sinyal yolağının aktivasyonuna neden olur (115, 116). Wnt sinyal yolağı β -katenin bağımlı kanonik ve kanonik olmayan sinyal yolağı olarak ikiye ayrılır (110). Kanonik Wnt yolağının aktivasyonu serin 9 bölgesinden GSK-3 β 'yi fosforile ederek bu proteinin inhibisyonuna neden olur (182). GSK-3 β 'nin inhibisyonu sonucu β -katenin yıkım kompleksi dağılır ve β -katenin'i fosforile edemez. Fosforile olmayan β -katenin proteozomal degradasyondan korunarak stabilize olur ve aktif hale geçer. Aktif haldeki β -katenin hücre çekirdeğine transloke olarak TCF/LEF ile hedef genlerin transkripsiyonunu indükler (115, 116).

İntrauterin dönemde kanonik Wnt yolağının aktivasyonu solunum yolu düz kası gibi akciğer oluşturan çeşitli histolojik yapıların gelişiminden sorumludur (183, 184).

Astım gelişiminde aktive olduğu bilinen *family with sequence similarity 13 member A* (FAM13A) geninin transkripsiyonu β -katenin'in aktif forma dönüşerek hücre içinde agregasyonuna neden olmaktadır (44). Ayrıca literatürde mevcut olan birçok çalışmada Wnt sinyal yolağının disfonksiyonunun astım gibi kronik inflamatuvar solunum yolu hastalıklarının patogeneze katkı sağladığı gösterilmiştir (132, 185, 186).

Huang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, sıçanda kronik OVA uygulaması ile alerjik astım modeli indüklenmiş sıçanlardan izole edilen akciğer dokularında aktif β -katenin düzeyi yüksek bulunmuştur (115). Benzer şekilde farede tolüen diizosiyanat ile indüklenen astım modelinde de akciğerde fosforile olmayan aktif β -katenin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (132). Liang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise farede ev tozu akarı ile deneysel astım modeli indüklenerek akciğer dokuları izole edilmiş, elde edilen akciğer homojenatlarından membranöz sitozolik ve nükleer fraksiyonlar hazırlanmıştır. Bu çalışmada astım oluşturulan farelerde aktif β -katenin düzeyleri membranöz fraksiyonda azalırken, sitozolik ve nükleer fraksiyonlarda artmıştır (187).

Ayrıca farede OVA ile indüklenen bir astım modelinde *in vivo* kanonikal Wnt sinyal yolağı agonisti Wnt-1 uygulanarak astım ile ilişkili deneysel parametreler incelenmiştir. Sistemik Wnt-1 uygulaması IL-13 ekspresyonunun, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun ve goblet hücre gelişiminin artmasını önleyerek bronşiyal hiperreaktiviteyi azaltmıştır (188). Ancak aynı çalışmada farede ev tozu akarı ile indüklenen astım modeli oluşturulduğunda Wnt-1 uygulaması astım ile ilişkili parametrelerde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (188). Diğer bir çalışmada ise farede OVA ile astım modeli oluşturularak kurkuminin astım ile ilişkili deneysel parametreler üzerine etkinliği incelenmiş ve kurkuminin astım üzerine terapötik etkisini Wnt/ β -katenin yolağının aktivasyonu aracılığıyla sağladığı ileri sürülmüştür (189). Ayrıca Wnt/ β -katenin sinyal yolağının solunum yolundaki hücrelerde epitel-mezenkimal transdiferansiyasyon ve fibrotik değişiklikleri indükleyerek solunum yolu *remodellinginde* önemli rol oynadığı bilinmektedir (190).

Bunun yanı sıra çeşitli prelinik çalışmalarda kanonikal olmayan Wnt yolağının da astım patogeneze katkı sağladığı ileri sürülmüştür. Şiddetli astım tanısı konulmuş hastalardan izole edilen solunum epitel ve lamina propria örneklerinde Wnt-5A düzeylerinin sağlıklı bireylere kıyasla yüksek olduğu gösterilmiştir (191). Ayrıca bu

hastalardan elde edilen biyolojik örneklerdeki Wnt-5A düzeylerinin hastalardaki solunum yolunda eozinofil infiltrasyonu ve remodelling ile pozitif korelasyon gösterdiği de tespit edilmiştir (191). Benzer şekilde astım hastaları ve sağlıklı donörlerden elde edilen biyopsi örneklerinden hazırlanan primer solunum yolu düz kas hücre kültüründe, astımlı hastalardan izole edilen hücrelerde Wnt-5A/B seviyeleri sağlıklı bireylerden izole edilen hücrelere kıyasla yüksek bulunmuştur (192). Koopmans ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, farede OVA ile indüklenen astım modelinde Wnt-5A'nın aşırı ekspresyonunun IL-4 ve IL-5 gibi Th2 tip sitokin üretiminin artmasına ve α -SMA aracılığı ile *remodellinge* neden olduğu ileri sürülmüştür (193). Ayrıca akciğer fibroblastlarında IL-17A/TGF- β 1/Wnt-5A sinyal aksının bulunduğu ve Wnt-5A'nın bu sinyal aksı aracılığı ile IL-17A'nın inflamatuvar yanıt üzerine etkilerini potansiyelize ettiği bildirilmiştir (188). Ayrıca Wnt-5A ile inkübe edilen izole sığır trakea dokularında histamin ile indüklenen kasılma yanıtı artmıştır (194). Buna karşın Beckert ve arkadaşları, farede OVA veya ev tozu akarı ile indüklenen iki ayrı astım modelinde Wnt-5A uygulamasının BAL sıvısında ve akciğerde inflamatuvar hücre ve sitokin düzeyini azalttığını ileri sürmüştür (195). Ayrıca bir diğer çalışmada, Wnt-5A'nın kanonikal Wnt/ β -katenin sinyal aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (186).

Literatürde farede OVA ile indüklenen astım modelinde akciğer dokusunda fosforile Nf- κ B p65 düzeyi yüksek bulunmuş ve astımlı farelerde Nf- κ B sinyal yolağının aktive olduğu gösterilmiştir (196). Liang ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise astım modeli oluşturulan farelerde fosforile Nf- κ B p65'in total Nf- κ B p65'e oranının arttığı tespit edilmiştir (187). Bu çalışmada Nf- κ B yolağının inhibe edilmesi akciğerde histopatolojik değişiklikleri ve solunum yolu hiperreaktivitesini azaltmıştır (187).

Literatürdeki çalışmalara göre kanonikal ve kanonikal olmayan Wnt ile Nf- κ B sinyal yolaklarının astım ile ilişkili solunum yolu inflamasyonunda rol oynadığı açıktır. Ancak Wnt yolağının aktivasyonunun deneysel astım modeli türüne, incelenen deneysel parametrelere ve ölçüm zamanına göre değiştiği görülmektedir. Ayrıca kanonikal ve kanonikal olmayan Wnt yolağının akciğerdeki epitel hücre, dendritik hücre, lenfosit, lökosit, fibroblast ve düz kas hücrelerindeki etkilerinin de hücre tipine göre farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. Ayrıca hücre içinde inflamatuvar sürecin farklı zaman noktalarında

kanonik ve kanonik olmayan Wnt ile Nf- κ B sinyal yollarının etkileşimi de oldukça değişken ve karmaşıktır.

Önceki çalışmalarımızda OVA ve LPS ile indüklenen astım modelinde Akt sinyal yolağı aracılığı ile GSK-3 β 'nin serin 9 bölgesinden fosforile edilerek inhibe olduğu gösterilmiştir (163). Bu durumda β -katenin yıkım kompleksinin inhibe olması ve hücre içinde aktif β -katenin düzeyinin artması beklenir. Bunun aksine çalışmamızda astım modeli uygulanan farelerden izole edilen total akciğer homojenatlarında aktif β -katenin düzeyi kontrole göre düşük bulundu. Bu durum fosforile olmayan aktif β -katenin düzeyinin farklı hücre kompartmanlarında değişken olmasına ve β -katenin translokasyonunun artması sonucu nükleer fraksiyonda yoğunlaşmasına bağlı olabilir. Aynı zamanda literatürdeki çalışmalarda kanonik olmayan Wnt yolağının hücre içi sinyal iletim mekanizmasında yer alan JNK aktivasyonunun β -katenin'i serin 33/37 ve threonin 41 bölgelerinden fosforile ettiği ileri sürülmüştür (197). Diğer bir çalışmada Akt yolağı aktivasyonunun β -katenin'i tirozin 654 bölgesinden fosforile ettiği gösterilmiştir (198). Bu nedenle oluşturduğumuz astım modelinde β -katenin, GSK-3 β ile ilişkili yıkım kompleksinden bağımsız, farklı bir hücresel mekanizma ile fosforile edilerek yıkılıyor olabilir. Ayrıca çalışmada astım modeli oluşturulan farelerde Nf- κ B sinyal yolağının aktive olduğunu tespit ettik. Nf- κ B sinyal yolağı aktivasyonunun Wnt/ β -katenin sinyal yolağını baskıladığı ileri sürülmüştür (199). Bu nedenle astım modelinde farelere i.n./i.p. OVA verilmesinin ardından uygulanan LPS ile Nf- κ B sinyal yolağının aktivasyonu sonucu aktif β -katenin düzeylerini azaltmış olabilir.

Literatürde DMF'nin Wnt sinyal yolağı üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. İn vivo iskemi reperfüzyon hasarı modelinde DMF tedavisinin β -katenin ekspresyonunu indükleyerek terapötik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (200). Diğer bir in vitro çalışmada SH-SY5Y hücrelerine amiloid beta proteini uygulanarak oluşturulan nörodejenerasyon modelinde DMF inkübasyonu β -katenin ekspresyonunun azalmasını önlemiştir (201). Bunun yanı sıra, DMF uygulaması Nf- κ B p65'in serin 276 ve serin 468 bölgelerinden fosforilasyonunu inhibe etmektedir (202). Birçok prelinik çalışmada DMF tedavisinin Nf- κ B yolağını inhibe ettiği bildirilmiştir (203).

Buna göre elde edilen sonuçlar DMF'nin terapötik etkisine Nf- κ B yolağı inhibisyonunun aracılık ettiğini düşündürmektedir. Ayrıca DMF tedavisi Nf- κ B yolağını inhibe ederek astım uygulanan farelerdeki aktif β -katenin düzeyindeki azalmayı geri çevirmiş olabilir.

Çalışmada astım modeli oluşturulan farelerde DMF tedavisinin akciğerde histopatolojik değişiklikler üzerine etkileri incelendi. Bu amaçla akciğer kesitlerinde peribronşiyal ve parankimal inflamasyon semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Astım modeli uygulanan farelerde peribronşiyal inflamasyon tespit edildi, ancak parankimal inflamasyon skorlarında gruplar arasında anlamlı değişim saptanmadı. DMF tedavisi düşük dozda astım oluşturulan farelerde peribronşiyal inflamasyonu etkilemezken, yüksek dozda uygulandığında peribronşiyal inflamasyon skorlarını kontrole benzer düzeye getirdi.

El-Baz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada OVA ile sensitize edilen deney hayvanlarına sataşma fazında sistemik OVA ve LPS uygulanmıştır. Elde edilen akciğer kesitlerinde yapılan histopatolojik analizlerde inflamasyon ve fibrozis tespit edilmiştir (204). Başka bir çalışmada OVA ve LPS ile alerjik astım modeli oluşturulan farelerin akciğerlerinde peribronşiyal ve perivasküler alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun, goblet hücre plazisi ve mukus ürtiminin arttığı gösterilmiştir (205, 206). Ayrıca çalışmalarda DMF'nin bleomisin ile indüklenen akciğer fibrozisi modellerinde, fibrozisi azalttığı ileri sürülmüştür (207). Solunum yolu inflamasyonu modellerinde DMF tedavisi ile akciğer dokularında patolojik skorlarda ve makrofaj infiltrasyonunda azalma bildirilmiştir (144).

DMF, klinikte psöriazis ve multiple sklerozis tedavisinde kullanılmaktadır. Bu otoimmün hastalıklardaki terapötik etkinliğine immunomodulator etkisinin aracılık ettiği ileri sürülmüştür (208). Çalışmada astım modeli uygulanan farelerden izole edilen akciğer homojenatlarında metabolomik analiz yapıldı. Deney grupları arasında akciğer dokularında ölçülen miktarları bakımından anlamlı farklılık gösteren ve ayrımı sağlayan biyobelirteç metabolitler belirlendi. Biyobelirteç metabolitler ise aminoasit, karbonhidrat, glikoliz, lipid ve yağ asidi metabolizması gibi biyokimyasal reaksiyonlarda yer alan metabolitler ile aromatik ve sekonder metabolitler olarak sınıflandırıldı. Farelerden izole edilen akciğer dokularında yapılan metabolomik analizlerde lösin, aspartik asit, alanin, fenilalanin ve o-fosfo-L-tirozin hücrede aminoasit metabolizmasında yer alan biyobelirteç metabolitler olarak tespit edildi. Sonuçlarımız lösin ve aspartik asit düzeyinin astım uygulanan farelerde arttığını gösterdi. Benzer şekilde DMF tedavisi de astımlı farelerde bu metabolitlerin düzeyini artırdı. Alanin, fenilalanin ve o-fosfo-L-tirozin metabolitleri ise astım uygulanan farelerde kontrole göre azaldı. DMF tedavisi ise alanin, fenilalanin ve o-fosfo-L-tirozin düzeylerini astımlı farelerde azalttı. Lösin hücre içinde inflamatuvar yanıtta ve immün

hücrelerin proliferasyonunda önemli bir aminoasittir (209). Lösinin LPS ile indüklenen mTOR sinyal yolağında rol oynadığı bilinmektedir (209). Ancak bunun aksine astım hastalarından elde edilen serum örneklerinde lösin düzeyleri sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında düşük bulunmuştur (210). Hücre içinde Krebs döngüsünde yer alan bir aminoasit olan aspartik asit ise enerji üretimi ve nitrojen metabolizmasını destekler. Bu nedenle inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve protein katabolizması ile metabolik yeniden programlanmanın arttığı durumlarda aspartik asit düzeyi artar (211). Çalışmada belirlenen biyobelirteç metabolitlerden biri olan alanin ise glikolizin ara basamaklarında anahtar rol oynayan bir aminoasittir. Solunum yolu inflamasyonunda immün hücre aktivasyonu ve oksidatif stres artan enerji ihtiyacını karşılamak amacıyla Warburg etkisi ile glikolizi indüklediği için alanin düzeylerini azaltır (212). Fenilalanin hücre içinde biyokimyasal reaksiyonlar ve immün regülatör yollar arasındaki etkileşimi düzenleyen önemli bir aminoasittir. Hücrede Krebs döngüsüne girerek enerji üretimini desteklediği, Th2 lenfositler başta olmak üzere immün hücrelerde enerji metabolizmasını düzenlemektedir (213). Fenilalanin karaciğerde hidroksillenerek tirozin aminoasitine dönüşür. Ayrıca hücre içinde inflamatuvar sinyal yollarının aktivasyonu tirozin aminoasitinin fosforilasyonunu indüklemektedir. Tirozin fosforilasyonu ise o-fosfo L-tirozin düzeyinin artmasına neden olur (214, 215). Buna göre astım uygulanan farelerden elde edilen akciğer dokularında aminoasit metabolizmasında rol oynayan biyobelirteç metabolitlerin düzeylerinin solunum yolu inflamasyonu ve immün hücre aktivasyonuna bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Sonuçlarımız literatür verileri ile uyumludur. Ancak DMF tedavisi aminoasit metabolizması ile ilişkili biyobelirteç metabolitlerin düzeylerinde solunum yolu inflamasyonu sonucu meydana gelen değişiklikleri önleyememiştir. Astım modeli uygulanan farelerden izole edilen akciğer homojenatlarında yapılan metabolomik analizlerde mannoz, soforoz, gliseron fosfat, gliserol-1-fosfat, laktik asit, 6 fosfoglikoz, malik asit ve glikolik asit karbonhidrat metabolizması ve glikolizde rol oynayan biyobelirteç metabolitler olarak belirlendi. Astımlı farelerin akciğer dokularında mannoz, soforoz, gliseron fosfat, gliserol-1-fosfat ve laktik asit gibi biyobelirteç metabolitler kontrole göre yüksek bulundu. Mannoza, glikoz taşıyıcıları ile hücre içine girerek glikoliz reaksiyonunda enerji üretimi için kullanılmaktadır. Aynı zamanda mannoz hücre içinde proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonlarında gelişen glikolizasyon reaksiyonlarında da kullanılmaktadır (216). Soforoz karbonhidrat yıkımında düzeyi artan bir metabolittir (217). Gliseron fosfat ve gliserol-1-fosfat biyobelirteç metabolitlerinin glikolize aracılık

ettiği bilinmektedir. Ayrıca immün hücrelerin aktive olduğu durumlarda membran fosfolipitlerinin üretiminin indüklenmesi sonucu gliseron fosfat ve gliserol-1-fosfat metabolitlerinin düzeyi artmaktadır (218). Laktik asit ise hücre içinde glikoliz reaksiyonunda oluşan son üründür (219). Sonuçlarımız solunum yolu inflamasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu sonucu akciğer dokusundaki hücrelerde glikoliz reaksiyonunun indüklendiği ve Warburg etkisinin meydana geldiğini göstermektedir. Özellikle solunum yolu inflamasyonu gibi inflamatuvar hücre proliferasyonunun arttığı durumlarda laktik asit düzeyinin artması ayırt edici ve tipik bir hücresel yanıttır (220). Astımlı bireylerden izole edilen bronşiyal epitel hücrelerinde, inflamasyon ve oksidatif stresin tetiklediği metabolik yeniden programlama sonucu, aerobik koşullarda dahi ATP üretiminin esas olarak glikoliz yoluna bağımlı olduğu gösterilmiştir (220). Warburg etkisi olarak tanımlanan hücre metabolizmasının yeniden programlanması laktik asit düzeylerinin artmasına neden olmaktadır (221). Çalışmada düşük dozda uygulanan DMF tedavisi astımlı farelerde gelişen Warburg etkisini önledi. Ancak yüksek doz DMF tedavisi solunum yolu inflamasyonu ile indüklenen karbonhidrat ve glikoliz metabolizmasındaki değişiklikleri geri çeviremedi. In vitro çalışmalarda DMF, glikozun hücre içine girişini doza bağımlı artırmıştır (222). Ancak bir diğer çalışmada DMF'nin terapötik etkisini hücre içinde aerobik glikolizin inhibisyonu aracılığı ile gösterdiği raporlanmıştır (208). Buna göre çalışmada elde edilen sonuçlar literatür verileri ile uyumludur. Bunun yanı sıra astımlı farelerin akciğer dokularında 6-fosfoglikoz ve malik asit metabolitlerinin düzeyi artarken, glikolik asit düzeyi kontrole göre azaldı. DMF tedavisi ise solunum yolu inflamasyonu sonucu 6-fosfoglikoz, malik asit ve glikolik asit gibi metabolitlerin düzeylerinde meydana gelen değişikliği doza bağımlı şekilde potansiyalize etti. 6-fosfoglikoz metaboliti hücre içinde bir taraftan glikolize katılarak enerji üretimini desteklerken, aynı zamanda pentoz fosfat yolağına katılarak antioksidan etkili NADPH üretimini sağlar (223). Malik asit metaboliti hücre içinde Krebs döngüsünde oluşan bir ara üründür. İnflamasyonda hücre içinde enerji üretiminin artması sonucu mitokondrideki redoks dengesinin korunması amacıyla malik asit düzeyleri değişmektedir (224). Glikolik asit düzeyleri ise peroksizom metabolizması sırasında değişmektedir (225). Çalışmada astım modeli uygulanan farelerden izole edilen akciğer dokularında metabolomik analiz yapılarak, nonanoik asit ve 1-heksadekanol, laurik asit, tetratriakontan ve skualen lipid ve yağ asidi metabolizmasında rol oynayan biyobelirteç metabolitler olarak belirlendi. Astım uygulanan farelerde nonanoik asit ve 1-heksadekanol düzeyleri kontrole kıyasla azaldı. Benzer şekilde DMF

tedavisi uygulanan astımlı farelerde ise bu metabolitlerin düzeyi doza bağımlı şekilde daha da azaldı. Orta zincirli bir yağ asidi molekülü olan nonanoik asitin düzeyi lipoliz ve oksidatif strese bağımlı olarak artmaktadır (226). 1-heksadekanol metaboliti ise palmitik asidin indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. İnflamatuvar durumlarda membran fosfolipitlerin yenilenme hızına bağımlı olarak düzeyi değişmektedir (227). Astımlı farelerde laurik asit düzeyi kontrole kıyasla yüksek bulundu. DMF tedavisi ise astım modeli uygulanan farelerde laurik asit düzeyini doza bağımlı şekilde azalttı. Bazal durumda laurik asit gibi yağ asitleri hücre içine alınarak hızlıca okside edilir. Ancak solunum yolu inflamasyonu, immün hücre aktivasyonu ve metabolik stres ile ilişkili yağ asidi metabolizmasında β -oksidasyon disfonksiyonu sonucu laurik asit düzeyi yükselir. Ayrıca mitokondriyal fonksiyonların bozulması da laurik asit düzeylerini artırabilmektedir (228). Astımlı farelerde tetratriakontan ve skualen metabolitleri kontrole kıyasla azaldı. Düşük doz DMF tedavisi inflamasyon sonucu tetratriakontan ve skualen düzeyindeki azalmayı önlerken, yüksek doz tedavi bu metabolitlerin düzeyini etkilemedi. Tetratriakontan membran lipid fraksiyonlarında bulunan doymuş uzun zincirli alkan yapısında bir hidrokarbondur. Solunum yolu inflamasyonunda lipid metabolizmasındaki bozulma veya hücre membran remodellingi nedeniyle düzeyi değişmektedir. Triterpen yapısındaki skualen, hücre membranında kolesterol ve diğer sterollerin biyosentezinde kullanılan öncü bir metabolittir. Hücrede inflamatuvar yolların aktivasyon, kolesterol ihtiyacını arttırarak skualen düzeylerinde değişikliğe yol açabilir. Bunun yanı sıra skualen metaboliti hücre membranını oksidatif strese karşı koruyarak antioksidan fonksiyon gösterir (229). Çalışmada farelerden izole edilen akciğer homojenatlarında yapılan metabolomik analizde benzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit ve mimosin aromatik ve sekonder biyobelirteç metabolitler olarak belirlendi. Astım uygulanan farelerde benzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit düzeyleri kontrole göre azaldı. DMF tedavisi ise her iki dozda da benzoik asit, 4 hidroksibenzoik asit düzeylerindeki değişikliği önleyemedi. Benzoik asit hücrede metabolize edilerek 4-hidroksibenzoik asite dönüşür. Benzoik ve 4-hidroksibenzoik asit metabolitlerinin düzeylerinin oksidatif stres ve aromatik amino asit metabolizmasına bağımlı olarak değiştiği bilinmektedir (230). Astım oluşturulan farelerde mimosin düzeyleri kontrole kıyasla arttı. DMF tedavisi ise astım oluşturulan farelerde mimosin düzeylerini daha da arttırarak doza bağımlı şekilde inflamasyona bağımlı etkileri metabolize etti. Solunum yolu inflamasyonu ve oksidatif stres hücrel proteinlerin oksidatif modifikasyonu ve aktive olan immün hücrelerdeki metabolik değişiklikler, metabolik

disfonksiyon için biyobelirteç olan mimosin benzeri metabolitlerin artışına neden olur (231). Son olarak izole fare akciğer homojenatlarında yapılan metabolomik analizde dehidroaskorbik asit, monometil fosfat ve fosfonomisin gibi maddeler de biyobelirteç metabolitler olarak belirlendi. Astım modeli uygulanan farelerde dehidroaskorbik asit düzeyi kontrole göre azalırken, monometil fosfat düzeyi yüksek bulundu. DMF tedavisi astımlı farelerde inflamasyon ile ilişkili dehidroaskorbik asit, monometil fosfat düzeyindeki değişiklikleri doza bağımlı şekilde artırdı. Dehidroaskorbik asit hücre içinde askorbik asitin oksidasyonu sonucu oluşur. Dehidroaskorbik asit hücre içinde serbest radikalleri temizleyerek akciğerdeki hücreleri oksidatif hasara karşı korur (232). Monometil fosfat hücre içinde metilasyon ve fosforilasyon reaksiyonları sonucu oluşan küçük bir moleküldür (233). Solunum yolu inflamasyonu ve immün hücrelerin aktivasyonu hücre içinde çeşitli kinaz enzimlerini aktive ederek fosforilasyona neden olmaktadır. Ayrıca solunum yolu remodelingi sonucu dokuda meydana gelen protein ve lipid modifikasyonu da monometil fosfat düzeylerini artırabilir (234). Sonuç olarak bu çalışmada OVA ve LPS ile astım oluşturulan farelerde DMF tedavisinin etkinliği ortaya konmuştur. Çalışma kapsamında in vivo astım modelinde DMF'nin terapötik etkinliği trakeal kontraktile, kanonikal ve non kanonikal Wnt yolağı proteinlerinin ekspresyonu ve hücresel metabolitlerin ekspresyonu yönünden ilk kez değerlendirilmiştir. Moleküler çalışma verilerimize göre, OVA ve LPS ile indüklenen astım modelinde kanonikal Wnt yolağının inhibe olduğu görülürken, non kanonikal Wnt yolağında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Fonksiyonel düzelme gösteren yüksek doz DMF (100 mg/kg/gün) tedavisi peribronşiyal ve parankimal inflamasyonu iyileştirmede yetersiz kalmıştır. DMF'nin kontraktıl fonksiyonlardaki terapötik etkisini Nrf2/HO-1 ve Nf-κB yolları aracılı göstermiş olabileceği düşünülmektedir. Ancak etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik daha ileri çalışmalar gereklidir. Çalışma bulgularımız, psöriazis ve multiple sklerozis tedavisinde yıllardır klinikte kullanımı olan DMF'nin astım tedavisinde yeniden konumlandırılma potansiyelinin değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Levy ML, Bacharier LB, Bateman E, Boulet LP, Brightling C, Buhl R, Brusselle G, Cruz AA, Drazen JM, Duijts L, Fleming L, Inoue H, Ko FWS, Krishnan JA, Mortimer K, Pitrez PM, Sheikh A, Yorgancıoğlu A, Reddel HK (2023). Key recommendations for primary care from the 2022 Global Initiative for Asthma (GINA) update. *NPJ Primary Care Respiratory Medicine* 33(1): 7.
2. Global Initiative for Asthma (2024). Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2024 [online]. Available from: <https://ginasthma.org/2024-report/> [Accessed 19 August 2025].
3. Schatz M, Rosenwasser L (2014). The allergic asthma phenotype. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2: 645-648.
4. Wang J, Zhou Y, Zhang H, Hu L, Liu J, Wang L, Wang T, Zhang H, Cong L, Wang Q (2023). Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* 8: 138.
5. Gans MD, Gavrilova T (2020). Understanding the immunology of asthma: pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes. *Paediatr Respir Rev* 36: 118-127.
6. Thakur VR, Khuman V, Beladiya JV, Chaudagar KK, Mehta AA (2019). An experimental model of asthma in rats using ovalbumin and lipopolysaccharide allergens. *Heliyon* 5(11): e02864.
7. Seidel P, Roth M (2013). Anti-inflammatory dimethylfumarate: a potential new therapy for asthma? *Mediators Inflamm* 2013: 875403.
8. Ahookhosh K, Pourmehran O, Aminfar H, Mohammadpourfard M, Sarafraz MM, Hamishehkar H (2020). Development of human respiratory airway models: a review. *Eur J Pharm Sci* 145: 105233.
9. Brand-Saberi BEM, Schäfer T (2014). Trachea: anatomy and physiology. *Thorac Surg Clin* 24(1): 1-5.
10. Irvin CG, Bates JH (2003). Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir Res* 4(1): 4.

11. Moore K, Anne M (2019). Temel klinik anatomi. İkinci baskı. Güneş Kitabevi Yayınları, İstanbul; Sayfa:71-76.
12. Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G, et al (2004). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxic Pathol* 55: 413-431.
13. Mims JW (2015). Asthma: definitions and pathophysiology. *Int Forum Allergy Rhinol* 5 Suppl 1: S2-6.
14. Boulet LP, Boulay ME (2011). Asthma-related comorbidities. *Expert Rev Respir Med* 5(3): 377-393.
15. Gordon BR (2008). Asthma history and presentation. *Otolaryngol Clin North Am* 41(2): 375-385.
16. Kay AB (2014). Landmarks in allergy during the 19th century. *Chem Immunol Allergy* 100: 21-26.
17. Taghizadieh A, Mohammadinasab R, Ghazi-Sha'rbaf J, Safiri S (2020). The first description of asthma due to heart conditions in the history of medicine. *Chest* 158(2): 461-463.
18. Toskala E, Kennedy DW (2015). Asthma risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol* 5 Suppl 1: S11-16.
19. Ntontsi P, Photiades A, Zervas E, Xanthou G, Samitas K (2021). Genetics and epigenetics in asthma. *Int J Mol Sci* 22(5): 2412.
20. Sockrider M, Fussner L (2020). What is asthma? *Am J Respir Crit Care Med* 202(9): 25-26.
21. World Health Organization (2025). WHO looks back at 2024 [online]. Available from: <https://www.who.int/news-room/spotlight/who-looks-back-at-2024>. [Accessed 20 August 2025].

22. Celik GE, Aydin O, Gokmen D, Koycu Buhari G, Celebi Sozener Z, Gemicioglu B, Bulut I, Beyaz S, Orcen C, Ozdemir SK, Keren M, Damadoglu E, Yakut T, Kalpaklioglu AF, Baccioglu A, Yalim SA, Yilmaz I, Koca Kalkan I, Uysal MA, Ozgun Niksarlioglu EY, Kalyoncu AF, Karakaya G, Erbay M, Nayci S, Tepetam FM, Gelincik AA, Dirol H, Goksel O, Karaoglanoglu S, Oner Erkekol F, Isik SR, Yildiz F, Yavuz Y, Karadogan D, Bozkurt N, Seker U, Oguzulgen IK, Basyigit I, Baris SA, Yilmazel Ucar E, Erdogan T, Polatli M, Ediger D, Gunaydin FE, Turk M, Pur L, Katran ZY, Sekibag Y, Aykac EF, Mungan D, Gul O, Cengiz A, Akkurt B, Ozden S, Demir S, Unal D, Aslan AF, Can A, Gumusburun R, Bogatekin G, Akten HS, Inan S, Erdinc M, Ogus AC, Kavas M, Polat Yulug D, Cakmak ME, Kaya SB, Alpagat G, Ozgur ES, Uzun O, Tas Gulen S, Pekbak G, Kizilirmak D, Havlucu Y, Donmez H, Arslan B, Cetin GP, Soyyigit S, Kara BY, Pasaoglu Karakis G, Dursun AB, Kendirlihan R, Ozturk AB, Sevinc C, Omeroglu Simsek G, Abadoglu O, Cerci P, Yucel T, Yorulmaz I, Tezcaner ZC, Tatar EC, Suslu AE, Ozer S, Dursun E, Yorgancioglu A (2023). Picturing asthma in Turkey: results from the Turkish adult asthma registry. *J Asthma* 60(11): 1973-1986.
23. Killeen K, Skora E (2013). Pathophysiology, diagnosis, and clinical assessment of asthma in the adult. *Nurs Clin North Am* 48(1): 11-23.
24. McDowell KM (2000). Pathophysiology of asthma. *Respir Care Clin N Am* 6(1): 15-26.
25. Barrios RJ, Kheradmand F, Batts L, Corry DB (2006). Asthma: pathology and pathophysiology. *Arch Pathol Lab Med* 130(4): 447-451.
26. Ngoc PL, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón JC (2005). Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5(2): 161-166.
27. Hudey SN, Ledford DK, Cardet JC (2020). Mechanisms of non-type 2 asthma. *Curr Opin Immunol* 66: 123-128.
28. Nelson RK, Bush A, Stokes J, Nair P, Akuthota P (2020). Eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract* 8(2): 465-473.
29. Gauvreau GM, Bergeron C, Boulet LP, Cockcroft DW, Côté A, Davis BE, Leigh R, Myers I, O'Byrne PM, Sehmi R (2023). Sounding the alarm—the role of alarmin cytokines in asthma. *Allergy* 78(2): 402-417.

30. Varricchi G, Ferri S, Pepys J, Poto R, Spadaro G, Nappi E, Paoletti G, Virchow JC, Heffler E, Canonica WG (2022). Biologics and airway remodeling in severe asthma. *Allergy* 77(12): 3538-3552.
31. Wardlaw AJ (2001). Eosinophil trafficking in asthma. *Clin Med (Lond)* 1(3): 214-218.
32. Ji T, Li H (2023). T-helper cells and their cytokines in pathogenesis and treatment of asthma. *Front Immunol* 14: 1149203.
33. Habib N, Pasha MA, Tang DD (2022). Current understanding of asthma pathogenesis and biomarkers. *Cells* 11(17): 2764.
34. Banafea GH, Bakhashab S, Alshaibi HF, Natesan Pushparaj P, Rasool M (2022). The role of human mast cells in allergy and asthma. *Bioengineered* 13(3): 7049-7064.
35. Bradding P, Arthur G (2016). Mast cells in asthma—state of the art. *Clin Exp Allergy* 46(2): 194-263.
36. Barnes PJ (1996). Pathophysiology of asthma. *Br J Clin Pharmacol* 42(1): 3-10.
37. Ray A, Kolls JK (2017). Neutrophilic inflammation in asthma and association with disease severity. *Trends Immunol* 38(12): 942-954.
38. Hammad H, Lambrecht BN (2021). The basic immunology of asthma. *Cell* 184(6): 1469-1485.
39. Shilovskiy IP, Nikolskii AA, Kurbacheva OM, Khaitov MR (2020). Modern view of neutrophilic asthma: molecular mechanisms and therapy. *Biochemistry (Mosc)* 85(8): 854-868.
40. Seys SF, Lokwani R, Simpson JL, Bullens DMA (2019). New insights in neutrophilic asthma. *Curr Opin Pulm Med* 25(1): 113-120.
41. Curren B, Ahmed T, Howard DR, Ashik Ullah M, Sebina I, Rashid RB, Al Amin Sikder M, Namubiru P, Bissell A, Ngo S, Jackson DJ, Toussaint M, Edwards MR, Johnston SL, McSorley HJ, Phipps S (2023). IL-33-induced neutrophilic inflammation and NETosis underlie rhinovirus-triggered exacerbations of asthma. *Mucosal Immunol* 16(5): 671-684.
42. Mohan A, Grace J, Wang BR, Lugogo N (2019). The effects of obesity in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 19(10): 49.

43. Tooba R, Wu TD (2022). Obesity and asthma: a focused review. *Respir Med* 204: 107012.
44. Athari SS (2019). Targeting cell signaling in allergic asthma. *Signal Transduct Target Ther* 4: 45.
45. Sies H (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 4: 180-183.
46. Sahiner UM, Birben E, Erzurum S, Sackesen C, Kalayci Ö (2018). Oxidative stress in asthma: part of the puzzle. *Pediatr Allergy Immunol* 29(8): 789-800.
47. Ammar M, Bahloul N, Amri O, Omri R, Ghazzi H, Kammoun S, Zeghal K, Ben Mahmoud L (2022). Oxidative stress in patients with asthma and its relation to uncontrolled asthma. *J Clin Lab Anal* 36(5): e24345.
48. Ercan H, Birben E, Dizdar EA, Keskin O, Karaaslan C, Soyer OU, Dut R, Sackesen C, Besler T, Kalayci O (2006). Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 118(5): 1097-1104.
49. Maslan J, Mims JW (2014). What is asthma? Pathophysiology, demographics, and health care costs. *Otolaryngol Clin North Am* 47(1): 13-22.
50. Orihara K, Dil N, Anaparti V, Moqbel R (2010). What's new in asthma pathophysiology and immunopathology? *Expert Rev Respir Med* 4(5): 605-629.
51. Doeing DC, Solway J (2013). Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J Appl Physiol* (1985) 114(7): 834-843.
52. Busse WW, Melén E, Menzies-Gow AN (2022). Holy Grail: the journey towards disease modification in asthma. *Eur Respir Rev* 31(163): 210183.
53. Reddel HK, Bacharier LB, Bateman ED, Brightling CE, Brusselle GG, Buhl R, Cruz AA, Duijts L, Drazen JM, FitzGerald JM, Fleming LJ, Inoue H, Ko FW, Krishnan JA, Levy ML, Lin J, Mortimer K, Pitrez PM, Sheikh A, Yorgancioglu AA, Boulet LP (2022). Global Initiative for Asthma Strategy 2021: executive summary and rationale for key changes. *Am J Respir Crit Care Med* 205(1): 17-35.
54. Castillo JR, Peters SP, Busse WW (2017). Asthma exacerbations: pathogenesis, prevention, and treatment. *J Allergy Clin Immunol Pract* 5(4): 918-927.

55. Holgate ST, Polosa R (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 8(3): 218-230.
56. Billington CK, Penn RB, Hall IP (2017). β_2 Agonists. *Handb Exp Pharmacol* 237: 23-40.
57. Sharma S, Hashmi MF, Chakraborty RK (2023). Asthma medications. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–.
58. Wermuth HR, Badri T, Takov V (2023). Montelukast. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–.
59. Hinks TSC, Levine SJ, Brusselle GG (2021). Treatment options in type-2 low asthma. *Eur Respir J* 57(1): 2000528.
60. Opina MT, Moore WC (2017). Phenotype-driven therapeutics in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 17(2): 10.
61. Huang J, Pansare M (2021). New treatments for asthma. *Immunol Allergy Clin North Am* 41(4): 555-569.
62. Holgate ST (2011). Pathophysiology of asthma: what has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? *J Allergy Clin Immunol* 128(3): 495-505.
63. Pelaia C, Crimi C, Vatrella A, Tinello C, Terracciano R, Pelaia G (2020). Molecular targets for biological therapies of severe asthma. *Front Immunol* 11: 603312.
64. Qin Z, Chen Y, Wang Y, Xu Y, Liu T, Mu Q, Huang C (2024). Immunometabolism in the pathogenesis of asthma. *Immunology* 171(1): 1-17.
65. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, Sullivan SA, Nichols AG, Rathmell JC (2011). Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J Immunol* 186(6): 3299-3303.
66. Rodriguez-Perez N, Schiavi E, Frei R, Ferstl R, Wawrzyniak P, Smolinska S, Sokolowska M, Sievi NA, Kohler M, Schmid-Grendelmeier P, Michalovich D, Simpson KD, Hessel EM, Jutel M, Martin-Fontecha M, Palomares O, Akdis CA, O'Mahony L (2017). Altered fatty acid metabolism and reduced stearyl-coenzyme A desaturase activity in asthma. *Allergy* 72(11): 1744-1752.

67. Malinarich F, Duan K, Hamid RA, Bijin A, Lin WX, Poidinger M, Fairhurst AM, Connolly JE (2015). High mitochondrial respiration and glycolytic capacity represent a metabolic phenotype of human tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 194(11): 5174-5186.
68. Rodriguez-Coira J, Villaseñor A, Izquierdo E, Huang M, Barker-Tejeda TC, Radzikowska U, Sokolowska M, Barber D (2021). The importance of metabolism for immune homeostasis in allergic diseases. *Front Immunol* 12: 692004.
69. Xu T, Wu Z, Yuan Q, Zhang X, Liu Y, Wu C, Song M, Wu J, Jiang J, Wang Z, Chen Z, Zhang M, Huang M, Ji N (2023). Proline is increased in allergic asthma and promotes airway remodeling. *JCI Insight* 8(16): e167395.
70. Crestani E, Harb H, Charbonnier LM, Leirer J, Motsinger-Reif A, Rachid R, Phipatanakul W, Kaddurah-Daouk R, Chatila TA (2020). Untargeted metabolomic profiling identifies disease-specific signatures in food allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 145(3): 897-906.
71. Xue J, Li Z, Li X, Hua C, Shang P, Zhao J, Liu K, Xie F (2023). Evaluation of cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammation in BEAS-2B cells based on a lung microfluidic chip. *Food Chem Toxicol* 176: 113787.
72. Zosky GR, Sly PD (2007). Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy* 37(7): 973-988.
73. Huntington JA, Stein PE (2001). Structure and properties of ovalbumin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 756(1-2): 189-198.
74. Wang C, Tang J, Qian B, Zeng Z, Gao Y, Song JL (2020). Rubusoside alleviates the ovalbumin-induced mice allergic asthma by modulating the NF- κ B activation. *J Food Biochem* 44(5): e13187.
75. Gao X, Leung TF, Wong GW, Ko WH, Cai M, He EJ, Chu IM, Tsang MS, Chan BC, Ling J, Fan X, Lu L, Lam CW, Wong CK (2022). Meteorin- β /Meteorin like/IL-41 attenuates airway inflammation in house dust mite-induced allergic asthma. *Cell Mol Immunol* 19(2): 245-259.

76. Daines M, Pereira R, Cunningham A, Pryor B, Besselsen DG, Liu Y, Luo Q, Chen Y (2021). Novel mouse models of fungal asthma. *Front Cell Infect Microbiol* 11: 683194.
77. Lertnimitphun P, Zhang W, Fu W, Yang B, Zheng C, Yuan M, Zhou H, Zhang X, Pei W, Lu Y, Xu H (2021). Safranal alleviated OVA-induced asthma model and inhibits mast cell activation. *Front Immunol* 12: 585595.
78. Regal JF (2004). Murine asthma models. *Curr Protoc Toxicol*, Chapter 18: Unit 18.3.
79. Wang X, Quinn PJ (2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res* 49(2): 97-107.
80. Baldwin AS Jr (2001). Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 107(1): 3-6.
81. Baldwin AS Jr (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-683.
82. Lawrence T (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(6): a001651.
83. Li Q, Verma IM (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2(10): 725-734.
84. Gilmore TD (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25(51): 6680-6684.
85. O'Dea E, Hoffmann A (2009). NF-κB signaling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1(1): 107-115.
86. Bonsignore MR, Profita M, Gagliardo R, Riccobono L, Chiappara G, Pace E, Gjomarkaj M (2015). Advances in asthma pathophysiology: stepping forward from the Maurizio Vignola experience. *Eur Respir Rev* 24(135): 30-39.
87. Panday A, Inda ME, Bagam P, Sahoo MK, Osorio D, Batra S (2016). Transcription Factor NF-κB: An Update on Intervention Strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 64(6): 463-483.

88. Shimizu K, Konno S, Ozaki M, Umezawa K, Yamashita K, Todo S, Nishimura M (2012). Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a novel NF-kappaB inhibitor, inhibits allergic inflammation and airway remodelling in murine models of asthma. *Clin Exp Allergy* 42(8): 1273-1281.
89. Tully JE, Hoffman SM, Lahue KG, Nolin JD, Anathy V, Lundblad LK, Daphtary N, Aliyeva M, Black KE, Dixon AE, Poynter ME, Irvin CG, Janssen-Heininger YM (2013). Epithelial NF-κB orchestrates house dust mite-induced airway inflammation, hyperresponsiveness, and fibrotic remodeling. *J Immunol* 191(12): 5811-5821.
90. Alhirmizi IAO, Uysal F, Arslan SO, Özünlü SAÇ, Koç A, Parlar A, Bayram KK (2023). Fenofibrate attenuates asthma features in an ovalbumin-induced mouse model via suppressing NF-κB binding activity. *Respir Physiol Neurobiol* 314: 104083.
91. Caramori G, Oates T, Nicholson AG, Casolari P, Ito K, Barnes PJ, Papi A, Adcock IM, Chung KF (2009). Activation of NF-kappaB transcription factor in asthma death. *Histopathology* 54: 507-509.
92. Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274: 26071–26078.
93. Chan K, Kan YW (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12731–12736.
94. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci* 73: 3221–3247.
95. Jaramillo MC, Zhang DD (2013). The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev* 27: 2179–2191.
96. He F, Ru X, Wen T (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci* 21: 4777.
97. Dodson M, de la Vega MR, Cholanians AB, Schmidlin CJ, Chapman E, Zhang DD (2019). Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 59: 555–575.

98. Audousset C, McGovern T, Martin JG (2021). Role of Nrf2 in Disease: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches - Pulmonary Disease/Asthma. *Front Physiol* 12: 727806.
99. Sussan TE, Gajghate S, Chatterjee S, Mandke P, McCormick S, Sudini K, Kumar S, Breysse PN, Diette GB, Sidhaye VK, Biswal S (2015). Nrf2 reduces allergic asthma in mice through enhanced airway epithelial cytoprotective function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309: L27–L36.
100. Chen Y, Kong Y, Wang Q, Chen J, Chen H, Xie H, Li L (2021). Schisandrin B attenuates airway inflammation by regulating the NF- κ B/Nrf2 signaling pathway in mouse models of asthma. *J Immunol Res* 2021: 8029963.
101. Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, Roman J, Singh A, Fryer AD, Yamamoto M, Kensler TW, Tudor RM, Georas SN, Biswal S (2005). Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp Med* 202: 47-59.
102. Kuramoto K, Morishima Y, Yoshida K, Ano S, Kawashima K, Yabuuchi Y, Sakai C, Matsumura S, Nishino K, Yazaki K, Matsuyama M, Kiwamoto T, Ishii Y, Hizawa N (2024). Nrf2 deficiency accelerates IL-17-dependent neutrophilic airway inflammation in asthmatic mice. *Antioxidants (Basel)* 13: 818.
103. Fitzpatrick AM, Stephenson ST, Hadley GR, Burwell L, Penugonda M, Simon DM, Hansen J, Jones DP, Brown LA (2011). Thiol redox disturbances in children with severe asthma are associated with posttranslational modification of the transcription factor nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. *J Allergy Clin Immunol* 127: 1604-1611.
104. Rosenbluh J, Wang X, Hahn WC (2014). Genomic insights into WNT/ β -catenin signaling. *Trends Pharmacol Sci* 35: 103-109.
105. Willert K, Nusse R (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a007864.
106. Wang Z, Li Z, Ji H (2021). Direct targeting of β -catenin in the Wnt signaling pathway: Current progress and perspectives. *Med Res Rev* 41: 2109-2129.

107. Jin X, Wang S, Luo L, Yan F, He Q (2024). Targeting the Wnt/ β -catenin signal pathway for the treatment of gastrointestinal cancer: Potential for advancement. *Biochem Pharmacol* 227: 116463.
108. Moon RT, Gough NR (2016). Beyond canonical: The Wnt and β -catenin story. *Sci Signal* 9: eg5.
109. Hayat R, Manzoor M, Hussain A (2022). Wnt signaling pathway: A comprehensive review. *Cell Biol Int* 46: 863-877.
110. Nusse R, Clevers H (2017). Wnt/ β -Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell* 169: 985-999.
111. Routledge D, Scholpp S (2019). Mechanisms of intercellular Wnt transport. *Development* 146: dev176073.
112. Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T (2021). WNT- β -catenin signalling – a versatile player in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol* 17: 172-184.
113. Mukherjee N, Panda CK (2020). Wnt/ β -Catenin signaling pathway as chemotherapeutic target in breast cancer: An update on pros and cons. *Clin Breast Cancer* 20: 361-370.
114. Katanaev VL (2010). The Wnt/Frizzled GPCR signaling pathway. *Biochemistry (Mosc)* 75: 1428-1434.
115. Huang P, Yan R, Zhang X, Wang L, Ke X, Qu Y (2019). Activating Wnt/ β -catenin signaling pathway for disease therapy: Challenges and opportunities. *Pharmacol Ther* 196: 79-90.
116. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, Zhou Z, Shu G, Yin G (2022). Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther* 7: 3.
117. Wang Z, Li Z, Ji H (2021). Direct targeting of β -catenin in the Wnt signaling pathway: Current progress and perspectives. *Med Res Rev* 41: 2109-2129.
118. Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T (2007). The Wnt/ β -catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J Pharmacol Sci* 104: 293-302.

119. Kühl SJ, Kühl M (2013). On the role of Wnt/ β -catenin signaling in stem cells. *Biochim Biophys Acta* 1830: 2297-2306.
120. Nusse R (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15: 28-32.
121. Fuentes RG, Arai MA, Ishibashi M (2015). Natural compounds with Wnt signal modulating activity. *Nat Prod Rep* 32: 1622-1628.
122. Duan P, Bonewald LF (2016). The role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *Int J Biochem Cell Biol* 77: 23-29.
123. Mukherjee N, Panda CK (2020). Wnt/ β -Catenin signaling pathway as chemotherapeutic target in breast cancer: An update on pros and cons. *Clin Breast Cancer* 20: 361-370.
124. Hiremath IS, Goel A, Warriar S, Kumar AP, Sethi G, Garg M (2022). The multidimensional role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in human malignancies. *J Cell Physiol* 237: 199-238.
125. Clevers H, Nusse R (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149: 1192-1205.
126. Colozza G, Koo BK (2021). Wnt/ β -catenin signaling: Structure, assembly and endocytosis of the signalosome. *Dev Growth Differ* 63: 199-218.
127. Hussain M, Xu C, Lu M, Wu X, Tang L, Wu X (2017). Wnt/ β -catenin signaling links embryonic lung development and asthmatic airway remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863: 3226-3242.
128. Sharma S, Tantisira K, Carey V, Murphy AJ, Lasky-Su J, Celedón JC, Lazarus R, Klanderman B, Rogers A, Soto-Quirós M, Avila L, Mariani T, Gaedigk R, Leeder S, Torday J, Warburton D, Raby B, Weiss ST (2010). A role for Wnt signaling genes in the pathogenesis of impaired lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 328-336.
129. Choy DF, Modrek B, Abbas AR, Kummerfeld S, Clark HF, Wu LC, Fedorowicz G, Modrusan Z, Fahy JV, Woodruff PG, Arron JR (2011). Gene expression patterns of Th2 inflammation and intercellular communication in asthmatic airways. *J Immunol* 186: 1861-1869.

130. Yu Z, Jiang Y, Sun C (2020). Glucocorticoids inhibits the repair of airway epithelial cells via the activation of Wnt pathway. *Respir Physiol Neurobiol* 271: 103283.
131. Kwak HJ, Park DW, Seo JY, Moon JY, Kim TH, Sohn JW, Shin DH, Yoon HJ, Park SS, Kim SH (2015). The Wnt/ β -catenin signaling pathway regulates the development of airway remodeling in patients with asthma. *Exp Mol Med* 47: e198.
132. Yao L, Zhao H, Tang H, Xiong J, Zhao W, Liu L, Dong H, Zou F, Cai S (2017). Blockade of β -catenin signaling attenuates toluene diisocyanate-induced experimental asthma. *Allergy* 72: 579-589.
133. Jia XX, Zhu TT, Huang Y, Zeng XX, Zhang H, Zhang WX (2019). Wnt/ β -catenin signaling pathway regulates asthma airway remodeling by influencing the expression of c-Myc and cyclin D1 via the p38 MAPK-dependent pathway. *Exp Ther Med* 18: 3431-3438.
134. Chen Z, He S, Lian S, Shen Y, Jiang W, Zhou L, Zhou L, Zhang X (2023). The Wnt/ β -catenin pathway regulates inflammation and apoptosis in ventilator-induced lung injury. *Biosci Rep* 43: BSR20222429.
135. Guo L, Wang T, Wu Y, Yuan Z, Dong J, Li X, An J, Liao Z, Zhang X, Xu D, Wen FQ (2016). WNT/ β -catenin signaling regulates cigarette smoke-induced airway inflammation via the PPAR δ /p38 pathway. *Lab Invest* 96: 218-229.
136. Fu CY, Chen J, Lu XY, Zheng MZ, Wang LL, Shen YL, Chen YY (2019). Dimethyl fumarate attenuates lipopolysaccharide-induced mitochondrial injury by activating Nrf2 pathway in cardiomyocytes. *Life Sci* 235: 116863.
137. Matteo P, Federico D, Emanuela M, Giulia R, Tommaso B, Alfredo G, Anna C, Annamaria O (2022). New and old horizons for an ancient drug: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical perspectives of dimethyl fumarate. *Pharmaceutics* 14: 2732.
138. Esposito E, Cortesi R, Drechsler M, Fan J, Fu BM, Calderan L, Mannucci S, Boschi F, Nastruzzi C (2017). Nanoformulations for dimethyl fumarate: Physicochemical characterization and in vitro/in vivo behavior. *Eur J Pharm Biopharm* 115: 285-296.
139. Papadopoulou A, D'Souza M, Kappos L, Yaldizli O (2010). Dimethyl fumarate for multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 19: 1603-1612.

140. Al-Jaderi Z, Maghazachi AA (2016). Utilization of dimethyl fumarate and related molecules for treatment of multiple sclerosis, cancer, and other diseases. *Front Immunol* 7: 278.
141. Zhen X, Jindong L, Yang Z, Yashi R, Wei G, Wei J, Wei Z, Sudong L (2021). Activation of Nrf2 pathway by dimethyl fumarate attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 53: 2133-2139.
142. Cen Y, Li F, Li Y, Zhang K, Riaz F, Zhao K, Wei P, Pan F (2024). Dimethyl fumarate alleviates allergic asthma by strengthening the Nrf2 signaling pathway in regulatory T cells. *Front Immunol* 15: 1375340.
143. Jaiswal AK, Sandey M, Suryawanshi A, Cattley RC, Mishra A (2019). Dimethyl fumarate abrogates dust mite-induced allergic asthma by altering dendritic cell function. *Immun Inflamm Dis* 7: 201-213.
144. Cattani-Cavaliere I, da Maia Valença H, Moraes JA, Brito-Gitirana L, Romana-Souza B, Schmidt M, Valença SS (2020). Dimethyl fumarate attenuates lung inflammation and oxidative stress induced by chronic exposure to diesel exhaust particles in mice. *Int J Mol Sci* 21: 9658.
145. Seidel P, Goulet S, Hostettler K, Tamm M, Roth M (2010). DMF inhibits PDGF-BB induced airway smooth muscle cell proliferation through induction of hemoxygenase-1. *Respir Res* 11: 145.
146. Chen H, Assmann JC, Krenz A, Rahman M, Grimm M, Karsten CM, Köhl J, Offermanns S, Wettschureck N, Schwaninger M (2014). Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE. *J Clin Invest* 124: 2188-2192.
147. Han R, Xiao J, Zhai H, Hao J (2016). Dimethyl fumarate attenuates experimental autoimmune neuritis through the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2/hemoxygenase-1 pathway by altering the balance of M1/M2 macrophages. *J Neuroinflammation* 13: 97.
148. Zhao K, Wen LB (2018). DMF attenuates cisplatin-induced kidney injury via activating Nrf2 signaling pathway and inhibiting NF- κ B signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22: 8924-8931.

149. Starkhammar M, Larsson O, Kumlien Georen S, Leino M, Dahlen SE, Adner M, Cardell LO (2014). Toll-like receptor ligands LPS and poly (I:C) exacerbate airway hyperresponsiveness in a model of airway allergy in mice, independently of inflammation. *PLoS One* 9: e104072.
150. Cattani-Cavaliere I, da Maia Valença H, Moraes JA, Brito-Gitirana L, Romana-Souza B, Schmidt M, Valença SS (2020). Dimethyl fumarate attenuates lung inflammation and oxidative stress induced by chronic exposure to diesel exhaust particles in mice. *Int J Mol Sci* 21: 9658.
151. Mahmoudi Z, Kalantar H, Mansouri E, Mohammadi E, Khodayar MJ (2023). Dimethyl fumarate attenuates paraquat-induced pulmonary oxidative stress, inflammation and fibrosis in mice. *Pestic Biochem Physiol* 190: 105336.
152. Wei YY, Xuan XC, Zhang XY, Guo TT, Dong DL (2019). Niclosamide ethanolamine induces trachea relaxation and inhibits proliferation and migration of trachea smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 853: 229-235.
153. Xu Y, Cardell LO (2014). Nicotine impairs cyclooxygenase-2-dependent kinin-receptor-mediated murine airway relaxations. *Toxicol Appl Pharmacol* 275: 12-21.
154. Kawaguchi K, Hashimoto M, Sugimoto M (2021). An antioxidant suppressed lung cellular senescence and enhanced pulmonary function in aged mice. *Biochem Biophys Res Commun* 541: 43-49.
155. Lu X, Xu C, Yang R, Zhang G (2021). Ganoderic Acid A alleviates OVA-induced asthma in mice. *Inflammation* 44: 1908-1915.
156. Abohalaka R, Bozkurt TE, Reçber T, Onder SC, Nemutlu E, Kır S, Sahin-Erdemli I (2022). The effects of systemic and local fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase inhibitor treatments on the metabolomic profile of lungs. *Biomed Chromatogr* 36: e5321.
157. Agache I, Palmer E, Sanver D, Kirtland M, Shamji MH (2022). Molecular allergology approach to allergic asthma. *Mol Aspects Med* 85: 101027.
158. Nials AT, Uddin S (2008). Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech* 1: 213-220.

159. Linssen MJ, Wilhelms OH, Timmerman H (1991). Animal models for testing anti-inflammatory drugs for treatment of bronchial hyperreactivity in asthma. *Pharm Weekbl Sci* 13: 225-237.
160. Bozkurt TE, Larsson O, Adner M (2016). Stimulation of cannabinoid CB1 receptors prevents nerve-mediated airway hyperreactivity in NGF-induced inflammation in mouse airways. *Eur J Pharmacol* 776: 132-138.
161. Bagcivan I, Cevit O, Yildirim MK, Gursoy S, Yildirim S, Kaya T, Mimaroglu C (2007). Investigation of the relaxant effects of propofol on ovalbumin-induced asthma in guinea pigs. *Eur J Anaesthesiol* 24: 796-802.
162. Parlak A, Yildirim S, Bagcivan I, Durmus N (2012). Role of new agents affecting NO/cGMP pathway on ovalbumin-sensitized guinea pig trachea. *Exp Lung Res* 38: 420-426.
163. Kaya-Yasar Y, Karaman Y, Bozkurt TE, Onder SC, Sahin-Erdemli I (2017). Effects of intranasal treatment with slow (GYY4137) and rapid (NaHS) donors of hydrogen sulfide in lipopolysaccharide-induced airway inflammation in mice. *Pulm Pharmacol Ther* 45: 170-180.
164. Held HD, Martin C, Uhlig S (1999). Characterization of airway and vascular responses in murine lungs. *Br J Pharmacol* 126: 1191-1199.
165. Flanagan TW, Sebastian MN, Battaglia DM, Foster TP, Cormier SA, Nichols CD (2019). 5-HT₂ receptor activation alleviates airway inflammation and structural remodeling in a chronic mouse asthma model. *Life Sci* 236: 116790.
166. Ekman AK, Adner M, Cardell LO (2011). Toll-like receptor 7 activation reduces the contractile response of airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 652: 145-151.
167. De Swert KO, Lefebvre RA, Pauwels RA, Joos GF (2007). Role of the tachykinin NK(1) receptor in mediating contraction to 5-hydroxytryptamine and antigen in the mouse trachea. *Pulm Pharmacol Ther* 20: 588-595.

168. Mendez-Enriquez E, Alvarado-Vazquez PA, Abma W, Simonson OE, Rodin S, Feyerabend TB, Rodewald HR, Malinovschi A, Janson C, Adner M, Hallgren J (2021). Mast cell-derived serotonin enhances methacholine-induced airway hyperresponsiveness in house dust mite-induced experimental asthma. *Allergy* 76: 2057-2069.
169. Szarek JL, Zhang JZ, Gruetter CA (1995). Mechanisms of 5-hydroxytryptamine-induced contraction of isolated rat intrapulmonary bronchi. *Pulm Pharmacol* 8: 273-281.
170. Fernandez-Rodriguez S, Broadley KJ, Ford WR, Kidd EJ (2010). Increased muscarinic receptor activity of airway smooth muscle isolated from a mouse model of allergic asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 23: 300-307.
171. Ricciardolo FLM, Folkerts G, Folino A, Mognetti B (2018). Bradykinin in asthma: Modulation of airway inflammation and remodelling. *Eur J Pharmacol* 827: 181-188.
172. Yang Z, Balenga N, Cooper PR, Damera G, Edwards R, Brightling CE, Panettieri RA Jr, Druey KM (2012). Regulator of G-protein signaling-5 inhibits bronchial smooth muscle contraction in severe asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 823-832.
173. Campanholle G, Landgraf RG, Borducchi E, Semedo P, Wang PH, Amano MT, Russo M, Pacheco-Silva A, Jancar S, Camara NO (2010). Bradykinin inducible receptor is essential to lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Eur J Pharmacol* 634: 132-137.
174. Frossard N, Stretton CD, Barnes PJ (1990). Modulation of bradykinin responses in airway smooth muscle by epithelial enzymes. *Agents Actions* 31: 204-209.
175. Dendorfer A, Vordermark D, Dominiak P (1997). Degradation of bradykinin by bovine tracheal epithelium and isolated epithelial cells. *Br J Pharmacol* 120: 121-129.
176. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865: 721-733.

177. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 313-322.
178. Duan L, Li J, Ma P, Yang X, Xu S (2017). Vitamin E antagonizes ozone-induced asthma exacerbation in Balb/c mice through the Nrf2 pathway. *Food Chem Toxicol* 107: 47-56.
179. Bai D, Sun T, Lu F, Shen Y, Zhang Y, Zhang B, Yu G, Li H, Hao J (2022). Eupatilin suppresses OVA-induced asthma by inhibiting NF- κ B and MAPK and activating Nrf2 signaling pathways in mice. *Int J Mol Sci* 23: 1582.
180. Cen Y, Li F, Li Y, Zhang K, Riaz F, Zhao K, Wei P, Pan F (2024). Dimethyl fumarate alleviates allergic asthma by strengthening the Nrf2 signaling pathway in regulatory T cells. *Front Immunol* 15: 1375340.
181. Jang J, Jung Y, Kim Y, Jho EH, Yoon Y (2017). LPS-induced inflammatory response is suppressed by Wnt inhibitors, Dickkopf-1 and LGK974. *Sci Rep* 7: 41612.
182. Xia Y, Wu S (2015). Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 inhibits activation of the β -catenin signaling in melanoma cells. *Cell Cycle* 14: 1666-1674.
183. Hussain M, Xu C, Lu M, Wu X, Tang L, Wu X (2017). Wnt/ β -catenin signaling links embryonic lung development and asthmatic airway remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863: 3226-3242.
184. Zhang M, Shi J, Huang Y, Lai L (2012). Expression of canonical WNT/ β -CATENIN signaling components in the developing human lung. *BMC Dev Biol* 12: 21.
185. Lee H, Bae S, Choi BW, Yoon Y (2012). WNT/ β -catenin pathway is modulated in asthma patients and LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell line. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34: 56-65.
186. Baarsma HA, Königshoff M (2017). 'WNT-er is coming': WNT signalling in chronic lung diseases. *Thorax* 72: 746-759.

187. Liang S, Zhou Z, Zhou Z, Liang J, Lin W, Zhang C, Zhou C, Zhao H, Meng X, Zou F, Yu C, Cai S (2022). Blockade of CBX4-mediated β -catenin SUMOylation attenuates airway epithelial barrier dysfunction in asthma. *Int Immunopharmacol* 113: 109333.
188. Peters M, Köhler-Bachmann S, Lenz-Habijan T, Bufe A (2016). Influence of an allergen-specific Th17 response on remodeling of the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 54: 350-358.
189. Yang X, Lv JN, Li H, Jiao B, Zhang QH, Zhang Y, Zhang J, Liu YQ, Zhang M, Shan H, Zhang JZ, Wu RM, Li YL (2017). Curcumin reduces lung inflammation via Wnt/ β -catenin signaling in mouse model of asthma. *J Asthma* 54: 335-340.
190. Gomart A, Vallée A, Lecarpentier Y (2021). Necrotizing enterocolitis: LPS/TLR4-induced crosstalk between canonical TGF- β /Wnt/ β -catenin pathways and PPAR γ . *Front Pediatr* 9: 713344.
191. Daud T, Roberts S, Zounemat Kermani N, Richardson M, Heaney LG, Adcock IM, Amrani Y, Bradding P, Siddiqui S (2025). The role of WNT5a and TGF- β 1 in airway remodelling and severe asthma. *Allergy* 80: 1025-1037.
192. Kumawat K, Menzen MH, Bos IS, Baarsma HA, Borger P, Roth M, Tamm M, Halayko AJ, Simoons M, Prins A, Postma DS, Schmidt M, Gosens R (2013). Noncanonical WNT-5A signaling regulates TGF- β -induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells. *FASEB J* 27: 1631-1643.
193. Koopmans T, Hesse L, Nawijn MC, Kumawat K, Menzen MH, Bos IS, Smits R, Bakker ERM, van den Berge M, Koppelman GH, Guryev V, Gosens R (2020). Smooth-muscle-derived WNT5A augments allergen-induced airway remodelling and Th2 type inflammation. *Sci Rep* 10: 6754.
194. Koopmans T, Kumawat K, Halayko AJ, Gosens R (2016). Regulation of actin dynamics by WNT-5A: implications for human airway smooth muscle contraction. *Sci Rep* 6: 30676.
195. Beckert H, Meyer-Martin H, Buhl R, Taube C, Reuter S (2018). The canonical but not the noncanonical Wnt pathway inhibits the development of allergic airway disease. *J Immunol* 201: 1855-1864.

196. Su B, Li R, Song F, Liu M, Sun X (2023). S14G-Humanin ameliorates ovalbumin-induced airway inflammation in asthma mediated by inhibition of toll-like receptor 4 (TLR4) expression and the nuclear factor κ -B (NF- κ B)/early growth response protein-1 (Egr-1) pathway. *Aging (Albany NY)* 15: 6822-6833.
197. Lee MH, Koria P, Qu J, Andreadis ST (2009). JNK phosphorylates beta-catenin and regulates adherens junctions. *FASEB J* 23: 3874-3883.
198. Yao L, Zhao H, Tang H, Song J, Dong H, Zou F, Cai S (2015). Phosphatidylinositol 3-kinase mediates β -catenin dysfunction of airway epithelium in a toluene diisocyanate-induced murine asthma model. *Toxicol Sci* 147: 168-177.
199. Ma B, Hottiger MO (2016). Crosstalk between Wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling pathway during inflammation. *Front Immunol* 7: 378.
200. Gendy A, Soubh A, Al-Mokaddem A, Kotb El-Sayed M (2021). Dimethyl fumarate protects against intestinal ischemia/reperfusion lesion: Participation of Nrf2/HO-1, GSK-3 β and Wnt/ β -catenin pathway. *Biomed Pharmacother* 134: 111130.
201. Rajput MS, Nirmal NP, Rathore D, Dahima R (2020). Dimethyl fumarate mitigates tauopathy in A β -induced neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Res* 45: 2641-2652.
202. Seidel P, Merfort I, Hughes JM, Oliver BG, Tamm M, Roth M (2009). Dimethylfumarate inhibits NF- κ B function at multiple levels to limit airway smooth muscle cell cytokine secretion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L326-L339.
203. Campolo M, Casili G, Biundo F, Crupi R, Cordaro M, Cuzzocrea S, Esposito E (2017). The neuroprotective effect of dimethyl fumarate in an MPTP-mouse model of Parkinson's disease: Involvement of reactive oxygen species/nuclear factor- κ B/nuclear transcription factor related to NF-E2. *Antioxid Redox Signal* 27: 453-471.
204. El-Baz LMF, Elaidy SM, Hafez HS, Shoukry NM (2022). Vismodegib, a sonic hedgehog signalling blockade, ameliorates ovalbumin and ovalbumin/lipopolysaccharide-induced airway inflammation and asthma phenotypical models. *Life Sci* 310: 121119.

205. Wu Z, Mehrabi Nasab E, Arora P, Athari SS (2022). Study effect of probiotics and prebiotics on treatment of OVA-LPS-induced of allergic asthma inflammation and pneumonia by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *J Transl Med* 20: 130.
206. Thakur VR, Beladiya JV, Chaudagar KK, Mehta AA (2018). An anti-asthmatic activity of natural Toll-like receptor-4 antagonist in OVA-LPS-induced asthmatic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 45: 1187-1197.
207. Grzegorzewska AP, Seta F, Han R, Czajka CA, Makino K, Stawski L, Isenberg JS, Browning JL, Trojanowska M (2017). Dimethyl Fumarate ameliorates pulmonary arterial hypertension and lung fibrosis by targeting multiple pathways. *Sci Rep* 7: 41605.
208. Kornberg MD, Bhargava P, Kim PM, Putluri V, Snowman AM, Putluri N, Calabresi PA, Snyder SH (2018). Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity. *Science* 360: 449-453.
209. Das B, Ray T, Panda KK, Maiti A, Sarkar S, Sil AK (2014). Leucine and its transporter provide protection against cigarette smoke-induced cell death: A potential therapy for emphysema. *Toxicol Rep* 1: 752-763.
210. Zhu T, Ma Y, Wang J, Xiong W, Mao R, Cui B, Min Z, Song Y, Chen Z (2024). Serum metabolomics reveals metabolomic profile and potential biomarkers in asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 16: 235-252.
211. Xia W, Mao Y, Xia Z, Cheng J, Jiang P (2025). Metabolic remodelling produces fumarate via the aspartate-argininosuccinate shunt in macrophages as an antiviral defence. *Nat Microbiol* 10: 1115-1129.
212. Bouillaud F, Hammad N, Schwartz L (2021). Warburg effect, glutamine, succinate, alanine, when oxygen matters. *Biology (Basel)* 10: 1000.
213. Faverzani JL, Hammerschmidt TG, Mescka CP, Guerreiro G, Lopes FF, Delgado CA, de Moura Coelho D, Sitta A, Deon M, Wajner M, Vargas CR (2023). Increased cytokine levels induced by high phenylalanine concentrations in late diagnosis PKU patients compared to early diagnosis: Anti-inflammatory effect of L-carnitine. *Cell Biochem Funct* 41: 490-500.

214. Rafii M, McKenzie JM, Roberts SA, Steiner G, Ball RO, Pencharz PB (2008). In vivo regulation of phenylalanine hydroxylation to tyrosine, studied using enrichment in apoB-100. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E475-479.
215. Qu N, Wan B, Guo LH (2008). Label-free electrochemical differentiation of phosphorylated and non-phosphorylated peptide by electro-catalyzed tyrosine oxidation. *Analyst* 133: 1246-1249.
216. He M, Zhou X, Wang X (2024). Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications. *Signal Transduct Target Ther* 9: 194.
217. Tatebe Y, Yamamoto Y, Isono N (2025). One-pot enzymatic synthesis of sophorose from sucrose and glucose. *J Appl Glycosci* 72: 7201201.
218. Soto-Herederó G, Gómez de Las Heras MM, Gabandé-Rodríguez E, Oller J, Mittelbrunn M (2020). Glycolysis - a key player in the inflammatory response. *FEBS J* 287: 3350-3369.
219. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029-1033.
220. Ostroukhova M, Goplen N, Karim MZ, Michalec L, Guo L, Liang Q, Alam R (2012). The role of low-level lactate production in airway inflammation in asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302: L300-L307.
221. Qin Z, Chen Y, Wang Y, Xu Y, Liu T, Mu Q, Huang C (2024). Immunometabolism in the pathogenesis of asthma. *Immunology* 171: 1-17.
222. Ocaña MC, Bernal M, Yang C, Caro C, Domínguez A, Vu HS, Cárdenas C, García Martín ML, DeBerardinis RJ, Quesada AR, Martínez-Poveda B, Medina MÁ (2023). New insights in the targets of action of dimethyl fumarate in endothelial cells: effects on energetic metabolism and serine synthesis in vitro and in vivo. *Commun Biol* 6: 1084.
223. Munemoto M, Mukaisho KI, Miyashita T, Oyama K, Haba Y, Okamoto K, Kinoshita J, Ninomiya I, Fushida S, Taniura N, Sugihara H, Fujimura T (2019). Roles of the hexosamine biosynthetic pathway and pentose phosphate pathway in bile acid-induced cancer development. *Cancer Sci* 110: 2408-2420.

224. Lin L, Huang D, Huang H, Xie L, Huang Y, Ye C, Chu L, Qiao Y, Meng X, Cai S, Dong H (2025). Lung microbiota metabolite L-malic acid attenuates the airway inflammation in asthma by inhibiting ferroptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 500: 117396.
225. Dello Y, Jossier M, Schmitz J, Maurino VG, Hodges M (2016). Photorespiratory glycolate-glyoxylate metabolism. *J Exp Bot* 67: 3041-3052.
226. Yamashita S, Segawa R, Satou N, Hiratsuka M, Leonard WJ, Hirasawa N (2013). Induction of thymic stromal lymphopoietin production by nonanoic acid and exacerbation of allergic inflammation in mice. *Allergol Int* 62: 463-471.
227. Ratajczak MK, Ko YT, Lange Y, Steck TL, Lee KY (2007). Cholesterol displacement from membrane phospholipids by hexadecanol. *Biophys J* 93: 2038-2047.
228. Wang L, Luo L, Zhao W, Yang K, Shu G, Wang S, Gao P, Zhu X, Xi Q, Zhang Y, Jiang Q, Wang L (2018). Lauric acid accelerates glycolytic muscle fiber formation through TLR4 signaling. *J Agric Food Chem* 66: 6308-6316.
229. Kim SK, Karadeniz F (2012). Biological importance and applications of squalene and squalane. *Adv Food Nutr Res* 65: 223-233.
230. Dileep KV, Remya C, Cerezo J, Fassihi A, Pérez-Sánchez H, Sadasivan C (2015). Comparative studies on the inhibitory activities of selected benzoic acid derivatives against secretory phospholipase A2, a key enzyme involved in the inflammatory pathway. *Mol Biosyst* 11(7): 1973-1979.
231. Panopoulos A, Harraz M, Engelhardt JF, Zandi E (2005). Iron-mediated H₂O₂ production as a mechanism for cell type-specific inhibition of TNF- α -induced but not IL-1 β -induced I κ B kinase complex/NF- κ B activation. *J Biol Chem* 280(4): 2912-2923.
232. García-Krauss A, Ferrada L, Astuya A, Salazar K, Cisternas P, Martínez F, Ramírez E, Nualart F (2016). Dehydroascorbic acid promotes cell death in neurons under oxidative stress: a protective role for astrocytes. *Mol Neurobiol* 53: 5847-5863.

233. Cass CE, Tan TH, Selner M (1979). Antiproliferative effects of 9-beta-D arabinofuranosyladenine 5'-monophosphate and related compounds in combination with adenosine deaminase inhibitors against mouse leukemia L1210/C2 cells in culture. *Cancer Res* 39: 1563-1569.
234. Chiaradia E, Sansone A, Ferreri C, Tancini B, Latella R, Tognoloni A, Gambelunghe A, dell'Omo M, Urbanelli L, Giovagnoli S, Pellegrino RM, Cerrotti G, Emiliani C, Buratta S (2023). Phospholipid fatty acid remodeling and carbonylated protein increase in extracellular vesicles released by airway epithelial cells exposed to cigarette smoke extract.





EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Elif GÜN

Uyruğu : T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri :

Adres (İş) :

: -

Tel (İş) :

E-Posta

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı	2019-
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2019
Lise	Yüksel İlhan Alanyalı Anadolu Öğretmen Lisesi	2013

MESLEKİ DENEYİM

Görevi	Kurum	Süre
1. Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2020-
2. Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi İlaç ve Farmasötik Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi	2023-

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Sağlık Bilimleri, Eczacılık Meslek Bilimleri, Farmakoloji

Bilimsel Dernek, Organizasyon Ve Kuruluşlardaki Üyelikler/Görevler

18. Bölge Trabzon Eczacı Odası, Üye, 2020- Devam ediyor

Türk Farmakoloji Derneği, Üye, 2019-Devam ediyor

Adli ve Klinik Toksikoloji Derneği, Üye, 2022- Devam ediyor

Projeler

1. Çavuşoğlu Nalbantoğlu İ., Arıca İ.E., Türkmen Usta Z., Sevgi S., Gün E., Ay İ., Demirçi B. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, In Vivo Psöriazis Fare Modelinde Ursodeoksikolik Asidin Terapötik Etkinliğinin Araştırılması, 2025- Devam ediyor
2. İpek H., Sezen F.S., Varol T., Uşun A., Gün E., Aksa C.H. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Kişiyeye Özel Mandibula Protez Üretim ve Test Süreçlerinin Geliştirilmesi, 2024- Devam ediyor
3. Gün E., Yaşar Kaya Y., Saygın İ., Engin S., Erdoğan Kablan S. TÜBİTAK 1002-A Destek Programı, Farede OVA-LPS ile İndüklenen Alerjik Astım Modelinde Dimetil Fumaratın Terapötik Etkinliğinin Araştırılması, 2024- Devam ediyor
4. Kalha Z., Sezen F.S., Yenilmez E., Yazar U., Sevgi S., Çavuşoğlu Nalbantoğlu İ., Gün E. TÜBİTAK 1002-A Destek Programı, Mitokondri Hedefleme Ajanı Olan MitoTempo'nun Sıçan Omurilik Hasarına Bağlı Olan Mesane Disfonksiyonunda Terapötik Etkileri, 2023-2025.
5. Demirçi B., Gün E. TÜBİTAK 2209-A Destek Programı, Trimetazidinin HaCaT Hücre Hattı ile Oluşturulan In Vitro Psöriazis Modelinde Antiinflamatuvar Etkinliğinin Araştırılması, 2022-2024.
6. Demir Öksüz Z., Dinçer T., Renda G., Sevgi S., Uzun Ü., Gün E. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Tchihatchewia Isatidea Ekstrelerinin In Vitro Psöriazis Modeli Olarak HaCaT Keratinositleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi, 2022-2024.
7. Sezen F.S., Renda G., Yaşar Kaya Y., Engin S., Serdaroğlu V., Kalha Z., Gün E. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Balık Yetiştiriciliği ve Araştırmalarında Kullanılabilecek Alternatif Anestezik Maddelerin Geliştirilmesi, 2021-2024.
8. Barut E.N., Yaşar Kaya Y., Engin S., Gün E., Duman M. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Farelerde Gemfibrozil ve Telmisartanın Morfin Toleransı Üzerindeki Olası Terapötik Etkileri ve Mekanizmalarının İncelenmesi, 2021-2023.
9. Sezen F.S., Gül Kılınç G., Yaşar Kaya Y., Engin S., Sevgi S., Gün E. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Tarım İlaçlarında GLP Standartlarında Toksisite Araştırılması, 2019-2023.
10. Engin S., Gün E., Barut E.N. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Farelerde Siklofosfamidle İndüklenen Hemorajik Sistit Modelinde Trimetazidin Dihidroklorürün Protektif Etkilerinin Araştırılması, 2021-2022.

Bildiriler

1. Durmuş M., Ustaömer S., **Gün E.**, Engin S., Helvacı G., Sevgi S. (2025). Yatarak Tedavi Gören Hastalarda Statin Kullanımının Değerlendirilmesi: Farmasötik Bakım Uygulama Dersinden Bir Klinik Gözlem. Marmara Eczacılık Fakültesi Ulusal Eczacılık Kongresi, İstanbul, Türkiye, 8-10 Mayıs 2025, Poster Bildiri, ss. 117
2. Ustaömer S., Durmuş M., Engin S., **Gün E.**, Helvacı G., Sevgi S. (2025). Yatarak Tedavi Gören Hastalarda Enoksaparin Kullanımının Değerlendirilmesi: Farmasötik Bakım Uygulama Dersinden Bir Klinik Gözlem. Marmara Eczacılık Fakültesi Ulusal Eczacılık Kongresi, İstanbul, Türkiye, 8-10 Mayıs 2025, Poster Bildiri, ss. 116.
3. Uzun Ü., Demir Öksüz Z., **Gün E.**, Sevgi S., Demirçi B. (2024). Experimental Psoriasis Research: Overview of In Vitro Models Used. 1. Uluslararası Ankara Bilimsel Araştırmalar ve İnovasyon Kongresi, 21-22 Aralık 2024, Sözlü Bildiri, ss. 169-189, Online.
4. Çavuşoğlu Nalbantoğlu İ., **Gün E.**, Sevgi S., Demirçi B., Helvacı G., Pınarbaşı O. (2024). Ursodeoksikolik Asidin İn Vitro ve İn Vivo Hayvan Çalışmalarındaki Antifibrotik Etkilerinin Değerlendirilmesi. 5th International Congress on Khazar Scientific Research and Innovation, 26-28 Aralık 2024, Sözlü Bildiri, ss. 686-702, Online.
5. **Gün E.**, Yaşar Kaya Y. (2024). Treatment Approaches for Preeclampsia and Current Clinical Research. 5th International Congress on Khazar Scientific Research and Innovation, 26-28 Aralık 2024, Sözlü Bildiri, ss. 325-335, Online.
6. **Gün E.**, Erköseoğlu İ., Demirci B., Gürsoy T., Özdemir H., Duman M. (2024). Exposure to Medroxyprogesterone During Pregnancy. 5th Regional TIAFT Meeting in Türkiye, Diyarbakır, Türkiye, 9-11 Ekim 2024, Sözlü Bildiri.
7. **Gün E.**, Erköseoğlu İ., Duman M., Yarış E., Kalyoncu İ.N. (2024). Case Report: Mesalamine Use in Pregnancy and Two Babies with Situs Inversus Totalis From Same Mother. 5th Regional TIAFT Meeting in Türkiye, Diyarbakır, Türkiye, 9-11 Ekim 2024, Poster Bildiri.
8. Çavuşoğlu Nalbantoğlu İ., Sevgi S., **Gün E.**, Kalha Z., Demirçi B. (2024). Current State of Drug Induced Vasculitis. 8th International ICONTECH CONGRESS on Innovative Surveys in Positive Sciences, Bakü, Azerbaycan, 16-18 Mart 2024, Sözlü Bildiri, ss.415-422, Online.

9. Sevgi S., Çavuşoğlu Nalbantoğlu İ., **Gün E.**, Demirçi B., Kalha Z. (2024). İlaçla İndüklenen Antifosfolipid Sendromu: Klinik Önemi ve Güncel Durumun Değerlendirilmesi. 8th International ICONTECH CONGRESS on Innovative Surveys in Positive Sciences, Bakü, Azerbaycan, 16-18 Mart 2024, Sözlü Bildiri, ss. 467-476, Online.
10. Sevgi S., Demir Öksüz Z., **Gün E.**, Büyüктаş A., Çakır Çoban C., Dinçer T. (2023). Antiproliferative Effect of Astragaloside-IV in A Cell Culture Model of Psoriasis. 9th International BAU Drug Design Congress, İstanbul, Türkiye, 29 Kasım-2 Aralık 2023, Poster Bildiri.
11. Demirçi B., **Gün E.**, Demir Öksüz Z., Sevgi S., Yaşar Kaya Y., Engin S. (2023). Repositioning of Trimetazidine: Effects in an In Vitro Model of Psoriasis. 9th International BAU Drug Design Congress, İstanbul, Türkiye, 29 Kasım-2 Aralık 2023, Poster Bildiri.
12. Ay İ., Çakır Çoban C., Sevgi S., **Gün E.**, Sezen F.S. (2023). GLP Standartlarında Akut Oral Toksikite Çalışması: KTÜ İLAFAR Tecrübesi. 6. International Food, Agriculture and Veterinary Sciences Congress, Ganca Azerbaycan, 22-23 Eylül 2023, Sözlü Bildiri, ss. 727-729, Online.
13. **Gün E.**, Sevgi S., Engin S., Barut E.N., Barut B., Serdaroğlu V. (2021). Tchiatchewia Isatidea Ekstresinin In Vitro ve In Vivo Antiinflamatuvar Etkileri. 26. Ulusal ve 1. Uluslararası Farmakoloji Kongresi, 4-6 Kasım 2021, Sözlü Bildiri, ss. 252, Online.
14. Yaşar Kaya Y., Engin S., Barut E.N., **Gün E.**, Renda G., Sezen F.S. (2021). Tocolitic Effect of Senecio Trapezuntinus Boiss Extract, 26. Ulusal ve 1. Uluslararası Farmakoloji Kongresi, 4-6 Kasım 2021, Sözlü Bildiri, ss. 455-456, Online.
15. **Gün E.**, Dilaver D., Yıldırım D., Çavuşoğlu Nalbantoğlu İ., Erköseoğlu İ. (2019). Azatioprine Maruz Kalmış Gebelerde Spontan Düşükler. 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 9. Klinik Farmakoloji Sempozyumu ve 8. Klinik Toksikoloji Sempozyumu, Aydın, Türkiye, 4-7 Kasım 2019, Poster Bildiri, ss. 252
16. Çavuşoğlu Nalbantoğlu İ., Dilaver D., **Gün E.**, Yıldırım D., Duman M., Sezen F.S. (2019). Teratogenic Potential of Antidepressant Drug Use During Pregnancy: Evaluation of Cases Referred to KTU Teratogenicity Information Service. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, Malatya, Türkiye, 1-3 Temmuz 2019, Sözlü Bildiri, ss. 439-441.