



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**FAREDE BLEOMİSİN İLE OLUŞTURULAN
DENEYSEL AKCİĞER FİBROZİS MODELİNE
KARŞI 3,4-LAKTO SİKLOASTRAGENOL
MOLEKÜLÜNÜN ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

BÜŞRA DAYIOĞLU

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

İZMİR

2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**FAREDE BLEOMİSİN İLE OLUŞTURULAN
DENEYSEL AKCİĞER FİBROZİS MODELİNE
KARŞI 3,4-LAKTO SİKLOASTRAGENOL
MOLEKÜLÜNÜN ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Büşra DAYIOĞLU

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Eş Danışman: Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir

2021

Büşra DAYIOĞLU tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Farede Bleomisin ile Oluşturulan Deneysel Akciğer Fibrozis Modeline Karşı 3,4-lakto Sikloastragenol Molekülünün Etkisinin Değerlendirilmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29/01/2021 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:	
Raportör Üye	:	
Üye	:	
Üye	:	
Üye	:	



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Farede Bleomisin ile Oluşturulan Deneysel Akciğer Fibrozis Modeline Karşı 3,4-lakto Sikloastragenol Molekülünün Etkisinin Değerlendirilmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

29/01/2021

Büşra DAYIOĞLU

ÖZET**FAREDE BLEOMİSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL AKCİĞER
FİBROZİS MODELİNE KARŞI 3,4-LAKTO SİKLOASTRAGENOL
MOLEKÜLÜNÜN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DAYIOĞLU, Büşra

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

Ocak 2021, 139 sayfa

İdiyopatik akciğer fibrozis (İAF) patogenezi belirsiz, etkin tedavisi olmayan ve yaşlanma ile ilişkilendirilen kronik akciğer hastalığıdır. Hücre yaşlanmasında tetikleyici faktörlerden biri oksidatif strestir ve İAF’de rolü olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, bleomisin (BLM) ile indüklenen fare akciğer fibrozis modelinde E-CG-01 (3,4-lakto-sikloastragenol) molekülünün protektif etkisi antioksidan özelliği açısından incelendi. Akciğer fibrozisi, Hematoksilen-Eozin, Masson Trikrom boyama ve immunohistokimyasal boyamalar (TGF-beta1, Tip I kollajen, Ki-67, gama-H2AX belirteçleri için) ile değerlendirildi. Ayrıca katalaz ve SOD enzimlerinin aktivite analizleri, total oksidan seviyesi (TOS), total GSH ve MDA seviyelerinin ölçümleri ve nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) için western blot analizi yapıldı. Sonuçta, histoloji analizlerinde molekülün üç farklı dozunun da BLM kontrol grubuna kıyasla fibrozisin ilerlemesine karşı proflaktik etki sağladığı belirlendi. Ancak sadece yüksek dozda uygulanan molekülün Nrf2 nükleer translokasyonunu arttırdığı ve TOS’u azalttığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Akciğer Fibrozis, Sikloastragenol, C57BL/6, Bleomisin, Oksidatif Stres



ABSTRACT**EVALUATION OF THE EFFECT OF 3,4-LACTO
CYCLOASTRAGENOL MOLECULE AGAINST BLEOMYCIN
INDUCED EXPERIMENTAL PULMONARY FIBROSIS MODEL IN
MICE**

DAYIOĞLU, Büşra

M.Sc. in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aylin SENDEMİR

2nd Supervisor: Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

January 2021, 139 pages

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an aging-related, chronic lung disease, with unclear pathogenesis and no effective treatment. One of the triggering factors in cell aging is oxidative stress and it is known to have a role in IPF. In this thesis, the protective effect of E-CG-01 (3,4-lacto-cycloastragenol) molecule in terms of its antioxidant properties was evaluated in bleomycin (BLM) induced mice lung fibrosis model. Fibrosis was examined by Hematoxylin-Eosin, Masson Trichrome and immunohistochemical staining for TGF-beta1, Type I collagen, Ki-67, gama-H2AX markers. Activity analysis of catalase and SOD enzymes, measurement of total oxidant (TOS), total GSH and MDA levels and western blot analysis for Nrf2 were performed. In histology analysis, it was determined that all three different doses of the molecule provided prophylactic effect against the progression of fibrosis compared to the BLM control group. However, it was observed that only the molecule applied in the high dose increased Nrf2 nuclear translocation and decreased TOS.

Keywords: Lung Fibrosis, Cycloastragenol, C57BL/6, Bleomycin, Oxidative Stress

ÖNSÖZ

Bu çalışmada henüz etkin bir tedavisi bulunamamış, ölümcül bir hastalık olan idiyopatik akciğer fibrozisi hastalığı ele alındı. Bu tez çalışması ile amacım, bu hastalığın patogenezi ile ilgili mevcut hipotezlerden yola çıkarak bu hastalığa karşı proflaktik etki gösterme potansiyeli olduğu düşünülen, Prof. Dr. Erdal Bedir ve ekibi tarafından ulusal ve uluslararası patent başvuruları gerçekleştirilmiş E-CG-01 molekülü ile ilgili olarak literatüre katkı sağlayabilmek olmuştur.

Büşra DAYIOĞLU

29/01/2021

İZMİR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
TABLolar DİZİNİ	xxiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Solunum Sisteminin Embriyolojisi.....	3
2.2. Solunum Sisteminin Histolojisi.....	8
2.3. Normal Yara İyileşmesi ve Fibrozis	11
2.4. İAF'nin Patogenezi.....	15
2.4.1. Tip 2 AEC: anormal onarım sürecinin başlaması.....	18
2.4.2. Endotelyum ve koagülasyon kaskadının rolü.....	20
2.4.3. Mezenkimal hücreler ve ECM: Hastalığın ilerlemesi.....	20
2.4.4. İnflamasyon ve bağışıklık	22

İÇİNDEKİLER (devam)

2.5. İAF Epidemiyolojisi	23
2.6. Risk Faktörleri.....	24
2.6.1 Oksidatif stres.....	24
2.6.2. Yaşlanma, telomer kısalması ve genetik etkiler	27
2.6.3. Çevresel riskler	30
2.6.4. Mikrobiyal ajanlar	31
2.6.5. Eş zamanlı hastalıklar	31
2.7. Teşhis.....	32
2.8. Tedaviye Yönelik En Önemli Mevcut Uygulamalar	33
2.8.1. Farmakolojik uygulamalar	33
2.8.2. Farmakolojik olmayan uygulamalar	36
2.9. Sikloastragenol	37
2.10. <i>In Vivo</i> Akciğer Fibrozisi Modeli.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Çalışma Tasarımı.....	46

İÇİNDEKİLER (devam)

3.2. Fare Akciğer Fibrozis Modelinin Oluşturulması.....	49
3.2.1. Gereçler	49
3.2.2. Yöntem.....	49
3.3. E-CG-01 Molekülünün Uygulanması.....	50
3.4. Farelerin Günlük Kilo Takibi.....	50
3.5. Akciğer Ağırlıklarının İncelenmesi	51
3.6. Histolojik Takip ve Analizler	51
3.6.1. Akciğerlerin histolojik analizler için toplanması.....	51
3.6.2. Histolojik takip ve gömme	53
3.6.3. Kesit alma.....	54
3.6.4. Histokimyasal boyama.....	54
3.7. Doku Homojenizasyonu.....	59
3.7.1. Nrf2 western blot analizinde kullanılacak lizatların hazırlanması	59
3.7.2. Biyokimya analizlerinde kullanılacak lizatların hazırlanması	60

İÇİNDEKİLER (devam)

3.8. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi (Bikinkonik Asit Yöntemi)	60
3.9. Biyokimyasal Analizler	62
3.9.1. TOS ölçümü	62
3.9.2. SOD aktivite analizi.....	64
3.9.3. Lipid peroksid düzeyinin ölçümü	65
3.9.4. GSH analizi	67
3.9.5. Katalaz aktivite analizi.....	69
3.10. Moleküler Biyoloji Analizi - İmmunoblotlama (Western Blot)	72
3.10.1. Gereçler	72
3.10.2. Yöntem.....	72
3.11 İstatistiksel Analizler	75
4. BULGULAR	77
4.1. Islak Akciğer Ağırlıkları.....	77
4.2. Histoloji	79
4.3. Biyokimya Analizleri	93

İÇİNDEKİLER (devam)

4.4 Moleküler Analiz.....	98
TARTIŞMA.....	99
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	113
KAYNAKLAR DİZİNİ	115
TEŞEKKÜR	137
ÖZGEÇMİŞ.....	138

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Solunum ağacının şematik gösterimi (Resim biorender.com ile oluşturuldu) ..	9
2.2 Solunum sistemi epitel katmanlarının şematik gösterimi (Resim biorender.com ile oluşturuldu).....	10
2.3 Yara iyileşmesi sırasında oluşturulan geçici matris (Resim biorender.com ile oluşturuldu).	12
2.4 İAF’de anormal yara iyileşmesi sonucu meydana gelen fibrosis oluşumunun özet halindeki şematik gösterimi (Resim biorender.com ile oluşturuldu).	17
2.5 ROS oluşumu ve katabolizmalarında yer alan antioksidan enzimler.	26
2.6 Telomer kısalmasının şematik gösterimi (Resim biorender.com ile oluşturuldu).	28
2.7 Sporadik İAF gelişimine yatkınlık sağlayan genetik mutasyonların tahmini prevalansı (Wolters et al., 2014).....	29
2.8 Sikloastragenolün kaynağı ve kimyasal yapısı (Bedir, 1998)	40
2.9. E-CG-01’in kimyasal yapısı ve formülü	42
3.1 Farelerin kafeslerde deney gruplarına göre ayrılması.....	48
3.2 Deneysel tasarımın şematik gösterimi	48
3.3 Gavaj iğnesi	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

3.4 BLM ve SF'in gavaj iğnesi yardımıyla farelere i.t. uygulanması.....	50
3.5 Farelerin tartımı.	51
3.6 Disseksiyon.....	52
3.7 Masson Trikrom boyama için çalışma düzeneği	57
3.8 BCA protein tayini için çalışma düzeneği.....	62
3.9 TOS ölçümü için çalışma düzeneği.	63
3.10 SOD aktivite analizi için çalışma düzeneği.....	65
3.11 MDA analizi çalışma düzeneği.....	66
3.12 GSH analizi için çalışma düzeneği	69
3.13 Katalaz aktivite analizi için çalışma düzeneği.....	71
4.1 Deney gruplarına ait akciğer görüntüleri.....	77
4.2 Deney gruplarına ait akciğer/vücut ağırlık oranları. BLM deney grubuna (akciğer fibrozis modeline) ait akciğer/vücut ağırlık oranında SF kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görülmüştür. E-CG-01 molekülünün yüksek dozunun BLM'den kaynaklanan akciğer/vücut ağırlık oranındaki artışı engellediği görülmüştür. DMSO ve E-CG-01'in kontrol gruplarının akciğer/vücut ağırlık oranında değişime sebep olmadığı belirlenmiştir. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. (* $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$).....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.3 H&E boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-

01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, i) Yüksek doz E-CG-01+BLM. Büyük resimler X40, Küçük resimler X4 büyütme (Büyütme ölçeği X10= 500 µm, X20= 250 µm, X40= 125 µm). 79

4.4 Masson trikrom boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, i) Yüksek doz E-CG-01+BLM. Büyük resimler X40, Küçük resimler X4 büyütme (Büyütme ölçeği X10= 500 µm, X20= 250 µm, X40= 125 µm). 80

4.5 Deney gruplarına göre ait alveol duvar kalınlığı. BLM grubuna ait alveollerin duvar kalınlıkları SF kontrole göre yüksek seviyede artmıştır. BLM'den kaynaklanan alveol duvarlarındaki kalınlaşmayı E-CG-01'nin üç farklı dozu da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. DMSO ve E-CG-01 kontrol gruplarının alveol duvarlarının kalınlaşmasında etkisi olmadığı görülmüştür. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$ #### $p \leq 0.0001$).83

4.6 Deney gruplarına ait ödem oluşumu. BLM grubunda SF kontrole göre ödem oluşumu gerçekleşmiştir. BLM uygulaması sonrası artan ödem oluşumunu E-CG-01'nin üç farklı dozu da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. DMSO ve E-CG-01 kontrol gruplarının ödem oluşumunda etkisi olmadığı görülmüştür. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.01$). 84

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.7 Anti- Tip 1 kollajen boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, ı) Yüksek doz E-CG-01+BLM. Büyük resimler X40, Küçük resimler X4 büyütme (Büyütme ölçeği X10= 500 μ m, X20= 250 μ m, X40= 125 μ m). 85

4.8 Deney gruplarına göre tip I kollajen yoğunluğu. BLM grubunda SF kontrole anlamlı seviyede tip I kollajen oluşumu gerçekleşmiştir. BLM ile indüklenen tip I kollajen oluşumunu E-CG-01'nin üç farklı dozu da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. DMSO ve E-CG-01 kontrol grupları tip I kollajen üretimine yol açmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ## $p \leq 0.01$). 86

4.9 Anti TGF- β boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, ı) Yüksek doz E-CG-01+BLM. Büyük resimler X40 (Büyütme ölçeği X10= 500 μ m, X20= 250 μ m, X40= 125 μ m). 87

4.10 Deney gruplarına göre TGF- β yoğunluğu. BLM grubunda SF kontrolle kıyaslandığında TGF- β seviyesinde artış görülmüştür. E-CG-01'nin üç farklı dozu da BLM sebebiyle oluşan TGF- β 'nin yoğunluğunu azaltmıştır. DMSO ve E-CG-01 kontrol grupları TGF- β üretimine yol açmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. (** $p \leq 0.01$, ## $p \leq 0.01$) 88

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.11 Anti-Ki-67 boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, ı) Yüksek doz E-CG-01+BLM. Büyük resimler X40 (Büyütme ölçeği X10= 500 µm, X20= 250 µm, X40= 125 µm). 89

4.12 Deney gruplarına göre Ki-67 pozitif hücre yoğunluğu. SF kontrole kıyasla BLM grubunda Ki-67 pozitif hücre sayısının arttığı görülmüştür. E-CG-01'nin üç farklı dozunun da BLM sebebiyle artan Ki-67 pozitif hücre yoğunluğunu azalttığı belirlenmiştir. DMSO ve E-CG-01 kontrol grupları Ki-67 pozitif hücre sayısında değişime sebep olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. (*** $p \leq 0.0001$, #### $p \leq 0.0001$)..... 90

4.13 Anti-γH2AX boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, ı) Yüksek doz E-CG-01+BLM. (Büyütme ölçeği X10= 500 µm, X20= 250 µm, X40= 125 µm)..... 91

4.14 Deney gruplarına göre γ-H2AX yoğunluğu. BLM grubunda γ-H2AX'te artış görülmüştür. E-CG-01'nin üç farklı dozda da BLM sebebiyle gerçekleşen γ-H2AX'teki artışı anlamlı düzeyde engellemiştir. DMSO ve E-CG-01 kontrol grupları γ-H2AX yoğunluğunda değişime sebep olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ## $p \leq 0.01$). 92

4.15 Deney gruplarına ait TOS grafiği. BLM grubuna ait TOS değerinde SF kontrolüne göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. BLM sebebiyle artan TOS

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

sadece yüksek dozda E-CG-01 uygulanması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. DMSO ile SF grupları arasında farklılık görülmemiştir. E-CG-01 kontrol grupları DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında TOS değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalışa sebep olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. (* $p \leq 0.05$, # $p \leq 0.05$).....93

4.16 Deney gruplarına ait SOD aktivite grafiği. BLM grubuna ait SOD % inhibisyonunda SF kontrolüne göre istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmüştür. BLM sebebiyle azalan SOD aktivitesi yalnızca ara dozda E-CG-01 uygulanması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. DMSO grubuna ait SOD aktivitesi SF kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır. E-CG-01 kontrol grupları DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında SOD % inhibisyon değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalışa sebep olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, #### $p \leq 0.0001$)94

4.17 Deney gruplarına ait katalaz aktivite grafiği. BLM grubuna ait katalaz aktivitesinde SF kontrolüne göre istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmüştür. BLM sebebiyle azalan SOD aktivitesinde, üç farklı dozda E-CG-01 uygulanması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı değişim olmamıştır. DMSO grubuna ait katalaz aktivitesi SF kontrol grubu ile kıyaslandığında farklılık olmadığı görülmüştür. E-CG-01 kontrol grupları DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında katalaz aktivite değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalışa sebep olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. (# $p \leq 0.05$)95

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.18 Deney gruplarına ait total GSH grafiği. BLM grubuna ait total GSH miktarında SF kontrolüne göre istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmüştür. BLM sebebiyle azalan total GSH miktarında, üç farklı dozda E-CG-01 uygulanması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı değişim olmamıştır. DMSO grubuna ait total GSH miktarı SF kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark görülmemiştir. E-CG-01 kontrol grupları DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında total GSH miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. ($^{\#}p \leq 0.05$)..... 96

4.19 Deney gruplarına ait MDA grafiği. BLM grubuna ait MDA miktarında SF kontrolüne göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. BLM sebebiyle artan MDA miktarında, üç farklı dozda E-CG-01 uygulanması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmemiştir. DMSO grubuna ait MDA miktarı SF kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark bulunmamıştır. E-CG-01 kontrol grupları DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında MDA miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. ($^{\#}p \leq 0.05$)..... 97

4.20 Nükleer-Sitoplazmik ayırım sonrası NRF2 western blot sonucu. 98

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Deney grubu planı.....	47
3.2 Histolojik doku takibinde uygulanan işlemler	53
3.3 H&E boyama işlem basamakları	55
3.4 Masson trikrom boyamada uygulanan işlem basamakları	56
3.5 İmmunohistokimyasal boyamalarda uygulanan işlem basamakları	58
3.6 Doku miktarına göre reaktif hacimleri.	60
3.7 SOD analizinde kullanılan çözelti miktarları	64
3.8 SDS-PAGE Ayırma Jelinin (Separating Gel) hazırlanması	73
3.9 SDS-PAGE Yığınlama Jelinin (Stacking Gel) hazırlanması.....	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

°C

Santigrat Derece

mg

Miligram

kg

Kilogram

mL

Mililitre

μL

Mikrolitre

dk

Dakika

%

Yüzde

U

Ünite

nm

Nanometre

≤

Küçük eşittir

Fe(II)

+2 oksidasyon durumunda demir elementi

Fe(III)

+3 oksidasyon durumunda demir elementi

Kısaltmalar

Açıklama

AD

Anabilim Dalı

Abs

Absorbans

AEC

Alveolar epitel hücresi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

ARE	Antioksidan yanıt elementi
ASCEND	Assessment of Pirfenidone to Confirm Efficacy and Safety in Idiopathic Pulmonary Fibrosis
ATS/ERS/JRS/ALAT	Amerikan Toraks Derneği/Avrupa Solunum Derneği/Japon Solunum Topluluğu/Latin Amerika Toraks Derneği
BLM	Bleomisin
BSA	Sığır serum albümin
CCL2	Kemokin C-C Motif Ligand 2
CD34	Farklılaşma kümesi 34
CD45	Farklılaşma kümesi 45
CTGF	Bağ Doku Büyüme Faktörü
CXCL12	C-X-C motif kemokin 12
dH ₂ O	Distile Su
ddH ₂ O	İki kez distile edilmiş su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Ekstraselüler Matris
EDTA	Tripsin- etilendiamin tetraasetik asit solüsyonu
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

EMT	Epitel-Mezenkimal Geçiş
ER	Endoplazmik Retikulum
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FITC	Fluoresan İzotiyosiyanat
GSH	Glutasyon
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HCl	Hidroklorik asit
H&E	Hematoksilen ve Eozin
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HRCT	Yüksek Çözünürlüklü Bilgisayarlı Tomografisi
HRP	Bayır Turpu Peroksidazı
hTERT	insan Telomeraz Ters Transkriptaz
hTR	Katalitik Ters Transkriptaz
İAF	İdiyopatik Akciğer Fibrozisi
IFIGENIA	Idiopathic Pulmonary Fibrosis International Group Exploring NAC I Annual
İİP	İdiyopatik İnterstisyel Pnömoni

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

IL-1 α	İnterlökin-1 alfa
IL-4	İnterlökin-4
IL-5	İnterlökin-5
IL-13	İnterlökin-13
i.p.	İntraperitoneal
i.t.	İntratrakeal
İYTE	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
MDA	Malondialdehit
mTERT	fare Telomeraz Ters Transkriptaz
NAC	N-Asetilsistein
NaOH	Sodyum Hidroksit
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
PANTHER-IPF	İAF'lı Hastalarda Prednizon, Azatioprin ve N-asetilsisteinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi
PARN	Poli(A) Spesifik Ribonükleaz
PBS	Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PFA	Paraformaldehit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTEL	Telomer Uzunluğu Regülatörü
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
SH-SY5Y hücre hattı	İnsan Kaynaklı Dopaminerjik Nöroblastoma Hücre
SOD	Süperoksit Dismutaz
SPA2	Sürfaktan Proteini A2
SPC	Sürfaktan Proteini C
TERC	Telomeraz RNA Bileşeni
TERT	Telomeraz Ters Transkriptaz
TGF- β	Transforme Büyüme Faktörü-Beta
Th-1	Tip 1 yardımcı T lenfosit
Th-2	Tip 2 yardımcı T lenfosit
Th-17	Tip 17 yardımcı T lenfosit
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü alfa
TOS	Total Oksidan Seviyesi
UIP	Usual İnterstisyel Pnömoni

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
α -SMA	alfa-Düz Kas Aktin



1.GİRİŞ

Kriptojenik fibrozis oluşturan alveolit olarak da bilinen “idiyopatik akciğer fibrozisi” (İAF) kötü prognoz ve sınırlı tedavi seçenekleri ile tanıyı takiben 2-5 yıllık ortalama sağkalım süresi olan, çoğunlukla yaşlıları etkileyen kronik, ilerleyici bir akciğer hastalığıdır. “İdiyopatik” ifadesinin ima ettiği gibi İAF'nin doğal seyri tam olarak bilinmemektedir (Carrington et al., 2018; Mouratis and Aidinis, 2011). İAF egzersize bağlı nefes darlığı, kalıcı kuru öksürük ve dispne ile kendini gösterir ve radyolojik olarak belirgin bir bal peteği ve normal interstisyel pnömoninin histolojik modeli ile karakterize edilir (Mouratis and Aidinis, 2011).

İAF'nin sebebi tam olarak bilinmemektedir. Yaşlanma ile birlikte, sigara kullanımı, çevresel maruziyetler (silika, metal tozları vd.), mikrobiyal patojenler, Epstein-Barr gibi bazı virüsler ve genetik faktörlerin İAF gelişiminde rol alan potansiyel riskler olduğu belirtilmektedir. İAF'nin patogenezi ile ilgili araştırmalara ve hipotez geliştirilmeye devam edilmektedir (Glassberg, 2019).

İAF'nin dünya genelinde her 100.000 insandan 13-20 kişide görüldüğü ve 3 milyon kişiyi etkilediği tahmin edilmektedir. İAF interstisyel akciğer hastalıklarının %55'ini oluşturmaktadır. Hastalığın sporadik formu ailevi akciğer fibrozisine göre daha sık görülmektedir (Genetics Home Reference, 2019; Glassberg, 2019).

İAF'nin henüz tedavisi bulunamamıştır ancak, antifibrotik ajanlar olan Nintedanip ve Pirferidon'un hastalığın erken evrelerinde hastalığın ilerlemesini yavaşlattığı gösterilmiştir. Ancak hastalığın ileriki seviyelerinde henüz tek seçenek akciğer naklidir (Glassberg, 2019). Ölümcül sağlık sorunlarından biri olan İAF'nin sebebini oluşturan mekanizmaların, İAF hastalık modelleri üzerinden aydınlatılması ve tedavi yöntemlerinin incelenmesi günümüzde oldukça önem taşımaktadır.

Lenfomalar, baş-boyun skuamoz hücreli karsinomlar, testis karsinomu, yumurtalık kanseri ve malign plevral efüzyonlar gibi çeşitli neoplastik hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bir kemoterapötik ajan olan bleomisin (BLM) insanlarda akciğer fibrozisine

yol açabileceğinin onaylanması, deneysel modellerde kullanılmasına neden olmuştur ve kırk yıldır, BLM-indüklü modeller en sık uygulanan deneysel akciğer fibrozisi modelleri olmuştur. BLM uygulaması, DNA sarmal kırıkları, oksidatif stresin indüklenmesi ve serbest radikallerin oluşumu sonucu doğrudan hücre hasarı ile sonuçlanır. Hücre nekrozu ve/veya apoptozu sonrası iltihaplanma ve fibrozis gelişimi meydana gelir (Della Latta et al., 2015; Moore et al., 2013).

Klinik öncesi çalışmalar açısından klinik olarak İAF'ye en yakın modelin yaşlı fareler olduğu belirtilmiştir ve bugüne kadar model olarak kolay kontrol edilebilir olması sebebiyle özellikle fareler olmak üzere sıklıkla kemirgenler kullanılmıştır. BLM'ye karşı gerçekleşen yanıt farenin türüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Balb/c ırkı fareler belomisine karşı direçli iken C57BL/6 ırkı fareler BLM'ye daha fazla duyarlılık gösterir. Bu sebeple akciğer fibrozisi modelinde genellikle C57BL/6 ırkı fareler kullanılmaktadır (Moore et al., 2013; Tashiro et al., 2017).

Bu tez çalışmasında C57BL/6 ırkı farelerde İAF BLM'nin ile indüklenmiştir. Oluşturulan İAF hastalık modelinde, telomeraz aktivatörü ve antioksidan özelliği olduğu bilinen sikloastragenol molekülünün fibrozis oluşumuna etkisi incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler, İAF'in oksidatif stres ve telomeraz aktivitesiyle ilişkisi ve hastalığın oluşum sebeplerinin aydınlatılması açısından yol gösterici olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Solunum Sisteminin Embriyolojisi

Zigot uterus tüpünden uterusu doğru ilerlerken ‘yarıklanma (cleavage)’ adı verilen bir seri mitoz bölünme geçirir. Zona pellucida ile çevrili olan bu embriyonda total hacim sabit kalacak şekilde bölünme gerçekleştiği için oluşan hücrelerin boyutu giderek küçülmektedir ve bu hücrelere blastomer adı verilmektedir. Yaklaşık 16 blastomeri içeren dut görünümlü yapıya morula adı verilmektedir. Morula uterusu girdikten sonra (fertilizasyondan 4 gün sonra) gerçekleşen blastogenez evresinde ise morulanın merkezi yerleşimli iç hücre kümesinin (embriyoblast) en dışındaki hücre tabakasından (trofoblast) ayrılması için kompaksiyon olayı gerçekleşir. Embriyoblastlar, içi sıvı dolu blastosist boşluğunu (blastosöl) oluşturacak şekilde iyice kompakt hale gelerek bir tarafta toplanmaktadır. Bu evrede zona pellucida parçalanıp yok olmaya başlar. Uterus boşluğundaki sıvı parçalanmaya başlayan zona pellucidadan geçerek bu boşluğun içine dolar. Oluşan bu yapıya blastosist adı verilmektedir. Zona pellucidanın parçalanması blastosistin büyümesine ve endometriyuma implantasyonuna imkân verir. Yaklaşık birinci haftanın sonunda blastosist iç hücre kümesinin olduğu taraftan endometriyum epiteline tutunur. Bu tutunmadan sonra trofoblastlar hızla çoğalıp iki tabakaya farklılaşmaya başlar. İç tabakada tek çekirdekli sitotrofoblastlar bulunur. Dış katmanda ise çok çekirdekli sinsityotrofoblastlar oluşur. Sinsityotrofoblastlar parmak şeklinde uzantılar oluşturup endometriyum epitelinden geçerek salgıladığı proteolitik enzimler ile blastosiste yer açıp implantasyonu gerçekleştirir. Embriyoblastlar da iki katmana farklılaşır. Blastosöle komşu olan tabaka hipoblast; oluşacak amniyotik boşluğa komşu olan tabaka ise epiblast olarak adlandırılır. Bu iki tabakaya ise ‘bilaminar germ disk’ adı verilir. Epiblast içerisinde de bir boşluk oluşmaya başlar. Bu amniyotik boşluğu oluşturur. Sitotrofoblastlara komşu olan epiblastlar amnioblastları oluşturur ve diğer epiblastlarla birlikte amniyotik boşluğun çevresinde uzanırlar. Hipoblasttan kaynaklanan hücreler ince bir membran oluşturup sitotrofoblastların yüzeyini örterek ekzosölomik boşluğu oluştururlar. Böylece primer vitellus kesesi meydana gelir. Bu durumda embriyonik disk; amniyotik boşluk ve vitellus kesesi arasında uzanır (Moore et al., 2016; Sadler, 2019; Sırmalı, 2015).

Vitellus kesesi endodermindeki hücrelerden türevlenen, sitotrofoblastların iç yüzeyi ile ekzosöloomik boşluğun (vitellus kesesi) ise dış yüzeyi arasında yeni bir hücre popülasyonu oluşur. Ekstraembriyonik mezoderm adı verilen bu gevşek bağ dokusu amniyon ve vitellus kesesini sarar. Amniyonu ve trofoblastı çevreleyene ekstraembriyonik somatik mezoderm; vitellus kesesini sarana ise ekstraembriyonik splanknik mezoderm adı verilir. Ekstraembriyonik mezoderm içinde zamanla koryonik boşluk ya da ekstraembriyonik boşluk (söloom) olarak bilinen büyük boşluklar oluşur. Ekstraembriyonik mezoderm ve trofoblast tabakaları 'koryon'u oluşturur. Yaklaşık 13. günde hipoblasttan (ekstraembriyonik endodermal hücrelerden) çoğalan hücreler ekzosöloomik boşluğun (primer vitellus kesesi) içine doğru göç ederek yeni bir boşluk oluşturur ve buna kalıcı sekonder vitellus kesesi adı verilir. Bu, primer vitellus kesesinden çok daha küçüktür. Primer vitellus kesesinin büyük bir bölümü boğumlanır ve ekzosöloomik kist adını alır (Moore et al., 2016; Sadler, 2019).

Gelişimin üçüncü haftasının başlangıcında 'gastrulasyon' yani üç tabakalı germ diski oluşumu meydana gelir. Epiblast tabakasının yüzeyinin orta bölümünde -median düzleminde- primitif çizgi (dar bir oluk) oluşumu ile başlar. Bu, epiblast hücrelerinin çoğalıp aşağı doğru göç etmesi ile oluşur ve buna invajinasyon adı verilir. Kaudal uca hücrelerin eklenmesi ile primitif oluğun boyu uzar ve kraniyal ucunda da pirimitif çukur oluşur. Böylece primitif çizgi ortaya çıkar çıkmaz, embriyonun kraniyokaudal eksenini, dorsal-ventral yüzeylerini, sağ ve sol tarafını tanımlamak mümkün hale gelir. Göç eden bu hücreler epiblast ve hipoblast tabakaları arasındaki intraembriyonik mezoderm tabakasını oluşturur. Primitif çizgiden göç eden hücrelerin bazıları ise hipoblast tabakasındaki hücrelerin arasına girerek embriyonik endoderm tabakasını oluşturur. Epiblast tabakasındaki kalan hücreler ise embriyonik ektoderm tabakasını oluşturur. Dolayısıyla embriyonun -tüm doku ve organların primordiyumu olan- endoderm, ektoderm ve mezoderm adı verilen üç germ tabakası epiblasttan köken alır. Dördüncü haftadan sonra primitif çizgi ortadan kalkar (Eroğlu, 2010; Moore et al., 2016; Sadler, 2019; Sırmalı, 2015).

Nörulasyon evresinde primitif çukurdan kraniyal yönde göç eden kimi mezenkimal hücreler notokord adı verilen orta hatta bir kordon oluşturur ve hemen sonra bu kordonun ortasında lümen oluşur. Notokordal uzantı endoderm ve ektoderm arasında prekordal plak'a kadar uzar. Eksenel iskelet olarak görev alır. Prekordal mezoderm ve notokord, üzerindeki ektoderminden nöral plak oluşumunu indüklerler. Nöral plağın (nöroektoderm) yükselerek katlanması sonucunda nöral tüp meydana gelir. Nöral tüp yüzey ektoderminden ayrıldıktan sonra kalan ektoderm serbest kenarları birleşir ve sonrasında epidermise farklılaşırlar. Nöral tüp ise beyin ve omuriliği oluşturur. Nöral tüpün yüzey ektoderminden ayrıldığı tepe kısmından epitel ve komşu hücrelerle bağlantısını kaybetmiş nöral krest hücreleri açığa çıkar ve nöral tüpün her iki yanına göç ederler. Nörulasyon, nöral tüpün baş ve kuyruk bölgesindeki nöroporların kapanması ile sonlanır (Bobrysheva and Kachshenko, 2011; Eroğlu, 2010; Moore et al., 2016; Sadler, 2019; Sırmalı, 2015).

Notokord ve nöral tüpün oluşmasıyla bunların her iki yanında bulunan intraembriyonik mezoderm, paraksiyal mezoderm adını alır. Bu mezoderm uzun ve kalın bir kolon oluşturacak şekilde çoğalır. Nöral tüpün her iki yanında bulunan bu kolonların yanında intermedier mezoderm yer alır. İntermedier mezoderm giderek incelerek lateral mezodermi oluşturur. Lateral mezoderm ise vitellus kesesi ve amniyonu çevreleyen ekstraembriyonik mezoderm ile devam eder. Üçüncü haftanın sonuna doğru paraksiyal mezoderm farklılaşarak somit denilen çiftler halinde yapıları oluşturur. Somitler aksiyal iskeletin büyük bir bölümünü ve bunlara bağlı kasları ayrıca komşu derinin dermisini oluşturmaktadır. İntermedier mezoderm üriner ve genital sistem yapısına katılır, lateral mezoderm ise ekstremite ve vücut kasları olarak adlandırılır (Moore et al., 2016; Sırmalı, 2015).

Nöral tüp oluşumunun gerçekleştiği nörulasyon evresi ile neredeyse aynı zamanda, ventral katman olan endoderm de katlanarak silindirik yapıdaki ön bağırsağı (ilk sindirim kanalını) oluşturur. Orta tabakada bulunan mezoderm bu iki tüpü bir arada tutar (Sadler, 2019).

Nöral tüpün gelişimi esnasında embriyonik disk de lateral ve kranioyokaudal yönde kıvrılarak silindirik form alır ve kıvrılarak embriyo şeklini kazanır. Embriyo boyuna kıvrılırken vitellus kesesinin endoderminin bir kısmı ön bağırsak olarak embriyonun içinde kalır (Eroğlu, 2010; Sırmalı, 2015).

İnsan embriyosunda solunum taslağı ilk kez dördüncü haftada, ilkel farinksin ventral duvarının kaudal ucunda laringotrakeal bir yarık olarak görülür. Dördüncü haftanın sonuna doğru laringotrakeal yarık ön barsağın ventral duvarından bir çıkıntı şeklinde solunum divertikülünü oluşturur. Solunum divertikülü öne ve aşağıya doğru uzarken splanknik mezoderme çevrilir. Uzayan divertikülün distal ucu genişleyip yuvarlaklaşarak akciğer tomurcuğunu oluşturur. Solunum divertikülü kısa süre içerisinde ilkel farinksten ayrılır. Longitudinal olarak trakeoözofageal katlantılar gelişir, trakeoözofageal septum denilen bir bölmeyi oluşturmak için birbirlerine yaklaşırlar. Bu septumun oluşmasıyla ön bağırsak ventral ve dorsal parçalara ayrılır. Ön bağırsak ile solunum divertikülünün çevresindeki mezenşim bu iki yapıyı birbirinden ayırmak için her iki yandan içeriye doğru kalınlaşarak girinti yapar ve karşılıklı gelen uçların birleşmesiyle solunum divertikülünü ön barsaktan ayırır, ancak laringotrakeal tüpün farinkse açılan deliği larinks girişini oluşturur ve ilkel farinkse bağlı kalır. Dorsal parçadan ise özofagus primordiyumu oluşur, ventraldeki solunum divertikülünden oluşan laringotrakeal tüp ise kaudal yönde uzamaya devam eder. Trakeanın epitel ve bezleri laringotrakeal tüpün endoderminden; kıkırdak, kas, bağ dokusu, damarlar da splanknik mezodermden gelişir. Distalde orta çizgi üzerinde trakea iki dala ayrılır ve bronşiyal tomurcuklar meydana gelir. Bronşiyal tomurcuklar genişleyerek sağ ve sol primer (ana) bronşları oluştururlar. Bunların da dallanmasıyla insanda sağ ana bronştan üç, sol ana bronştan da iki adet sekonder bronş oluşur. Her bir sekonder bronş tekrar progresif dallanmaya gider. Her bir dal tekrarlayan dallanmalara uğrar. Bu dallanmalar ile birlikte etrafındaki mezenşimal doku da bölünür. Bronşlar gelişirken kıkırdak tabaka da etrafını saran mezenşimden gelişir. Bu splanknik mezenşim bronşiyal düz kas, pulmoner bağ dokusu ile kapillerin gelişmesini de sağlar. Akciğerlerin parankimi gelişirken aynı zamanda akciğerler splanknik mezodermden köken alan visseral (splanknik) plevra tabakası ile dıştan sarılır. Visseral plevra tabakası dışında torasik vücut duvarının iç yüzünü döşeyen somatik mezoderm tabakasından da pariyetal (somatik) plevra tabakası

oluşur. Gelişen akciğerler büyürken bilateral plevral boşlukları doldurmaya başlar. Akciğerlerin olgunlaşması 4 evrede incelenir (Bobrysheva and Kachshenko, 2011; Carlson, 2014; Eroğlu, 2010; Moore et al., 2016):

1) Psödoglandüler Evre (5-17. hafta): Gaz değişimi ile ilgili solunum bileşenleri hariç, akciğerin hava iletici sistemi gelişir. Bronkopulmoner segmentlerdeki kanal sistemlerinin majör oluşumu ve büyümesi dönemidir. Solunum kısmı henüz gelişmediği için bu dönemde doğan fetüs ve embriyolar yaşayamamaktadır. Bu evrede belirleyici olarak akciğerlerin histolojik yapısı bezi andırmaktadır. Epitel hücreleri endodermden, bağ dokusu ve kas tabakası mezenşimden gelişmeye devam eder. Ana bronşlarda, segmental bronşlarda kıkırdak gelişir. 13. haftadan itibaren bronşların duvarında bezler (gland) görülür. Trakeada 14. haftada mukus mevcuttur (Carlson, 2014; Eroğlu, 2010; Moore et al., 2016).

2) Kanaliküler Evre (16-25. hafta): Akciğerlerin gelişmesinde en önemli evredir. Bu evrede akciğer morfolojisi çok hızlı gelişir. Terminal bronşiyollerin lümenleri genişler ve akciğer dokusu çok daha vasküler hale gelir. Her bir terminal bronşiyol iki veya daha fazla respiratuar bronşiyol verir. Bunlardan her biri daha sonra 3-6 alveoler kanala ayrılır (Carlson, 2014; Eroğlu, 2010; Moore et al., 2016).

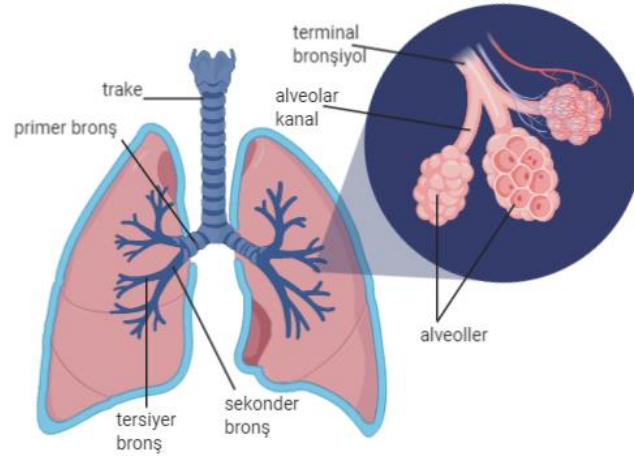
3) Terminal Kese Evresi (24. hafta-geç fetal dönem): Terminal kese evresinde oluşan terminal hava keseleri (ilkel alveol), kanaliküler evre sırasında büyük ölçüde oluşan respiratuar bronşiyollerden tomurcuklanır. İlkel alveolde ilk olarak küboidal tip 2 alveolar epitel hücrelerinin (tip 2 AEC) olduğu gösterilmiştir. Proliferasyondan sonra, bazı tip 2 AEC'ler düzleşip, karakteristik salgı fonksiyonlarını kaybederek tip 1 alveolar epitel hücrelere (tip 1 AEC) farklılaşırlar. Diğer tip 1 AEC'ler, epitelyal prekürsör hücre havuzundan doğrudan farklılaşabilir. Terminal keseler, esas olarak, gaz değişiminin meydana geldiği endodermal kökenli, yassı tip 1 AEC'ler ile kaplıdır. Küboidal tip 2 AEC'ler ise yassı epitel hücreleri arasında dağılmış halde bulunur. Bu hücreler yüzey gerilimini azaltmak ve alveollerin solunum sırasında genişlemesini kolaylaştırmak için alveollerin yüzeyine yayılan pulmoner sürfaktan salgılar. Bu aşamada gerçekleşen diğer önemli olay ise kan damarlarının artışı ve bu kılcal damarların solunum bronşiyollerinin duvarlarıyla yakın teması sonucu hava-kan bariyeri oluşumudur. Keseler arasında interstisyum dokusu ve fibroblastlar gelişir. Kapiller ağ, gelişen alveoller etrafındaki

mezenşim içerisinde hızla çoğalarak interstisyum içinde yayılır (Carlson, 2014; Eroğlu, 2010; Moore et al., 2016).

4) Alveolar Evre (Geç fetal dönem-postnatal dönem): Doğuma yakın prenatal hayatta başlayan akciğerin gelişme evresi, postnatal hayatın en az iki yılı boyunca devam eder. Alveolar kanal ve keselerin, interstisyumun, gaz değişim bölgesinin ve vasküler ağın gelişimi devam eder. Alveolleri kaplayan epitel, gaz değişiminin kolaylaşması için aşırı ince hale gelerek karakteristik pulmoner alveolü oluşur. Alveolar-kapiller membran hayat boyu gelişmeye devam eder. 3-8 yıllık zaman diliminde oluşan olgun insan akciğerinde bulunan yaklaşık 300 milyon alveolün yaklaşık % 90'ı veya daha fazlası doğumdan sonra oluşur. Alveollerin sayısını artıran ana mekanizma, mevcut primordial alveolleri alt gruplara ayıran ikincil bağ dokusu septasının oluşumudur. Başlangıçta, septa nispeten kalındır, ancak sonrasında gaz alışverişi yapabilen olgun ince septaya dönüştürülürler. Akciğer hacmi, Tip 2 AEC yapımı ve sürfaktan sentezi artar (Carlson, 2014; Eroğlu, 2010; Moore et al., 2016).

2.2. Solunum Sisteminin Histolojisi

Solunum sisteminin iletim bölümünün büyük kısmını oluşturan trakea, dallanarak sağ ve sol olmak üzere iki primer bronşa ayrılır. Akciğer parankimasına giren sekonder bronşlar (intrapulmoner sekonder bronşlar) akciğerleri loblara ayırır; insanda bu bronşlar ile sol akciğer iki loba sağ akciğer ise üç loba ayrılırken (Khan and Lynch, 2019; Kierszenbaum, 2006); kemirgenlerde ise sağ akciğer kraniyal, orta, kaudal ve aksesuar olmak üzere dört loba ayrılmıştır; sol akciğer ise tek lobludur (Meyerholz et al., 2018). Sekonder bronşlardan sonraki bölünmelerin akciğer loblarında oluşturduğu bölmelere bronkopulmoner segment adı verilir. Bu segmenti oluşturan bronşlar ise segmental tersiyer bronşlardır. Devam eden bronşiyal dallanmalar bu anatomik birimlerin alt segmentlerini oluşturur. Terminal bronşiyol ve sonraki bölümler 'pulmoner lopçuk' olarak adlandırılır. Pulmoner lopçuğun alt birimi üzüm salkımı görünümünden dolayı 'pulmoner asinus' olarak adlandırılmıştır. Akciğerin solunum işlevinin başlangıcı olan pulmoner asinus; terminal bronşiyollerden dallanan respiratuvar bronşiyoller ve onların desteklemiş olduğu alveolar keseler ve alveollerden oluşmaktadır (Khan and Lynch, 2019; Kierszenbaum, 2006).



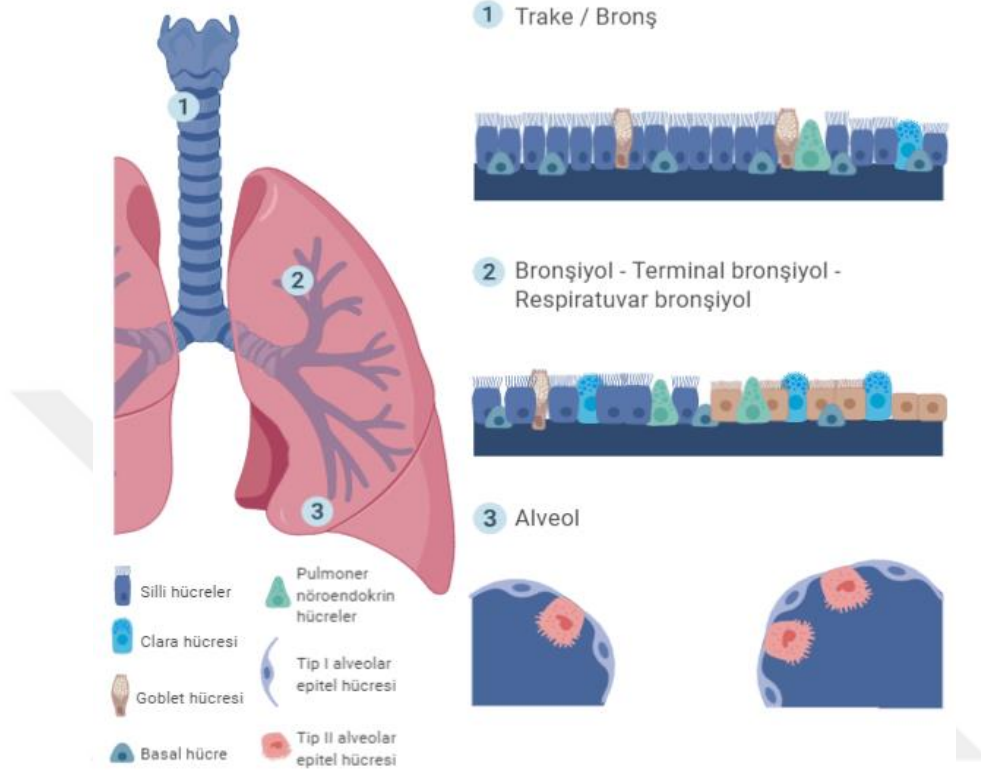
Şekil 2.1 Solunum ağacının şematik gösterimi (Resim biorender.com ile oluşturuldu.)

Solunum sisteminde dört ana histolojik katman vardır: epitel ve destekleyici lamina propriayı içeren solunum mukozası, submukoza, kıkırdak ve/veya kas katmanı ve adventisya. Trake ve ana bronşların bazal membranları üzerinde bulunan, bariyer görevi gören epiteller yalancı çok katlı silindirik yapıdadır. Epitel popülasyonunun baskın hücreleri olan silli prizmatik hücreler dışında; sili olmayan mukus salgılayan goblet hücreleri ve lümene uzanmayan bazal hücreler olmak üzere çeşitli hücre tipleri bulunmaktadır. Lamina propriada düz kas, submukozada serömukoz bezler bulunur. Trakede, havanın geçişini kolaylaştıran, C şeklinde hiyalin kıkırdak halkaları bulunurken bronşlarda düzensiz şekilli kıkırdak plaklar bulunmaktadır. Küçük bronşlarda ise bu kıkırdak plaklar küçülmektedir (Kia'i and Bajaj, 2019; Kierszenbaum, 2006). Trakeye benzer yapıdaki primer bronşlar uçlara doğru epitel boyunda azalma ile birlikte kademeli olarak basitleşmektedir (İşisağ Üçüncü et al., 2009).

Bronşiyoller ise kıkırdak plak ve serömukoz bez bulundurmaz. Goblet hücre sayısı az bulunur. Silindirik örtü epiteller terminal bronşiyollerde silli kübik epitel şeklini almakta, yüksekliği azalmaktadır. Bu kısımda silsiz Clara hücreleri yer almaktadır. Bu hücreler surfaktan madde salgılar. Bronşiyolün lamina propriasında düz kaslar ve elastik lifler bulunur (İşisağ Üçüncü et al., 2009; Kia'i and Bajaj, 2019; Kierszenbaum, 2006).

Terminal bronşiyoller respiratuvar bronşiyollere dallanır. Bu dallanma ile birlikte akciğerde iletim bölümünden gaz değişiminin gerçekleştiği solunum kısmına geçiş gerçekleşir (İşisağ Üçüncü et al., 2009; Kierszenbaum, 2006). Respiratuvar

bronşiyollerde birkaç silli ve silsiz kübik epitel ile pulsu yapıda tip 1 AEC yer almaktadır. Goblet hücreleri, kıkırdak ve bezler bulunmaz (Kierszenbaum, 2006).



Şekil 2.2 Solunum sistemi epitel katmanlarının şematik gösterimi (Resim biorender.com ile oluşturuldu).

Respiratuvar bronşiyollerin dallanması ile alveolar kanallar oluşmaktadır. Düz kas yumruları respiratuvar bronşiyolün ve alveolar kanallarının lümenine doğru şişkinlik yapmaktadır. Tip 1 AEC ile sarılı bu kas demetlerinin etrafında alveolar kapillerler bulunur. Distal uçta bu düz kas demetleri yoktur yalnızca epitel bulunur (Kierszenbaum, 2006).

Alveolar kanallar dallanarak alveolar keselere açılır. Alveolar kanal ile alveolar kesenin birleştiği yere atrium adı verilir. Alveolar keseye birçok alveol açılır (İşisağ Üçüncü et al., 2009; Kierszenbaum, 2006).

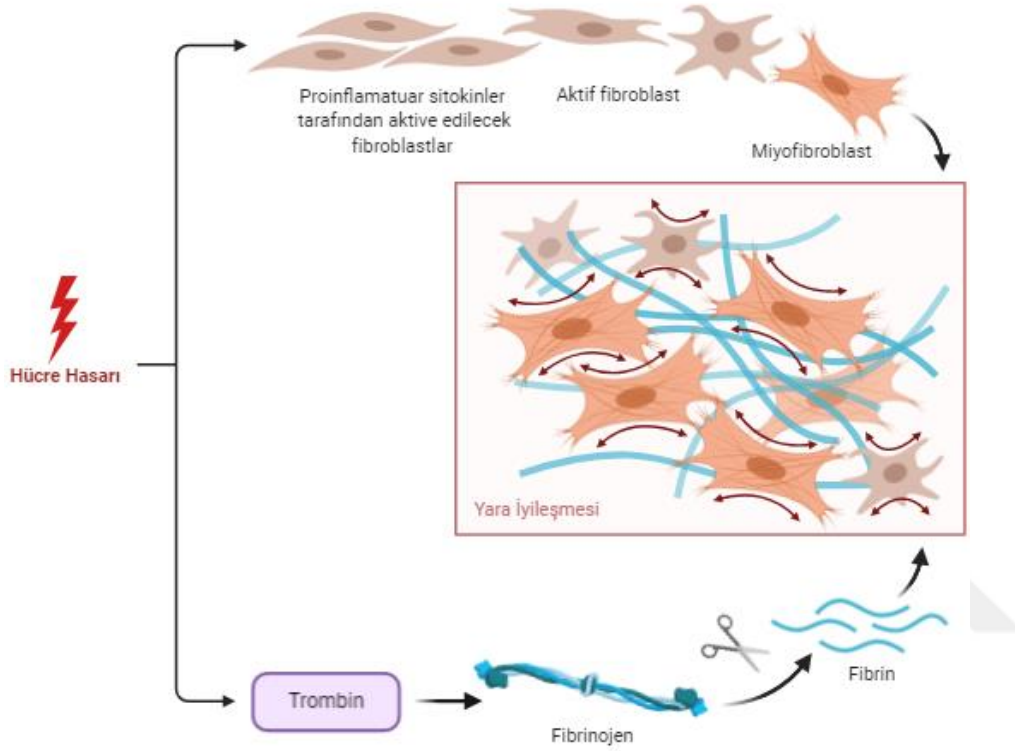
Alveollerin çapı yaklaşık 0.2 mm'dir (İşisağ Üçüncü et al., 2009). Alveoller akciğer asinusun işlevsel birimidir. Gaz alışverişi için 75 m²'lik yüzey alanı sağlar. Alveoller iki tip epitel hücresi içerir; yassı tip 1 AEC ve poligonal şekilli tip 2 AEC'ler. Alveol yüzeyinin yaklaşık %90-95'ini kaplayan tip 1 AEC'ler toplam epitel hücrelerinin %40'ını oluştururken; tip 2 AEC'ler yüzeyin geri kalan %5-10'luk kısmını kaplar ancak sayıca tip 1 AEC'lerden fazla olup yaklaşık %60 oranında bulunmaktadır. Tip 1 AEC'lerin temel fonksiyonları gaz değişimidir. Tip 2 AEC'ler ise surfaktan salgılar. Bu surfaktan sayesinde hava ile sıvı arasındaki sınırdaki yüzey gerilimi azaltılır. Böylece soluk verme sırasında alveolün sönmesi engellenir. Tip 2 AEC'lerin bir diğer önemli işlevi ise progenitör hücreler olarak bir hasar durumunda sayıca artıp, tip 1 AEC'lere farklılaşarak epitel bütünlüğün korunmasıdır (Chuquimia et al., 2013; Kia'i and Bajaj, 2019; Kierszenbaum, 2006).

Alveolleri çevreleyip birbirinden ayıran, kapillerlerin de bulunduğu bağ dokusuna 'alveolar septum (alveolar duvar)' adı verilir. Komşu iki alveol arasındaki ortak duvar olan bu bölge kan- hava bariyerini oluşturur. Alveolar septum başlıca; AEC'leri, kapillerlerin endotel hücrelerini ve interstisyumu kapsar. AEC'lerin ve endotel hücrelerinin bazal membranları alveolar septumun minimal bileşenidir. Bu hücrelerin bazal laminaları yer yer kaynaşmaktadır. Gaz değişiminin kolay olması açısından bu arayüzün ince yapıda olması önemlidir. Alveolar septumun kalın kısımlarındaki interstisyumda -bazal membranlara ilaveten- iki bazal lamina arasında bağ doku hücreleri (interstisyel fibroblastlar veya septal hücreler) ve ağısı yapıda fibrilleri (kolajen ve elastik lifler) yer almaktadır (İşisağ Üçüncü et al., 2009; Kierszenbaum, 2006; Mercer et al., 1994; Uyanıkgil et al., 2018).

2.3. Normal Yara İyileşmesi ve Fibrozis

Doku hasarı; enfeksiyonlar, otoimmün reaksiyonlar ve mekanik yaralanmalar dâhil olmak üzere çeşitli akut veya kronik uyarılardan kaynaklanabilir. Hasar görmüş dokuların onarımı, inflamatuvar bir cevap sırasında ölü veya hasarlı hücrelerin düzenli bir şekilde uzaklaştırıldığı ve rejenerasyona olanak sağlayan temel ve hayati bir biyolojik süreçtir (Wynn, 2004).

Tüm organ sistemlerinde normal yara-iyileşme prosesi; homeostazi, inflamasyon, proliferasyon ve dokunun yeniden şekillenmesi fazlarını kapsar. Bu fazlar ve biyofizyolojik işlevleri; doğru sırada, belirli bir zamanda gerçekleşmeli ve optimum yoğunlukta belirli bir süre devam etmelidir (Guo and Dipietro, 2010).



Şekil 2.3 Yara iyileşmesi sırasında oluşturulan geçici matris (Resim biorender.com ile oluşturuldu).

Doku hasarı sırasında damarlarda oluşan tahribat sonrası kısa süre içerisinde trombositler damar endotelleri altındaki kollajen fibrillerine temas ederek aktive olurlar. Kollajene adezyonu ile aktive olan trombositler mikrofibrillerinin kasılması sonucu şekil değiştirir. Böylece trombosit tıkaçı daha sağlam hale gelir ve trombositin, içerisindeki granülleri salgılaması kolaylaşır. Salgılanan bu maddeler fibrinojen, fibronektin, serotonin, PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktörü) ve trombosit agregasyonunu başlatan maddeler gibi çeşitli maddelerden oluşur. Salınan maddelerin etkisi ile gerçekleşen kan damarlarının büzülmesi, trombosit agregasyonu ve sonrasında koagülasyon kaskadı sonucu pıhtı oluşumu ile hasarlanan bölgeden kan kaybı engellenir. Fibrinojenin trombin enzimi ile fibrine dönüşmesi sonucu pıhtı oluşumu tamamlanır.

(Atamer, 2020). Böylelikle doku hasarından hemen sonra epitel/endotel hücrelerden salınan inflammatuar mediatörlerin de desteklediği vasküler daralma ile ve infiltrasyon hücreleri için geçici bir doku iskelesi haline gelen fibrin matriksin (Şekil 2.3) oluşumu ile homeostazi sağlanır (Guo and Dipietro, 2010; Gurtner et al., 2008; Wynn, 2004). Kanama kontrol edildikten sonra pıhtı ve etrafındaki yara dokusu tarafından salınan TGF- β , PDGF, FGF ve EGF gibi proinflammatuar sitokinlerin etkisiyle inflammatuar hücreler hasarlı bölgeye kemotaksis ile göç eder (Guo and Dipietro, 2010). Bu hücrelerden ilk olarak nötrofiller yara bölgesinde toplanır. 2-3 gün sonra, yarada monositler görünür ve makrofajlara farklılaşır. Aktive olmuş nötrofil ve makrofajlar yara bölgesindeki ölü hücre ve debris ortadan kaldırırlar. (Gurtner et al., 2008; Wynn, 2004). Nötrofil ve makrofaj sonrasında lenfositlerin de sızmasıyla karakterize inflammatuar faz desteklenir (Guo and Dipietro, 2010). Sonuç olarak homeostazi fazı ile kan ve sıvı kayıpları önlendikten sonra inflammatuar yolakların ve bağışıklık sisteminin bileşenlerinin devreye girmesiyle ölü doku ve debris uzaklaştırılır, enfeksiyonlar önlenir (Gurtner et al., 2008).

İnflammatuar faz sırasında ve sonrasında gerçekleşen proliferatif fazda, bazal katmana doğru yara bölgesinde oluşturulan geçici matris üzerinde epitel proliferasyonu ve göçü (reepitelizasyon) ile birlikte pıhtının granülasyon dokusu ile değiştirilme süreci meydana gelir (Alhajj et al., 2020; Guo and Dipietro, 2010). Granülasyon dokusunun oluşumu fibroblastların, epitel ve endotel hücrelerinin proliferasyonu, anijogenez, kolajen ve diğer matriks bileşenlerinin birikmesi ve enflammatuar hücre infiltrasyonunun varlığı ile karakterize edilen karmaşık bir prosestir. Böylece hasarlı dokunun yerinde granülasyon dokusu oluşmaya başlar ve yaranın tabanından büyüüp herhangi bir boyuttaki yarayı doldurabilir. Sitokinler ve büyüme faktörleri, interlökinler ve anjiyogenez faktörleri bu süre zarfında aktiftir. Granülasyon dokusu kılcal damarlarca zengindir. Fibroblastların işlevi kollajen ve ECM'nin sentezlenmesidir. Erken evrede ECM, hızlı bir şekilde üretilen ve kollajenin zayıf bir formu olan tip III kollajenden oluşur (Alhajj et al., 2020). Yaranın kenarından veya kemik iliğinden gelen fibroblastlar, makrofajlar tarafından uyarılır ve bazıları miyofibroblastlara farklılaşır. Miyofibroblastlar zamanla bir yaranın kenarlarını bir araya getiren kasılma hücreleridir. Bu hücrelerin kasılması ile yaranın büzülerek küçülmesi ve doku bütünlüğü sağlanır (Gurtner et al., 2008). Miyofibroblastlar aynı zamanda fibroblastlar gibi kollajen sentezlerler (Klinberg et al., 2013). Ayrıca, yaranın

merkezinine doğru göç ettikçe yeni ECM ve kan damarları oluşturan epitel ve endotel hücreleri için mitojenik ve kemotaktik faktörler salgırlar (Duffield et al., 2013). Dolayısıyla proliferasyon evresinde yeni oluşan granülasyon dokusu ile eş zamanlı olarak granülasyon dokusu üzerinden reepitelizasyon başlar (Alhajj et al., 2020). Epitel hücreleri aynı zamanda zengin bir yenilenebilir fibroblast kaynağı sağlayan epitel-mezenkimal geçişe uğrayabilir (Wynn, 2004).

Başarılı bir proliferasyon ve ECM sentezinin ardından yara iyileşmesi yıllarca sürebilen yeniden şekillenme aşamasına girer. Endotel hücrelerinin, makrofajların ve miyofibroblastların çoğu, birkaç hücre içeren ve çoğunlukla kollajen ve diğer ECM proteinlerinden oluşan bir kütle bırakarak apoptoz geçirir veya yara bölgesinden ayrılırlar. Bu aşamada yeni oluşan kılcal damarların çoğu yok olur, böylece yara bölgesinde damar yoğunluğu normale döner. Ek olarak, 6-12 ay gibi bir süre boyunca, çoğunlukla tip III kolajenden oluşan matris, ağırlıklı olarak daha sıkı yapıda olan tip I kollajenden oluşacak şekilde yeniden şekillendirilir böylece onarılan doku güçlendirilir. Matrisin yıkımı fibroblastlar, makrofajlar ve endotel hücreleri tarafından salgılanan matris metalloproteinazlar tarafından gerçekleştirilir (Gurtner et al., 2008). Yeniden şekillenme evresinde kritik olan durum, normal dokuya yakın bir yapıda ECM oluşumunun sağlanması ve epitel bariyer bütünlüğünün sağlanmasıdır (Guo and Dipietro, 2010).

Normal parankimal dokunun yerini bağ dokunun almış olduğu duruma fibrozis denir. Fibrozis, genellikle bir tür tekrarlanan yaralanmaya yanıt olarak ve normal yara iyileşmesinin düzensiz hale geldiği durumlarda ortaya çıkar. Farklı etiyolojik ve klinik özelliklere sahip olmasına rağmen, çoğu kronik fibrotik bozukluğun ortak noktası, ECM bileşenlerinin aşırı birikmesini (skar dokusu oluşumunu) uyaran büyüme faktörlerinin, proteolitik enzimlerin, anjiyojenik faktörlerin ve fibrojenik sitokinlerin üretimini sürdüren hasar oluşumudur (Duffield et al., 2013). Çoğu durumda zararlı bir maddenin neden olduğu hasarı yavaşlatmak veya sonlandırmak için gerekli olmaktadır. Ancak fibrozis başlangıçta faydalı olmasına rağmen, kronik inflamasyon ve kontrolsüz/anormal onarım sonucu ECM bileşenlerinin aşırı birikimi ile kalıcı skar dokusu oluşumuna yol aarak patojenik hale gelebilir. Dolayısıyla fibrozis; myofibroblastlar ve fibroblastlar

tarafından sağlanan yeni kolajenin sentezi bozunma hızını aştığında, toplam kollajen miktarının zamanla artması sebebiyle meydana gelir (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014; Wynn, 2004, 2009).

Diyabet, hipertansiyon, viral ve viral olmayan hepatit, kalp yetmezliği ve kardiyomiyopati, İAF, skleroderma ve kanser dahil olmak üzere çok çeşitli yaygın kronik hastalıklar fibrozise yol açabilir. Bu ve diğer hastalıklardan kaynaklanan fibroziste, aşırı biriken ECM parankimal dokuyu değiştirip bozduğu için akciğer, karaciğer, böbrek, kalp veya diğer hayati organlarda doku yapısının bozulmasına ve organ fonksiyon kaybına yol açabilmektedir (Adler et al., 2020; Jun and Lau, 2018). Sonuç olarak, şiddetli fibrozisin gelişmiş dünyadaki tüm ölümlerin %45'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Fibrozis için mevcut tedaviler azdır ve etkinlikleri sınırlıdır. Bu nedenle, fibrozisin nasıl gerileyebileceğini ve potansiyel terapötik yaklaşımları tanımlamak için yeni araştırmalara acil ihtiyaç vardır (Jun and Lau, 2018).

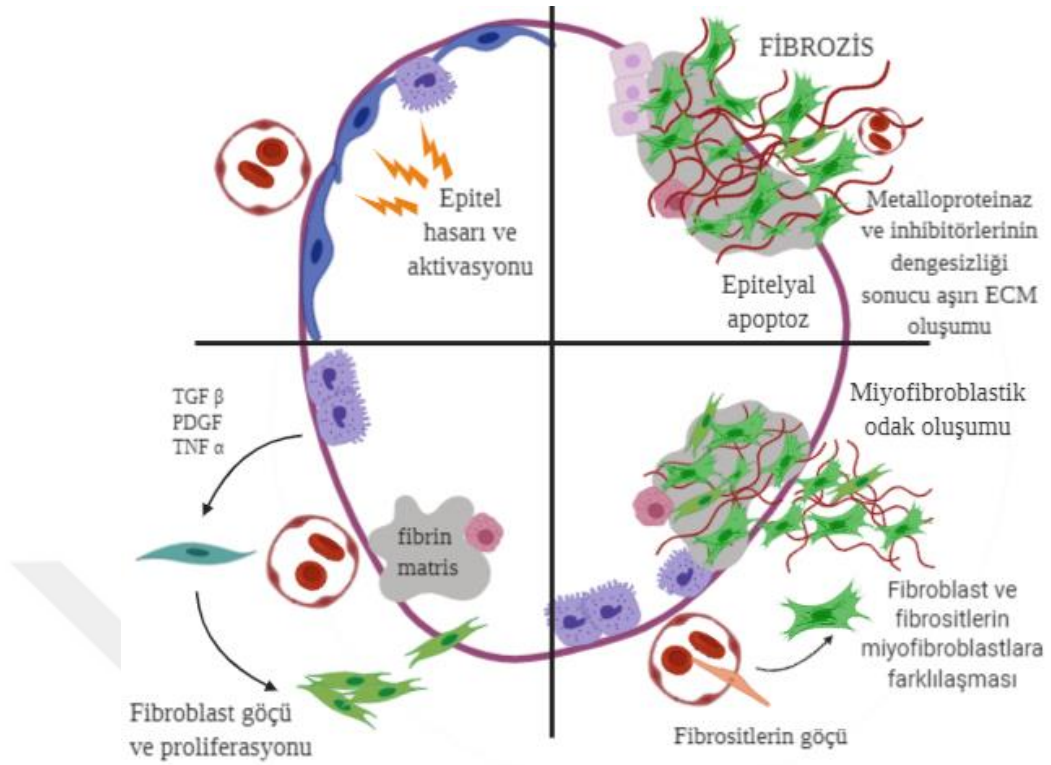
2.4. İAF'nin Patogenezi

İAF, “interstisyel akciğer hastalıkları” olarak bilinen bir akciğer hastalıkları ailesine aittir. Bu geniş diffüz akciğer hastalıkları kategorisinde İAF, idiyopatik interstisyel pnömoni (İİP) olarak bilinen alt gruba aittir. İİP'nin en yaygın görüleni İAF'dir. Usual interstisyel pnömoni (UİP) olarak bilinen patolojik paternle ilişkili olması sebebiyle İAF, İAF/UİP olarak adlandırılabilir (Meltzer and Noble, 2008; Spagnolo et al., 2012).

İAF kötü prognoz ve sınırlı tedavi seçenekleri ile ölümcül, kronik bir interstisyel akciğer hastalığıdır. Bu hastalığın patogenezi belirsiz ve tartışmalıdır (Carrington et al., 2018; Mora et al., 2017). İnterstisyel akciğer hastalıklarının çoğunda inflamasyon önemli bir role sahiptir. Ancak İAF anti-inflamatuvar tedaviye zayıf bir tepki göstermektedir. Daha önce kronik inflamasyonun bir sonucu olarak kabul edilen İAF'nin patogenezi için mevcut hipotez, genetik açıdan duyarlı bireylerde tekrarlanan AEC mikro-yaralanmasına yanıt olarak gelişen anormal yara iyileşmesidir (King Jr et al., 2011; Kolb et al., 2017).

Serbest radikallerin potansiyel olarak hem doğrudan hem de dolaylı mekanizmalar yoluyla İAF patogenezinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. İAF'de, antioksidan mekanizmaların bozulması sebebiyle oluşan oksidatif stresin epitel hasarına ve apoptozuna katkıda bulunduğu da belirtilmiştir. Dolayısıyla bu yeniden tanımlama ile İAF epitel-bağımlı fibroblast aktivasyonu ile gelişen bir hastalık olması ile UIP'den ayrılmaktadır. Bununla birlikte İAF'li hastaların alt gruplarında inflamasyon hastalığının başlamasında ve ilerlemesinde rol alabileceği için epitel-yolak ile birlikte inflamatuvar-yolağın da akciğer fibrozise neden olabileceği belirtilmektedir (King Jr et al., 2011; Kliment and Oury, 2010; Kolb et al., 2017; Maher, 2012).

Normal akciğerde yaralanmadan sonra, koagülasyon kaskadı, fibroblastların göçü ve miyofibroblastlara farklılaşması, yeni damar oluşumu ve epitel rejenerasyonu için bazal membran ağını oluşturmak üzere ECM birikimi gibi birkaç mekanizma gerçekleşir (Keane et al., 2018; Sgalla et al., 2018). Bunun sonunda miyofibroblastlar apoptoza uğrar, ECM rezorpsiyonu olur (Kolb et al., 2017; Sgalla et al., 2018). Alveolar bütünlük ise, yaralanma ile gerçekleşen tip 1 AEC kaybı sonrası gerçekleşen fakültatif progenitörler olan tip 2 AEC'lerin kendini yenilemeleri ve tip 1 AEC'ye farklılaşmaları ile geri kazandırılır. Akciğer homeostazisinde merkezi rolü olan tip 2 AEC'lerin, işlevsizliği sebebiyle, mikro yaralanmalara maruz kalan hasarlı epitel hücrelerini yeniden oluşturup onarımı sağlayamaması İAF patogenezinin kritik anını oluşturmaktadır (Borensztajn et al., 2013; Sgalla et al., 2018). Yaralanma devam ederse/onarım kabiliyeti bozulursa, yara iyileşme süreci, 'kronik eksik rejenerasyona' sebep olan biyokimyasal bir çevre yaratan inflamatuvar bir aşamadan geçecektir. Bu süreçte anormal epitel-mezenkimal iletişimi, profibrotik-antifibrotik mediatörler arasında dengesizliğin oluşması, fibroblast ve miyofibroblastların aşırı aktivitesini destekleyen ortamın korunması durumları gerçekleşir (Sgalla et al., 2018). Fibroblastlar ve miyofibroblastlar apoptoza direnç gösterir ve aktif fibrozis bölgelerinde birikirler (Kolb et al., 2017). Özellikle vasküler endotel ve alveoler epitel arasında fibroblast ve miyofibroblast birikimi olan bölgeler, akciğerin yapısını bozarak "bal peteği" görünümü vermektedir (Wilson and Wynn, 2009).



Şekil 2.4 İAF'de anormal yara iyileşmesi sonucu meydana gelen fibrosis oluşumunun özet halindeki şematik gösterimi (Resim biorender.com ile oluşturuldu).

Sonuç olarak anormal bir yara iyileşme süreci, masif ECM birikimi ve fibroblast hiperplazisi ile akciğer dokusunun skarlaşmasına neden olmaktadır. Gaz değişiminin gerçekleştiği vasküler endotel ile alveoler epitel arasını kapsayan interstisyel bölgede yer alan bu skar oluşumu (Şekil 2.4) sonucunda, solunum fonksiyonu bozulur, akciğer elastikiyeti ve alveolar yüzey alanı kaybedilir (Carrington et al., 2018; Kolb et al., 2017; Moore and Hogaboam, 2008).

Akciğerlerin farklı bölümleri hastalık sürecinin farklı aşamalarına ulaşır, bu da daha az etkilenen ve hatta sağlıklı doku alanlarının yanında fibrosis bölgelerinin meydana geldiği yamalı bir görünüme yol açar (Kolb et al., 2017).

İAF patogenezinde yer alan farklı hücre tipleri ve mediatörler aşağıda incelenmiştir.

2.4.1. Tip 2 AEC: anormal onarım sürecinin başlaması

İAF hastalığının, AEC fonksiyon bozukluğu ve yaralanmalara karşı anormal tepki ile sonuçlanan, AEC'de ifade edilen birkaç geni etkileyen mutasyonlar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Grimminger et al., 2015; Sgalla et al., 2018; Snetselaar et al., 2017; Zhang et al., 2019). İAF ile ilişkilendirilen bu mutasyonlar son zamanlarda telomer uzunluğunun korunmasında rol oynayan TERT, TERC, PARN, RTEL genlerini; sürfaktan proteini C (SPC) ve sürfaktan proteini A2'yi (SPA2) kodlayan genleri kapsamaktadır (Grimminger et al., 2015; Mcdonough et al., 2018; Snetselaar et al., 2017; Zhang et al., 2019).

Progresif telomer kısalması, özellikle İAF'nin patobiyolojisinin temelini oluşturan alveoler epitel hücrelerinin hızlandırılmış hücre döngüsüne, erken hücre yaşlanmasına, rejeneratif kapasitesinde düşüşe neden olarak yara onarım sürecini etkilemektedir (Kong et al., 2013).

Tip 2 AEC'ler tarafından ifade edilen protein yapıdaki önemli surfaktan maddeler olan SPC ve SPA2'de meydana gelen mutasyonlar, endoplazmik retikulumda (ER) biriken ve ER stresine neden olan anormal protein öncülleri ile sonuçlanır (Sgalla et al., 2018; Spagnolo et al., 2015).

ER stresi sonucunda katlanmamış protein yanıtı oluşur bunun sonucunda normallliği sağlamak üzere proteinlerin translasyonu inhibe edilir ve degradasyona hedef haline getirilirler. Katlanmamış protein yanıtının aktivasyonu, hücre davranışları üzerinde çeşitli olumsuz sonuçlara yol açar; AEC'de apoptotik yolların aktivasyonunu; ayrıca, TGF- β 1, PDGF, CXCL12, CCL2 gibi profibrotik mediatörlerin üretimini; EMT aracılığıyla AEC'nin fibrotik fenotip kazanmasını teşvik edebilir. Değişen genetik ekspresyon ile meydana gelen bu anormal protein üretimi hücre çevreye zarar verebilir, hücre davranışı değiştirebilir ve hücre yaşlanmayı hızlandıran etkilere neden olabilir. Sonuçta tip 1 AEC'lerin hasarlanması sonucunda tip 2 AEC'lerin hasara karşı cevap verme yeteneğinde azalma meydana gelir, alveolar epitel bütünlüğün onarımı efektif şekilde sağlanamaz (Sgalla et al., 2018; Spagnolo et al., 2015; Wuyts et al., 2013).

2.4.1.1. TGF- β 1

TGF- β 1 muhtemelen İAF patogenezinde rol oynayan en önemli mediatördür. Tip 2 AEC'ler bu mediatörü, $\alpha\beta$ 6 integrin aktivasyonu yoluyla, katlanmamış protein yanıtı tarafından indüklenen aktin/miyosin aracılı hücre iskeleti kasılmasının bir sonucu olarak üretebilir. $\alpha\beta$ 6 integrin/TGF- β 1 yolağı temel bir biyolojik süreçtir: Moleküller yapısal olarak bağlanır ve bu, sistemin zararlı uyaranları tespit etmek için hazırlandığını düşündürmektedir. TGF- β 1 fibrozisi destekleyen güçlü mediatördür: epitel hücre apoptozunu, EMT, epitel hücre göçünü, diğer profibrotik mediatörlerin üretimini, dolaşımdaki fibrositlerin göçünü; fibroblastların aktivasyonunu, proliferasyonunu ve miyofibroblastlara farklılaşmasını ve böylece aşırı kolajen birikimini; VEGF, CTGF gibi pro-anjiojenik mediatörleri ve diğer birkaç yolağı destekler (Fernandez and Eickelberg, 2012; Sgalla et al., 2018; Wuyts et al., 2013). EMT ve fibrojenizde yer alan, aynı zamanda TGF- β 1 tarafından aktive edilen diğer önemli yolaklar; Wnt- β -katenin sinyalleri, Sonic Hedgehog (Shh), gremlin-1, fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) gibi kısıtlamaları kaldırılmış embriyolojik programların bir grubudur. Bu yolakların kısıtlamalarının kaldırılması hücrelerin apoptoza direnç kazanmasını ve proliferasyonunu sağlar (Sgalla et al., 2018).

Akciğerlerde TGF- β , aktive edilmiş AEC'ler dışında; alveoler makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri, fibroblastlar ve miyofibroblastlar dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tipleri tarafından üretilmektedir (Fernandez and Eickelberg, 2012).

2.4.1.2. EMT

EMT; epitel yaranma, yaşlanma ile ilişkili mekanizmalar ve katlanmamış protein yanıtı tarafından indüklenebilen; profibrotik mediatörler ve yolaklar tarafından geliştirilen, tip 2 AEC'lerin moleküler yeniden programlanması ile mezenkimal fibroblastlara dönüşümüdür. Epitel hücreler, mezenkimal hücre ile ilişkili genleri eksprese eder, bazal membrandan ayrılır, göç eder ve karakteristik belirteçlerini (örneğin E-kaderin) azaltarak düzenler. Bu geçiş hücrelerinin en karakteristik belirteçleri miyofibroblastlara özgü olan α -SMA'dır. Son bulgular tip 2 AEC'lerinin EMT

sonrasında, parakrin sinyalleri yoluyla lokal fibroblastları aktive eden pro-fibrotik ortamı desteklediğini göstermektedir. Sürekli EMT'yi indükleyen sinyaller ECM birikimine sebep olur ancak erişkin patolojik durumlardaki kesin rolü hala belirsizdir (Hill et al., 2019; Salton et al., 2019; Sgalla et al., 2018).

2.4.2. Endotelyum ve koagülasyon kaskadının rolü

Alveoler yapıdaki hasar ve AEC'lerin kaybı, bazal membranın bozulması ile birlikte, alveoler damarlarının geçirgenliğinin artması ile sonuçlanır. Sonuç olarak, yeni damarlar oluşturulmalı ve endotel progenitör hücreleri içeren endotel hücreleri çoğalmalıdır. Ancak İAF hastalarında bu hücrelerin önemli ölçüde azalmış olduğu gösterilmiştir. Bunun önemli bir sonucu olarak yeniden endotelizasyon gerçekleşemeyip, işlevsiz alveol-kapiller bariyeri oluşabilir. Bu ise fibrotik süreci ve damar fonksiyonlarındaki anormallikleri uyaran profibrotik yanıtı indükleyebilir. Ayrıca, endotel hücreleri, EMT'ye maruz kalabilir (Sgalla et al., 2018).

Endotel ve epitel hasarı, yaranın iyileşme sürecinin erken evrelerinde homeostazinin sağlanması için koagülasyon kaskadının aktifleşmesine yol açar. Koagülasyon kaskadının profibrotik etkileri bulunmaktadır. Fibrin ve fibronektinden oluşan geçici matris TGF- β yokluğunda dahi EMT'yi indüklemektedir. Bu geçici matrisin bozunması alveolar fibrinolizin eksik fonksiyonu sebebiyle gerçekleşmemektedir ve fibrotik akciğer yanıtını yönlendirmede önemli bir role sahiptir. Ayrıca koagülasyonu destekleyen ortam fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşmasına neden olur. Dolayısıyla koagülasyonu destekleyen sinyallerin İAF'de aktive edildiği düşünülmektedir (King Jr et al., 2011).

2.4.3. Mezenkimal hücreler ve ECM: Hastalığın ilerlemesi

Mezenkimal hücre tiplerini; dolaşımdaki fibrositler, pulmoner fibroblastlar ve miyofibroblastlar oluşturmaktadır. Bu hücreler, aktive edilmiş epitel ve endotel hücreler tarafından oluşturulan anormal biyokimyasal ortam tarafından göç ettirilir, aktive edilir; çoğalması, farklılaşması, transdiferansiyasyonu için indüklenir. İlk tetikleyici ve

mezenkimal hücre artışının kaynağı hala bilinmemektedir, ancak mevcut literatür fibroblastları ve miyofibroblastları İAF patogenezinin kilit hücreleri olarak tanımlamayı kabul etmektedir (Sgalla et al., 2018). EMT'ye uğramış ve α -SMA ifade eden AEC'lerin miyofibroblastlar olarak kabul edilip edilemeyeceği hala tartışılmaktadır (Hill et al., 2019; Sgalla et al., 2018).

Fibrositler, genellikle CD45, CD34 ve tip I/tip III kollajen gibi fibroblast belirteçleri ile tanımlanan, dolaşımdaki kemik iliği kaynaklı mezenkimal progenitör hücrelerdir (Keeley et al., 2011; Maharaj et al., 2013). Patolojik süreçlerde lokal mezenkimal hücreler önemli ölçüde azaldığında hasarlı dokular tarafından fibrositler bölgeye çağırılabilirler. Aktif epiteller, CXCL12, CCL2'yi ve güçlü bir fibrosit aktivatörü olan TGF- β 1'i salgılayarak fibrositleri hasarlı bölgeye çağırır (Sgalla et al., 2018). Hasarlı akciğerde, fibrositler, fibroblastlara ve miyofibroblastlara farklılaşır ECM üretimi yoluyla ve profibrotik sitokinleri salgılayarak fibrozisi destekler (Maharaj et al., 2013; Sgalla et al., 2018).

Fibroblastlar, yara onarım sürecinde, normal ve iyi yapılandırılmış bir ECM'yi yeniden oluşturan doku mezenkimal hücreleridir. İAF patogenezi sırasında, fibrositler gibi akciğer türevli fibroblastlar da miyofibroblastlara farklılaşmaya ve ECM üretimine yol açan profibrotik mediatörler ile uyarılırlar. Bu transdiferansiyasyon için en önemli uyarıcı faktör TGF- β 1'dir (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014; Sgalla et al., 2018).

Miyofibroblastlar İAF'nin kilit efektör hücreleridir. Fibroblastlardan daha fazla ECM sentezlemektedirler. Miyofibroblastların ürettiği matris kötü organize edilmiş şekilde ve çok yoğundur. Miyofibroblastlar α -SMA nedeniyle düz kas hücrelerine benzer şekilde kasılma özelliklerine sahiptirler ancak, düz kaslardan farklı olarak geri dönüşümsüz olarak kasılmaktadırlar. Miyofibroblastlar kolajen fibrilleri daha sert bir ECM oluşturacak şekilde düzenlerler. ECM'nin mekanik özellikleri fibroblastların/miyofibroblast aktivitesinin düzenlenmesinde en önemli faktördür. Miyofibroblastların, daha sert bir ECM ile temas ettiklerinde pozitif geri besleme döngüsü ile ECM sentez aktiviteleri gelişmektedir (Sgalla et al., 2018; Upagupta et al., 2018). Dolayısıyla aşırı ECM birikimi gerçekleşir. Oysaki sağlıklı, yumuşak ECM yapısı,

miyofibroblastları güçlü bir şekilde inhibe edip sayılarının azalmasına yol açmaktadır. Bu açıdan normal yara iyileşmesinde görülen ECM bozunmasının gerçekleşmemesi sonucu oluşan kollajenin birikimi ve bozunması arasındaki dengesizlik, miyofibroblastların aşırı faaliyet göstermesi yoluyla fibrozise katkı sağlamaktadır (Sgalla et al., 2018). Ayrıca bu ECM'nin aşırı birikmesi, akciğer hacmini azaltan skarlaşma sonucu oluşan mekanik sertliğin klinik öncesi İAF modellerinde, TGF- β 1 aktivasyonu yoluyla akciğer fibrozisinin gelişimine katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Kolb et al., 2017).

Aktif miyofibroblastlar tarafından üretilen yüksek konsantrasyondaki ekstraselüler reaktif oksijen türleri (ROS), komşu epitel hücrelerin apoptozunu/yaralanmasını indükleyerek ilave fibrojenik etkilere aracılık edebilir (Thannickal and Horowitz, 2006).

İAF'nin tipik bir belirleyicisi olan 'fibroblastik odaklar' tip 2 AEC'ler ile buna yakın bölgede yer alan mezenkimal hücreler arasındaki anormal ilişkiden kaynaklanan hiperplastik tip 2 AEC'lerin çok yakınında görülen miyofibroblastların biriktiği bölgeleri ifade etmektedir (Sgalla et al., 2018).

2.4.4. İnflamasyon ve bağışıklık

İAF'nin patolojik belirleyicisi olan fibroblastik odaktaki inflamatuvar hücrelerin nispi azlığı ve İAF'nin tedavisinde anti-inflamatuvar stratejilerin başarısızlığı nedeniyle inflamasyonun İAF patogenezindeki rolü tartışmalıdır (Bringardner et al., 2008; Coward et al., 2010). Anormal epitel-mezenkimal iletişimin neden olduğu düşünülen İAF'nin patobiyolojisinde, inflamasyonun ikincil bir rol oynadığı düşünülmektedir (Bringardner et al., 2008; Sgalla et al., 2018). Dolayısıyla inflamasyonun fibrozisin bir sebebi değil sonucu olduğu düşünülmektedir.

İnflamatuvar hücreler normal yara iyileşmesinin erken fazlarından itibaren yer alırlar. Koagülasyon kaskadı ve hasarlı epitellerden salgılanan mediatörler aracılığıyla nötrofiller ve monositler bölgede toplanır. Yara onarımının gerçekleşmemesi durumunda, nötrofiller ve makrofajlar yeterince hızlı bir şekilde yok edilmez ve bu inflamatuvar hücrelerin varlığı, üretmiş oldukları ROS ile epitel hasarını arttırarak fibrotik

kaskadı daha da şiddetlendirebilir (Camelo et al., 2014; Koh and DiPietro, 2011) ve makrofajlar, güçlü mediatör ile doğrudan profibrotik etkilere sahip olabilir (Sgalla et al., 2018).

Lenfositlerin İAF'ndeki rolü hala tartışılmaktadır. Bazı lenfositik sitokinlerin, fibroblast ve miyofibroblast aktivitelerine profibrotik olarak doğrudan etki ettiği kabul edilir. Th-1, Th-2 ve Th-17 alt tiplerinin, İAF patogenezinde rol alabileceğine dair kanıtlar vardır (Camelo et al., 2014). Th1 alt kümesi, nihai bir profibrotik etki ile IL-1 α , TNF- α , PDGF ve TGF- β 1 üretir, ancak Th2 ve Th17 yanıtları İAF patogenezinde daha önemli gibi görünmektedir. Th2 alt kümesi için tipik interlökin, IL-4'tür. Bu interlökin, IL-5, IL-13 ve TGF- β 1 seviyelerini indükler ve doğrudan fibroblast aktivasyonunda kullanılır. Ayrıca, İAF hastalarından izole edilen fibroblastlar, IL-13'e aşırı duyarlılık göstermektedir; Bu interlökin, epitel hücre apoptozu ve ECM üretimini artıran fibroblastların etkinliği üzerinde etkiye sahiptir. Th17 alt kümesi TGF- β 1 seviyelerini artırarak dolaylı olarak fibrozisi destekler. Pozitif bir geri besleme döngüsü yaratarak TGF- β 1 tarafından pozitif olarak düzenlenir. Bununla birlikte, hastalığın erken evrelerinin ve ilerleyiş mekanizmalarının netleşmesi açısından, inflamasyonun İAF patobiyolojisindeki rolü üzerine yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmektedir (Camelo et al., 2014; Sgalla et al., 2018).

2.5. İAF Epidemiyolojisi

İnsterstisyel akciğer hastalıklarının insidansı/prevalansı, global dağılıma rağmen iyi tanımlanamamıştır. Bu durum, etiyolojinin heterojen doğası, teşhisin karmaşıklığı, üniform tanı kriterlerinin henüz son zamanlarda tanımlanmış olması ve tanı konan hasta sayısının azlığı ile ilgili olabilir (Meltzer and Noble, 2008; Olson et al., 2018). Hastalığın sporadik formu ailevi akciğer fibrozisine göre daha sık görülmektedir (Genetics Home Reference, 2019).

İAF'nin dünya çapında en az 5 milyon kişiyi etkilediği tahmin edilmektedir (Meltzer and Noble, 2008). Nadir görülen bir hastalık olarak kabul edilir, ancak son zamanlarda prevalans ve insidansı, muhtemelen farkındalığın artması, popülasyonun

yaşlanması veya diğer faktörler nedeniyle artmaktadır (Sauleta et al., 2018). İAF dünya genelinde tahmini yıllık insidansı 4.6-16.3/100.000, prevalansı 13-20/100.000 'dir (Genetics Home Reference, 2019; King Jr et al., 2011).

Türkiye'de interstisyel akciğer hastalığının insidansı 25,8/100,000 olarak hesaplanmıştır. İAF oranı ise, 2245 interstisyel akciğer hastasının değerlendirildiği bir çalışmada % 19.9 olarak belirlenmiştir (Musellim et al., 2014). Ayrıca İAF görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. 50 yaşın altındaki bireylerde oldukça nadir görülmektedir. İAF hastalarının ortalama yaşı 66 iken erkeklerde kadınlardan daha sık (1.5-1.7:1) görülmektedir (King Jr et al., 2011; Meltzer and Noble, 2008; Richeldi et al., 2017). Hastalığın seyri oldukça değişkendir. Bazıları birkaç ay içinde ciddi şekilde hastalanırken, diğerleri on yıl veya daha uzun süre hastalıkla yaşayabilir. Ancak çoğu İAF hastası, tanı konduktan sonra 3-5 yıl kadar hayatta kalabilmektedir (Genetics Home Reference, 2019).

2.6. Risk Faktörleri

İAF gelişiminde içsel risk faktörlerinin, ek hastalıkların ve dışsal risk faktörlerinin rolünü destekleyecek veriler artmaktadır. Sigara, gastrik asit aspirasyonu, herpes virüsü enfeksiyonu, belli genlerde meydana gelen mutasyonlar gibi genetik ve çevresel etkileşimler; telomer kısalması, epigenetik değişiklikler, artan oksidatif stres gibi yaşlanma ile birlikte meydana gelen faktörlerin İAF ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (King Jr et al., 2011; Kolb et al., 2017; Mouratis and Aidinis, 2011; Zaman and Lee, 2018). Bu risk faktörleri bağımsız olarak İAF'ye olan duyarlılığı artırabilir, hastalık gelişimi riskinin artmasında sinerjik bir şekilde etki edebilir (Zaman and Lee, 2018).

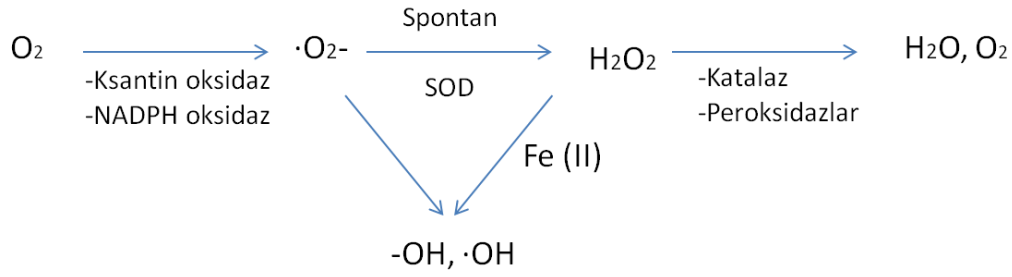
2.6.1 Oksidatif stres

Oksidasyon, elektronu bir maddeden oksitleyici bir maddeye aktaran kimyasal bir reaksiyondur. Oksidasyon reaksiyonları, dokulara/hücrelere zarar veren zincir reaksiyonları başlatan serbest radikaller dahil toksik metabolit oluşturabilir. Antioksidanlar, serbest radikal ara maddelerini/türevlerini ortadan kaldırarak bu zincir

reaksiyonları sonlandırır ve kendileri oksitlenerek diğer oksidasyon reaksiyonlarını inhibe ederler. Bu antioksidanların düşük seviyeleri veya antioksidan enzimlerin inhibisyonu oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres genel olarak ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS) gibi yüksek derecede reaktif moleküllerin fazla oluşumu ve/veya yetersiz uzaklaştırılması olarak tanımlanır. ROS, süperoksit, hidroksil, peroksil, hidroperoksil gibi serbest radikallerin yanı sıra hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit gibi radikal olmayan türleri de içerir. ROS fizyolojik koşullar altında üretilir ve fagositoz, nötrofil fonksiyonu ve vazorelaksasyonda görüldüğü gibi bir dereceye kadar sinyal molekülleri ve savunma mekanizmalarında yer alırken, yüksek düzeyde oksidatif stres proteinlere, lipidlere ve DNA'ya zarar vererek enzim aktivitelerinde değişiklik, membran lipid peroksidasyonu gibi etkilerle patolojik sonuçlara sebep olmaktadır. Son yıllarda, oksidatif stres ile bağlantılı hastalıkların tedavisinde antioksidanların terapötik kullanımına olan ilgi artmıştır (Bajpai et al., 2016).

Aktif oksijen türlerinin oluşumunda ilk adım olarak, hücre içerisinde, enzimatik olmayan mitokondriyal elektron transport sisteminde ya da ksantin oksidaz gibi enzimler aracılığıyla oluşabilen süperoksit anyonunun üretimi olduğu belirtilmiştir. Süperoksit anyonundan ise kendiliğinden ya da enzimatik olarak H_2O_2 oluşumu meydana gelmektedir. Bunun dışında H_2O_2 O_2 'nin iki elektron indirgenmesi ile de oluşabilmektedir. H_2O_2 'ten ise Fe(II) gibi geçiş metal katyonları ile katalizi sonucunda oldukça reaktif, hücrelere çok daha fazla zarar veren hidroksil radikali meydana gelmektedir. Akciğeri sıklıkla oksidatif stresten koruyan antioksidan enzim ailesi katalaz, GSH peroksidaz, SOD'u içerir. SOD süperoksit anyonunu H_2O_2 'e dönüştürür. H_2O_2 'i

detoksifiye edip hidroksil radikali oluşumu önleyen enzimler ise katalaz ve GSH peroksidazdır. Bu sayede bu enzim ailesi, toksik bir aktif oksijen türünü toksik olmayan yan ürünlere dönüştürmek için sıralı bir şekilde hareket edebilir (Quinlan et al., 1994). Bunlar dışında bazı vitaminler, mineraller, peptidler (GSH), fenolik asitleri, nitrojen bileşikleri (ürik asit) gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da bulunmaktadır (Bajpai et al., 2016; Lushchak, 2014).



Şekil 2.5 ROS oluşumu ve katabolizmalarında yer alan antioksidan enzimler.

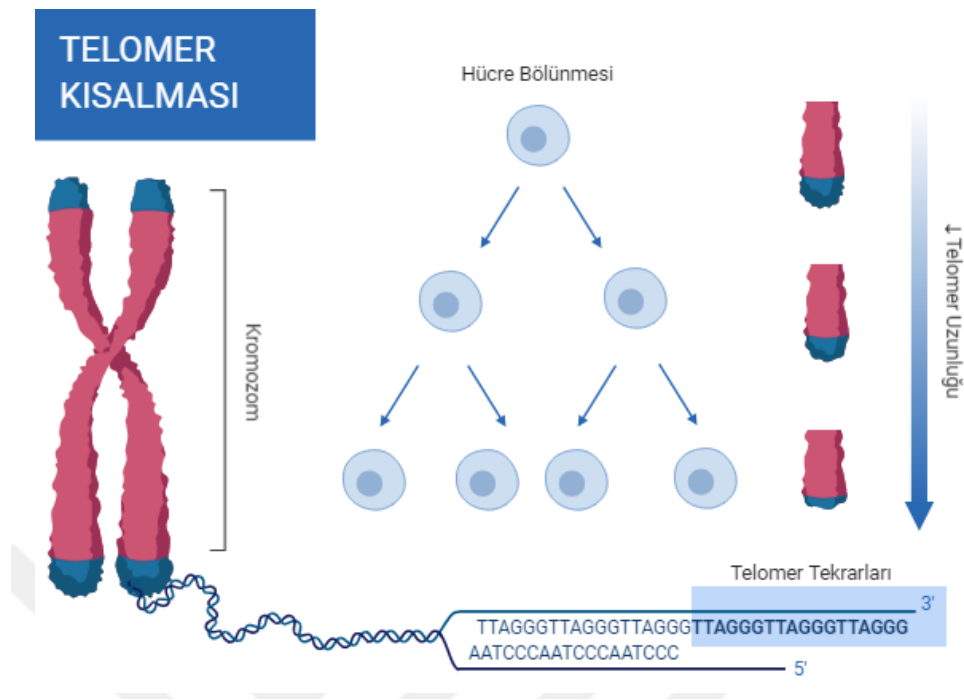
Oksidatif stres, akciğerler de dâhil olmak üzere çeşitli organlarda fibrozisin altında yatan önemli bir moleküler mekanizma olarak ifade edilmektedir (Kliment and Oury, 2010). Sürekli ve kronik oksidatif stresin yaşlanmanın ve/veya yaşlanma ile ilişkili hastalıkların ilerlemesine katkıda bulunması muhtemeldir. İAF'de yaşlanmanın rolü tam olarak anlaşılmamıştır ancak akciğerlerin çeşitli endojen ve eksojen oksidanlara maruz kalması sonucu inflamatuvar ve fibrotik yanıtların ortaya çıkması ve antioksidan kapasitenin bozulmasıyla ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Swamy et al., 2016). Oksidatif stres, İAF'deki ana patojenik yollardan biridir ve yaşlanma ile birlikte artan ROS, İAF riskini artırmaktadır (Fois et al., 2018; Hemmati et al., 2019; Kurundkar and Thannickal, 2016; Swamy et al., 2016; Yan et al., 2017; Zhang, Zhihui et al., 2018). İAF'de, ROS ve oksidatif stres belirteçleri belirgindir ve antioksidan savunma sisteminin bozulmasının epitel hücrelerinin apoptozuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Oksidatif stresin İAF'de önemli bir rol oynadığına dair artan kanıtlar var (Fois et al., 2018; Kliment and Oury, 2010; Maher, 2012). Yaşlanma dışında sigara dumanı, mineral tozu, radyasyon gibi endojen ve eksojen oksidanlara maruz kaldıklarında alveolar, bronşiyal ve endotel hücreleri ve fagositler tarafından akciğerde büyük miktarda ROS ve RNS üretilir ve bu da İAF'nin ve diğer diffüz akciğer hastalıklarının ilerlemesinden sorumlu redoks dengesizliğine neden olur (Qazi and Molvi, 2018). Normal akciğer homeostazisi, hücre içi ve hücre dışı oksidanlar ve antioksidanlar arasında uygun bir denge gerektirir. Fibroze aracılık eden ROS üretimindeki dengesizliğin fibrozisli hastalarda en iyi nasıl hedefleneceği kesin olarak tespit edilememiştir (Cheresh et al., 2013).

Nrf2 nükleer seviyede, antioksidan yanıt elemanına (ARE) veya elektrofil yanıt elemanına bağlanarak detoksifikasyon, antioksidan ya da antiinflamatuvar genlerin ya da

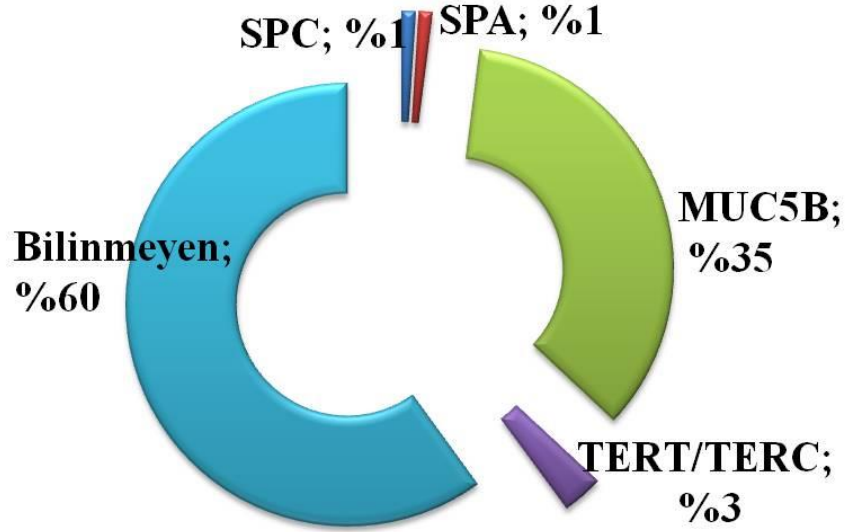
hasarlı proteinlerin temizlenmesinde rol oynayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür. 500'den fazla genin ekspresyonu Nrf2/ARE yolağı ile regüle edilir. Hücre içi antioksidan savunma yanıtının ana düzenleyicisidir (Chen et al., 2016; Silva, et al., 2018; Smith, et al., 2016). İAF gibi yaşlanmayla ilişkili fibrotik hastalıklarda Nrf2 sinyalinde düzensizlikler görüldüğü belirtilmiştir. Bu sebeple yeni terapötik stratejilerinden biri Nrf2 ekspresyonunun ve/veya aktivasyonunun artırılmasıdır. Bu yaklaşımın İAF'de etkisiz olduğu gösterilen N-Asetilsistein (NAC) takviyesi ile GSH seviyelerinin artırılması gibi tek bir antioksidan yolağı içeren stratejiden daha fazla koruma sağlayacağı düşünülmektedir. Son yıllarda, ilaç şirketleri de akciğer fibrozisi dahil çeşitli kronik hastalıkları tedavi etmek için yeni Nrf2 aktivatörlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır (Liu, Q. et al., 2019; Swamy et al., 2016).

2.6.2. Yaşlanma, telomer kısalması ve genetik etkiler

Telomerler ökaryotik kromozomların uçlarını örten ve koruyan genetik elementlerdir. Telomeraz, çoğalan hücrelerde telomerleri uzatmaya yarayan özel bir ters transkriptazdır. Yetişkin insanlardaki çoğu somatik hücre, yeterli seviyede telomeraz içermez ve telomer bölgelerinin hücre bölünmesiyle birlikte yavaş yavaş kısalması sebebiyle, genomdaki tüm telomerik DNA'nın toplam miktarı olan telomer rezervi yaşlanma sırasında yavaş yavaş tükenir (Le Saux et al., 2013; Victorelli and Passos, 2017). Kısa telomerlerin kromozom instabilitesine ve telomer fonksiyon bozukluğuna yol açtığı belirlenmiştir (Thomas et al., 2000). Biyolojik yaşlanma sürecinin bir sonucu olan telomer kısalması en sonunda hücre ölümü veya kalıcı hücre döngüsünün durmasına yol açan bir DNA hasar yanıtını aktive eder. Sonuç olarak dejeneratif, yaş ile ilişkili hastalıklarda telomer kısalması olduğu görülmektedir (Thomas et al., 2000). Yaş, idiyopatik interstisyel pnömonilerin gelişimi için en büyük risk faktörüdür. Kısa telomerler akciğerde doku yenileme kapasitesini sınırlamaktadır (Alder et al., 2008).



Telomerazın temel bileşenlerinden -hTERT, hTR, TERC'in- herhangi birinde meydana gelen mutasyonlar, hızlandırılmış telomer kısalmasına ve sonuçta organ yetmezliğine sebep olur. TERC ve TERT genlerindeki mutasyonlar, ailesel İAF vakalarının yaklaşık %15'inde ve sporadik (daha önce ailesinde İAF hastası bulunmayan) İAF vakalarının daha küçük bir yüzdesinde bulunmuştur (Alder et al., 2008; Armanios, 2012; Genetics Home Reference, 2019).



Şekil 2.7 Sporadik İAF gelişimine yatkınlık sağlayan genetik mutasyonların tahmini prevalansı (Wolters et al., 2014).

Telomeraz bileşenlerinde mutasyon bulundurmayan sporadik İAF hastalarındaki AEC hücrelerinin de kısa telomerlere sahip olduğu belirtilmektedir (Alder et al., 2008; Armanios, 2012; Koziel et al., 2011). İAF'nin %2-20'sinin ailesel formda olduğu tahmin edilmektedir (Moore et al., 2013). Dolayısıyla sporadik formun, ailesel İAF'ye göre daha yaygın olduğu (Genetics Home Reference, 2019) da göz önünde bulundurulduğunda, telomer ile ilgili mutasyonlardan ziyade, kısa telomer İAF için daha iyi bir belirteçtir. Böylece kısa telomerler İAF'nin bir işareti olarak kabul edilmektedir ve yaşla ilgili başlangıcında muhtemelen rol oynamaktadır (Alder et al., 2008; Hecker, 2018; Koziel et al., 2011). Yaşlanan tip 2 AEC'lerin fibrozis bölgelerinde birikmiş olduğu gösterilmiştir (Naikawadi et al., 2016). Kısa telomerlerin epitel hücrelerinde apoptotik yolları indüklediği bilinmektedir (Sauler et al., 2019). Bu sebeple telomerler, yeni tedaviler için umut verici hedefler olarak tanımlanmıştır (Povedano et al., 2015, 2018).

Telomerazın, insan hücrelerinde yeniden aktive edilmesi; hücrelerde telomerik rezerv kaybını ve hücre yaşlanmasını önleyebilir (Le Saux et al., 2013). Telomeraz aktivasyonu, telomer kısalması ile ilişkili hastalıkların tedavisi adına büyük önem taşımaktadır. Ancak kansere yol açabileceği düşüncesiyle bu alanda yapılması gereken

alışmalar gecikmiştir. 2002 yılında Prof. Harley'in kanser ve telomeraz arasındaki ilişki üzerine 86 yayını değerlendirerek hazırladığı derleme makalesinde, telomerazın kansere sebep olan bir onkogen olmadığı ve hücrelerin büyüme kontrolünü kaybederek kanserli olmasına sebebiyet vermediği sonucuna ulaşmıştır (Harley, 2002). Bununla birlikte telomeraz aktivasyonuna yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

Sporadik İAF ile tutarlı bir şekilde ilişkili hiçbir genetik faktör yoktur. Katlanmamış protein yanıtındaki değişiklikler; sadece tip 2 AEC'de ifade edilen bir hidrofobik protein olan SPC mutasyonlarına sahip bazı ailevi İAF vakalarında meydana gelmiştir. Bu mutasyon epitel hücre hasarına neden olabilen yanlış katlanmış proteinin üretilmesine neden olur (King Jr et al., 2011). Bunun dışında bronşiyal epitelleri tarafından üretilen MUC5B geni, havayolu temizliği için gerekli olan bir glikoprotein olan mucin 5B'yi kodlar. Bakterilere karşı doğal bağışıklık tepkisi olması açısından önemlidir. MUC5B'nin promotör bölgesinde tek nükleotid polimorfizminin (RS35705950), İAF'de rolü bulunmaktadır. RS35705950 minör alel, küçük hava yolu epitel hücrelerinde jel oluşturuu müsin 5B'nin aşırı ekspresyonuna yol açar. Mucin 5B aşırı ekspresyonu ile İAF riski arasındaki ilişkiyi ortaya koyan mekanizma belirsizdir. Bazı araştırmacılar bunun akciğer mikrobiyomunda değişikliklere yol açabileceğini ve İAF'yi destekleyen doğal immün yanıtların ortaya çıkabileceğini varsaymışlardır (King Jr et al., 2011; Lederer and Martinez, 2018).

2.6.3. Çevresel riskler

Mevcut gözlemsel çalışmalardan elde edilen sonuçlar İAF riskinin, bir dizi çevresel ve mesleki maruziyetler ile tutarlı bir şekilde arttığını göstermektedir. Meta analizi sonuçlarına bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı şekilde İAF patogeneine katkıda bulunan; sigara kullanımı dışında organik tozlar (hayvancılık/tarım/çiftçilik), ahşap tozu, metal tozu ve silikaya maruziyet gibi riskler bulunmaktadır (Taskar and Coultas, 2006; Trethewey and Walters, 2018).

Sigara içme/sigara dumanına maruz kalmanın İAF için önemli ölçüde bir risk faktörü olduğu bulunmuştur. Çalışmalarda kullanılan vaka tanımına bağlı olarak, İAF

hastalarında tütün kullanımının yaygınlığı %41 ile %83 arasında değişmektedir (Oh et al., 2012; Silva, D. R. et al., 2008). Sigara içmenin İAF gelişimi için potansiyel bir risk faktörü olduğu tespit edilmiştir. İAF gelişimi ile sigara içilmesi arasında güçlü bir ilişki olduğunu öne süren çalışmalara rağmen, sigara içmenin İAF patogenezinde katkıda bulunabileceği mekanizma bilinmemektedir (Margaritopoulos et al., 2015; Oh et al., 2012).

İAF yaşlılık hastalığı olarak kabul edildiği için, sigaranın İAF gelişimine yaşlanma ile ilişkili şekilde katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Sigara dumanı, partikül halinde madde ve ayrıca yüksek derecede toksik reaktif oksijen ve nitrojen türlerini içeren çok sayıda kimyasal madde içerir. Bu sebeple sigara içenlerde oksidan/antioksidan dengenin değişmesi sonucu oksidatif stresin artmasının hastalığın ilerlemesini artırabileceği yönünde bir öneri vardır (Donohue, 2006; Kurundkar and Thannickal, 2016; Oh et al., 2012).

2.6.4. Mikrobiyal ajanlar

Enfeksiyöz ajanların İAF'de olası rolü olabileceği belirtilmiştir. Ancak hayvan modelleri kullanılarak gerçekleştirilen bazı çalışmalar, İAF'nin indüklenmesinde ve şiddetlenmesinde enfeksiyöz ajanların varlığını belirlerken, hastalarda İAF'nin mikrobiyal indüksiyonuna ilişkin literatür bilgisi yetersizdir (Chioma and Drake, 2017). Virüslerin (Hepatit C, insan Herpes virüsleri) İAF'deki rolünü destekleyen kanıtlar yetersiz olmakla birlikte sıklıkla çelişkilidir (Molyneaux and Maher, 2013; Spagnolo et al., 2019). Bakterilerin İAF patogenezinde oynadığı rol daha az belirgindir (Molyneaux and Maher, 2013). Ayrıca, özellikle İAF hastalarının bakteriyel pnömoni geliştirmeye duyarlı olmaları sebebiyle, bakteriyel enfeksiyonun İAF'nin doğrudan nedeni mi yoksa sadece hastalığı şiddetlendiren bir ajan mı olduğu belirsizdir (Chioma and Drake, 2017).

2.6.5. Eş zamanlı hastalıklar

İAF'li hastalar sıklıkla pulmoner enfeksiyon, amfizem, pulmoner hipertansiyon, akciğer kanseri, gastroözofageal reflü, kardiyovasküler hastalık, diabetes mellitus,

obstrüktif uyku apnesi gibi çeşitli hastalıkları da eş zamanlı olarak yaşarlar (King and Nathan, 2017; Suzuki and Kondoh, 2017). Belirlenen İAF ile ilişkili komorbidite prevalansı, çalışılan popülasyona ve uygulanan tanı ölçütlerine göre büyük ölçüde değişmektedir. Bir çalışmada İAF'li 272 hastanın analizi sonucunda, yalnızca %12'sinde komorbidite olmadığı belirtilirken; hastaların %58'inde 1-3 komorbid durumu, %30'unda ise 4-7 komorbidite olduğu belirtilmiştir. Artan komorbidite prevalansının birleştirici bir nedeni tespit edilememiştir ancak, akciğerde yukarı regüle edilmiş mediatörlerin potansiyel sistemik rolü hakkında birçok teori vardır. Diğer bir önemli olasılık ise, İAF riskini arttırdığı bilinen ve yaşla ilgili komorbiditelerin de gelişme riskini arttırabilecek yaşlanma olgusu olan telomer kısalmasıdır (King and Nathan, 2017).

2.7. Teşhis

İAF hastalarına başlanıçta, diğer akciğer hastalıklarına benzer belirtiler gösterdiği yanlış teşhis konmaktadır. İAF tanısı, diğer interstisyel akciğer hastalıklarının bilinen nedenlerinin hastada mevcut olmamasını ve akciğerlerin yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografisinde (HRCT) veya cerrahi akciğer biyopsisinde bir UIP paterninin (fibrozis nedeniyle akciğer parankiminde yamalı görünüm/yapısal bozukluk, fibroblastik odaklar, bal peteği görünümü, retiküler anormallik) bulunmasını gerektirir. UIP paternini belirlemek de zor olabilmektedir; bu teknik sebeplerden ya da hastalığın tipik olmayan belirtilerinden kaynaklı olabilir. Her hastanın akciğer HRCT sonucunda UIP paterni görülmeyebilir bu durumda cerrahi akciğer biyopsisi gerekli olmaktadır. Ancak hastanın sahip olduğu komorbiditelerden, ciddi fizyolojik bozukluklardan dolayı biyopsi riskli olabilir ya da yanlış bölgelerden alınan biyopsi sonucunda normal akciğer dokusu görünümü sebebiyle İAF teşhisi konamayabilir (Raghu and Richeldi, 2017; Spagnolo et al., 2012). Ayrıca, genellikle egzersiz sonrası nefes darlığı ve kuru öksürük olarak ortaya çıkan hastalığın ilk belirtileri ile hastalığın doğru teşhisi arasında önemli bir gecikme söz konusudur. Erken teşhis zamanında akciğer naklinin gerçekleştirilmesi ve uygun olmayan ilaçların verilmesini önlemek (steroid ve bağışıklık baskılayıcı gibi) açısından fayda sağlamaktadır (Spagnolo et al., 2012). İAF hastalarının, teşhisten sonra ortalama hayatta kalma süresi 2-5 yıldır (Carrington et al., 2018).

2.8. Tedaviye Yönelik En Önemli Mevcut Uygulamalar

2.8.1. Farmakolojik uygulamalar

İAF'ye tedavi yaklaşımı son yirmi yılda önemli ölçüde gelişmiştir. 2000 yılında görülen tipik uygulama, prednizon ve azatiyoprin ile bağışıklık sistemini baskılamaya dayanmaktaydı. 2005 yılında yayınlanan IFIGENIA çalışması, bu kombinasyona antioksidan bir bileşik olan NAC ilavesinin akciğer fonksiyonunun korunmasına yardımcı olacağını ileri sürmüştür. Bununla birlikte, Prednizon, azatiyoprin ve NAC: PANTHER-İAF çalışması sonucunda, bu üçlü kombinasyon tedavisini alan hastaların, yalnızca plasebo alan hastalara göre ölüm ve hastanede yatma risklerinde artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, NAC tek başına verildiğinde, İAF'li hastalarda zorlu vital kapasitenin (Forced Vital Capacity-FVC) korunmasında/akciğer fonksiyonlarının iyileştirilmesinde plaseboyla kıyaslandığında önemli bir fayda sağlamamıştır. Elde edilen bu sonuçlar tedavide, immun baskılayıcıların kronik kullanımından ve NAC'dan uzaklaşmaya neden olmuştur (Barratt et al., 2018; Pleasants and Tighe, 2019; The Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, 2012). 2011'deki ATS/ERS/JRS/ALAT ifadesinde, net ve tatmin edici sonuçlar veren herhangi bir farmakolojik tedavi olmadığı belirtilmiştir. 2015 yılında bu rehber güncellenmiştir. Güncellenen rehberde, bazı ilaçların, klinik çalışmalara dayanan fayda ve dezavantajları hakkındaki koşullu önerileri tanımlamıştır. Ayrıca 2015 rehberindeki tedavi önerileri tamamen farmakoterapi odaklı olmuştur (Fujimoto et al., 2015; Martinez et al., 2017).

Preklinik çalışmalarda İAF'nin önlenmesi amacıyla veya terapötik amaçla pek çok ilaç denenmiştir. Bunlar genellikle anti-inflamatuar, antioksidan, antibiyotik sınıftaki bileşikler olmuştur (Carrington et al., 2018; Fujita et al., 2006; Oku et al., 2008; Yildirim et al., 2006). Bunun dışında antikoagülanlar, anjiyogenez inhibitörleri ve mukolitik sınıfları gibi diğer bileşik sınıfları, pre-klinik modellerde benzer etkinlik göstermiştir (Boyacı et al., 2006; Carrington et al., 2018; Scotton et al., 2009; Wan et al., 2013). Yıllar boyunca denenilen bu küçük moleküller, BLM tarafından indüklenen iltihabı azaltmada etkili olmasına rağmen fibrozisi önlemede etkili olmadığından klinik çalışmalarda başarısız olmuştur (Carrington et al., 2018; Le Saux et al., 2013). Bunlar dışında ototaksin

inhibitörü olan GLPG1690, prelinik çalışmalarda olumlu sonuçlar göstermiştir ve bu molekülün klinik çalışmaları devam etmektedir (Carrington et al., 2018; Maher et al., 2018). Ayrıca bir telomeraz aktivatörü olan GRN510 ile, mTERT heterozigot fare fibrozis modelinde gerçekleştirilen bir çalışmada umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Le Saux et al., 2013).

2.8.1.1. Pirfenidon ve Nintedanib

İAF için ilaç geliştirmede, fibrozisin temel yollarını hedeflediğine inanılan bileşiklere odaklanılmıştır. Son 5 yıl içerisinde, birçok İAF hastası için tedavi seçeneği sunan iki yeni antifibrotik tedavi; pirfenidon (Esbriet®; Roche/Genentech USA) ve nintedanib (Ofev®; Boehringer Ingelheim) geliştirilmiştir (Barratt et al., 2018). Bu iki ilacın akciğer fonksiyonlarındaki düşüşü yavaşlattığı gösterilmiş ve 2014 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Pleasant and Tighe, 2019). 2015 yılında güncellenen rehberde bu iki ilacın kullanımı, bazı hastalar için farklı tedavi seçeneklerinin daha uygun olabileceğini kabul ederken, hastaların çoğunluğu için uygun bir seçim olacağını belirtecek şekilde koşullu olarak önerilmiştir (Fujimoto et al., 2015; Pleasant and Tighe, 2019).

İAF hastalarında pirfenidon kullanımı için şartlı öneri, pirfenidonun İAF’de etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için yapılan faz III çalışmalarının (ASCEND ve CAPACITY) sonuçlarına dayandırılmıştır (Barratt et al., 2018; Pleasant and Tighe, 2019; Raghu and Richeldi, 2017). Pirfenidon’un kesin etki mekanizması bilinmemekle birlikte yüksek dozlarda anti-inflamatuar, antioksidan ve antifibrotik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir; TGF- β ve TNF- α (Lederer and Martinez, 2018) üretimini inhibe etmiştir, oksidatif stres belirteçlerini azaltmıştır. TGF- β indüklü sinyal yollarını zayıflatmasıyla akciğer fibroblastlarının proliferasyonunu ve miyofibroblastlara farklılaşmasını azaltmıştır. Prokollajenin işlenmesi/salgılanmasında yer alan TGF- β -indüklü α -SMA ve kollajenin ekspresyonunu azaltmıştır. Pirfenidon, FVC’deki düşüşü azaltarak hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaktadır (Kolb et al., 2017; Pleasant and Tighe, 2019; Richeldi et al., 2017). Gözlemsel bir çalışma pirfenidonun, İAF semptomlarından olan öksürüğü azaltabileceğini öne sürmektedir (Lederer and Martinez, 2018).

Pifenidonun yan etkileri arasında üst gastrointestinal semptomlar, ışığa duyarlılık, deri döküntüsü, anoreksi ve karaciğer toksisitesi bulunmaktadır. Bu yan etkiler klinik araştırmalara katılan hastalarda, özellikle pifenidon dozu azaltıldığında iyi tolere edilmiştir. Tedavi sırasında periyodik olarak karaciğer fonksiyonlarının izlenmesi önerilmektedir (Lederer and Martinez, 2018; Martinez et al., 2017).

Nintedanibin, bir faz II çalışmasında (TOMORROW) İAF hastalarında akciğer fonksiyonlarındaki düşüşü yavaşlattığı ve akut alevlenme riskini düşürdüğü bulunmuştur. Ayrıca, nintedanib tedavisinin etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için iki faz III tekrarlanabilirlik çalışması (INPULSIS-1 ve -2) yapılmıştır. Akut alevlenmeler üzerindeki etki açısından iki çalışma arasında sonuçlar tutarsız olmuştur. Ancak bu çalışmaların sonuçları kabul edilebilir olarak kabul edildip, FDA tarafından İAF tedavisi için pifenidonun onaylandığı tarihte nintedanib de onaylanmıştır (Fujimoto et al., 2015; Kolb et al., 2017; Martinez et al., 2017). TOMORROW çalışması ve INPULSIS denemeleri sonucunda nintedanib'in mortalite açısından faydası görülmemiştir (Barratt et al., 2018).

Başlangıçta anti-tümör ajanı olarak geliştirilen bir intraselüler tirozin kinaz inhibitörü olan nintedanibin, VEGF ve PDGF, FGF, TGF- β gibi diğer profibrotik mediatörlerin reseptörlerinin inhibisyonu yoluyla fibrozise karşı etkinliği olduğu belirtildi (Barratt et al., 2018; Kolb et al., 2017). Nintedanibin insan akciğer fibroblastlarında, fibroblast proliferasyonunu (ayrıca fibrositlerin göçü ve fibrosit kaynaklı fibroblast proliferasyonunu), büyüme faktörü ile uyarılmış fibroblast göçünü/kasılmasını ve TGF- β indüklü fibroblasttan miyofibroblastta transformasyonu inhibe ettiği belirtilmiştir. Ek olarak, TGF- β 'nın indüklediği kollajen birikimini azaltmıştır ve pro-matriks metalloproteinaz 2 salgılanmasını yukarı regüle ederken onun inhibitörünü aşağı doğru regüle ederek ECM'nin bozunmasını desteklemiştir. Anti-fibrotik etkilerinin yanı sıra hayvan modellerinde anti-inflamatuvar etki gösterdiği de belirtilmiştir (Kolb et al., 2017; Pleasants and Tighe, 2019).

Nintedanib genellikle gastrointestinal (diyare ve bulantı) yan etkilere sebep olmaktadır. Pifenidon tedavisinde olduğu gibi karaciğer fonksiyonlarının düzenli

izlenmesi tavsiye edilmiştir. Nintedanib, anti-VEGF reseptör aktivitesi nedeniyle kanama riskinde küçük bir artışla ilişkili olduğu için, bu ajan, tam doz antikoagülant tedavisi alan hastalarda kesinlikle çok dikkatli kullanılması gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca kardiyovasküler hastalıkları olan kişileri tedavi ederken dikkatli olunması önerilmiştir (Lederer and Martinez, 2018; Richeldi et al., 2017).

Birebir karşılaştırma çalışması yapılmadığı için bu iki ilaçtan birinin diğerine göre daha üstün olduğunu söylemek zordur. Bir network meta-analizi ile pirfenidon ve nintedanib'in benzer faydalar sağladığı sonucuna varılmıştır (Lederer and Martinez, 2018). Nintedanib'in INPULSIS-ON ve Pirfenidon'un RECAP çalışmasından elde edilen veriler, bu tedavilerin etkinlik ve güvenliğinin ciddi akciğer fonksiyon bozukluğu olan hastalarda, hastalığı daha az ilerlemiş olan hastalardakine benzer olduğunu göstermektedir (Pleasant and Tighe, 2019).

İlaçların sırayla veya kombinasyon halinde kullanılıp kullanılamayacağı hala açık değildir (Martinez et al., 2017). Bu farmakolojik tedaviler için başlama zamanı, bir cevabın nasıl tanımlanması gerektiği ve tedavinin ne zaman sonlandırılması gerektiği konusunda klinisyenlere rehberlik edecek herhangi bir veri bulunmamaktadır (Lederer and Martinez, 2018). Ayrıca pirfenidon ve nintedanib tedavi seçimi için yan etkilere tolerans gibi çeşitli faktörler göz önüne alınıp, hastaya özel yapılmalıdır (Barratt et al., 2018; Fujimoto et al., 2015; Molina-Molina et al., 2017). Hastalığın ilerlemesini yavaşlatan bu ilaç tedavilerine rağmen, İAF ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir (Molina-Molina et al., 2017; Pleasant and Tighe, 2019).

2.8.2. Farmakolojik olmayan uygulamalar

2.8.2.1. Oksijen terapisi

İAF hastalarında fiziksel efor sırasında belirgin hipoksi, karakteristik bir bulgudur. İAF'li hastalarda uzun süreli oksijen tedavisinin kullanımı ile ilgili veri bulunmamaktadır ancak, ATS/ERS/JRS/ALAT tarafından uluslararası klinik uygulama rehberlerinde

şiddetle tavsiye edilmiştir. Oksijen uygulaması, efor dispnesini azaltır ve egzersiz toleransını arttırmaktadır (Fujimoto et al., 2015; Lederer and Martinez, 2018).

2.8.2.2. Pulmoner rehabilitasyon

Bir egzersiz programı olan pulmoner rehabilitasyon ATS/ERS/JRS/ALAT'ın uluslararası rehberlerinde zayıf şekilde önerilmektedir. Çünkü pulmoner rehabilitasyonun uzun vadeli yararı belirsizliğini korumaktadır ve azınlıkta uygun olmayabilir. Ancak, egzersiz kapasitesi, dispne ve yaşam kalitesinde iyileşmeler dahil olmak üzere kısa süreli faydası olduğu gösterilmiştir (Fujimoto et al., 2015; Raghu and Richeldi, 2017).

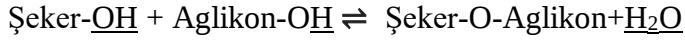
2.8.2.3. Akciğer nakli

İAF'nin progresif ve tedavi edilemez doğası göz önüne alındığında, akciğer nakli orta veya şiddetli İAF hastalarında yaygın olarak dikkate alınmaktadır (Martinez et al., 2017). Bazı İAF hastalarında, akciğer transplantasyonu, yaşam kalitesini artırabilir ve hayatta kalma süresini uzatabilir. Ancak gerçekleştirilen nakillerin yaklaşık %50'sinde 5 yıllık bir hayatta kalma oranı söz konusudur (Lederer and Martinez, 2018; Richeldi et al., 2017). Ayrıca cerrahi ve cerrahi sonrası tedavinin karmaşıklığı ve sınırlı sayıda donör organ temini nedeniyle sadece birkaç hasta akciğer nakli olabilmektedir. İAF seyrinin heterojenliği göz önüne alındığında, akciğer nakli değerlendirmesi için en uygun zamanlama belirsizdir ve birçok hasta için geç kalınmaktadır (Richeldi et al., 2017). Bunun dışında, primer greft fonksiyon bozukluğu, allogreft reddi, enfeksiyonlar ve kanser gibi komplikasyonlar sık görülmektedir (Lederer and Martinez, 2018). En önemlisi, İAF hastalarının tümü nakil için uygun değildir. 65 yıldan fazla yaşın, akciğer nakli için göreceli bir kontrendikasyon olması, İAF'nin sıklıkla yaşlı bireylerde görülmesi nedeniyle nakli sınırlandırılabilir (Fujimoto et al., 2015).

2.9. Sikloastragenol

Doğadaki birçok bitki sekonder metabolitleri glikozitler halinde bulunur. Glikozitler, kimyasal ve işlevsel olarak bağımsız iki kısımdan oluşur: aglikon (genin) ve

glikon (sakkarit). Bir glikozitte şeker, şeker olmayan moleküle (aglikona) aşağıda görüldüğü gibi glikozidik bağ ile bağlanır. Bu reaksiyon tersine çevrilebilir; bitkilerde glikozitler hem sentezlenmekte hem de hidrolize edilmektedir (Bartnik and Facey, 2017; Evans and Evans, 2009).



Glikozidik bağ çoğunlukla kararsızdır ve seyreltilmiş asitler veya enzimler tarafından hidroliz edilebilirler. Buna göre, glikosidik bağ oksijen yoluyla oluşuyorsa glikozidik bağlantı türü O-glikozit, bir karbon yoluyla bağlanıyorsa C-glikozit, bir kükürt yoluyla bağlanıyorsa S-glikozit, bir nitrojen yoluyla bağlanıyorsa N-glikozit olmaktadır. Bitkilerde en sık bulunan formu O-glikozitlerdir (Bartnik and Facey, 2017; Evans and Evans, 2009).

Glikozit terimi çok sayıda ve çeşitli şeker ve aglikon kombinasyonlarını kapsayan çok genel bir terimdir. Belirli sınıfları tanımlamak için daha kesin terimler mevcuttur. Glikozitler glikozit bağına, glikona, aglikona veya iyi tanımlanmış fiziksel ya da farmakolojik özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Glikozitlerin genel etkisi, iki bileşenine bağlıdır; şeker kısmı suda çözünürlüğü, farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri artırırken aglikon kısmı ise esas olarak terapötik yönü etkiler (Bartnik and Facey, 2017; Evans and Evans, 2009). Bu sebeple farmakoloji açısından en kullanışlı sınıflandırma aglikonun kimyasal yapısına göre yapılan sınıflandırmadır.

Aglikona göre yapılan sınıflandırmada glikozitler aglikonun ismini almaktadır. Örneğin aglikon alkol ise glikozit alkol glikozitleri, aglikon fenol ise fenol glikozitleri olarak sınıflandırılmaktadır (Evans and Evans, 2009). Aglikon yapısına göre sınıflandırılmış glikozitlerden biri olan saponozitlerin (=saponin) adı, yüzey aktif madde özelliklerini yansıtan sabun anlamına gelen Latince "sapo" kelimesinden türemiştir. Sulu çözeltilerde kararlı sabun benzeri köpükler meydana getirirler (Bartnik and Facey, 2017; Yürüker, 1989). Saponozitlerin şeker kısmı, uronik asit ve/veya glukoz gibi basit ozlardan meydana gelmiştir. Aglikonları ise sapogeninlerden (=sapogenollerden) oluşmaktadır. Bu sapogenollerin kimyasal yapısına göre saponozitler; triterpenik ya da steroidal olarak

sınıflandırılır. Steroidal saponozitlerin sapogenolleri 27 karbonlu, triterpenik saponozitlerin sapogenolleri ise 30 karbonludur (Bartnik and Facey, 2017; Yürüker, 1989).

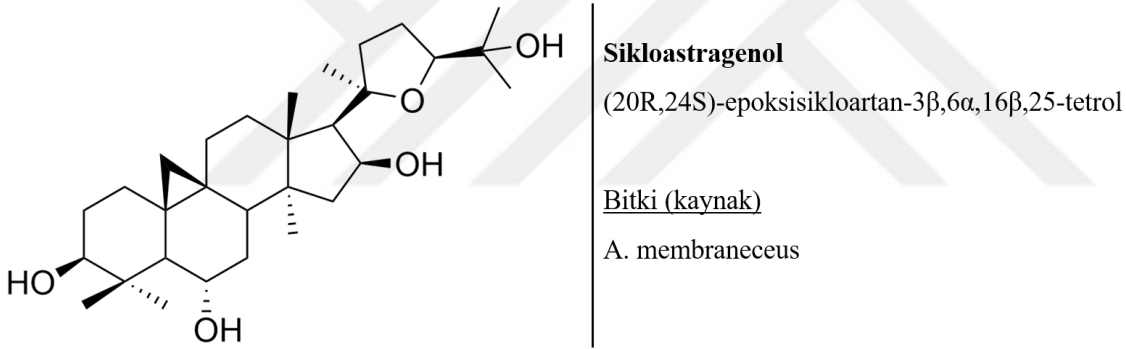
Bilinen saponozitlerin çoğu, hem yabani tip hem de kültür bitkilerinin 100'den fazla ailesinde bulunmaktadır (Bartnik and Facey, 2017). Triterpenik saponozitlerin bulunduğu bitki ailelerinden biri *Leguminosae* (*Fabaceae*=*Baklagiller*)'dir ve *Leguminosae* ailesinin en büyük cinsi olan *Astragalus*; dünya çapında 2398, Türkiye'nin bitki örtüsünde ise 425 farklı türe sahiptir (Duman, 2019; Sevimli-Gür et al., 2011). Geleneksel Çin tıbbında *Astragalus* türlerinin kökleri (Çin Geveni) 2000 yılı aşkın bir süredir ilaç olarak kullanılmaktadır. Bağışıklık fonksiyonlarını arttırdığı; karaciğeri koruduğu; yaşlanma karşıtı, anti-stres, analjezik, anti-hipertansif, antibakteriyel, anti-viral, immunstimülan, diüretik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Kuban et al., 2010; Yu et al., 2018). Halk arasında "Geven" olarak bilinen, Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu bölgesinde, geleneksel olarak lösemiye karşı ve yara iyileşmesi için *Astragalus* köklerinin ekstresi kullanılmaktadır (Sevimli-Gür et al., 2011). *Astragalus* türlerinden izole edilen en yaygın sikloartan glikoziti olan *Astragaloside IV*'ün, *in vitro* olarak anti-inflamatuar, immünoregülatör ve anti-fibrotik özellikte olduğu; kardiyovasküler hastalıklarda önemli bir koruma rolüne sahip olduğu; ayrıca karaciğer fibrozisinin oluşumunu geciktirdiği gösterilmiştir (Duman, 2019).

Sadece fotosentetik ökaryotlar tarafından üretilen sikloartan tipi triterpenoidler ilk olarak *Astragalus* bitkilerinde tanımlanmıştır (Duman, 2019). Sikloartanların bir türevi olan sikloartenollerin geniş bir farmakolojik etki spektrumu olduğu bilinmektedir. Bu sebeple *Astragalus* saponozitlerine olan ilgi, çoğu sikloartenol türevleri olan sapogenollerden kaynaklanmaktadır (Ionkova, 1995) ve *Astragalus* cinsi bitkiler sikloartan tipi saponozitler yönünden oldukça zengindir. *Astragalus* türlerinden elde edilen sikloartan tipi saponozitler kimyasal yapılarına göre dört farklı yan zincir taşımaktadır:

- Asiklik yan zincire sahip sikloartan tipi saponozitler
- 20,24-epoksi yan zincire sahip sikloartan tipi saponozitler

- 20,25-epoksi yan zincire sahip sikloartan tipi saponozitler
- 16 β ,23;16 α ,24-diepoksi yan zincire sahip sikloartan tipi saponozitler
- Bunlar dışında bu sınıflandırmaya dahil edilemeyen, az rastlanan sikloartan tipi bileşikler de bulunmaktadır (Bedir, 1998).

Bu sınıflandırmaya göre *Astragalus* türlerinden izole edilen sikloartan tipi saponozitlerden en yaygın olarak görülen 20,24-epoksi yan zincire sahip olanlar olup, bu sikloartan tipi saponozitlerde 10 farklı sapogenol tipi tespit edilmiştir. Bu sapogenoller arasında, (20R,24S)-epoksi-sikloartan-3 β -6 α ,16 β ,25-tetrol yapısındaki sikloastragenol (cyclosieversigenin) ve onun glikozitleri %75-80 oranında bulunarak en sık rastlanan türevleri oluşturmaktadır (Bedir, 1998). Dolayısıyla sikloastragenol, *Astragalus* cinsinde bulunan birçok sikloartan tipi glikozitin ana aglikonudur (Kuban et al., 2010). Sikloastragenol bir triterpenoid sapogenoldür (Yu et al., 2018).



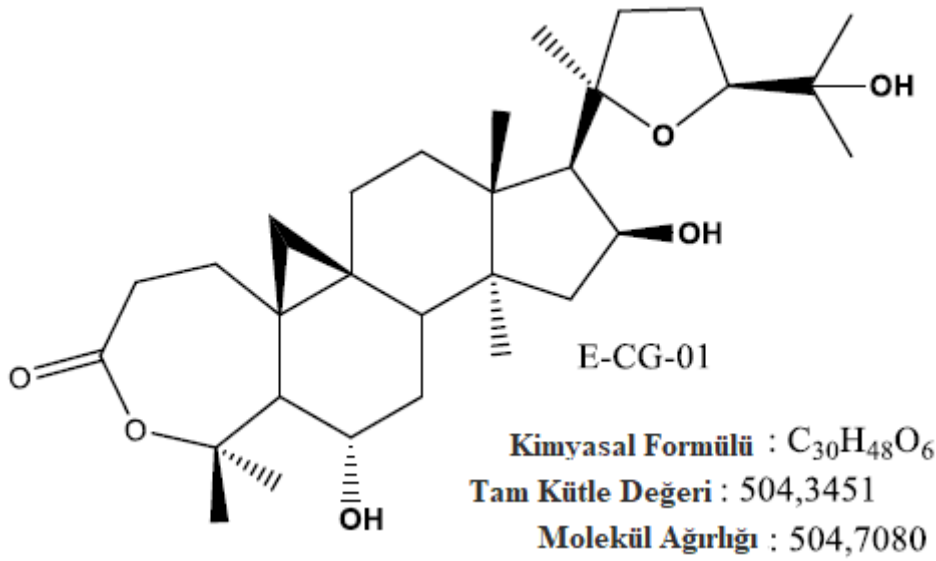
Şekil 2.8 Sikloastragenolün kaynağı ve kimyasal yapısı.

Astragaloside IV, *Astragalus* türlerinde bulunan ana bileşiklerdendir. Sikloastragenol, *Astragaloside IV* hidroliz ürünlerinden elde edilebilmektedir (Yu et al., 2018).

Biyoaktivite açısından, *Astragalus* çalışmalarındaki en önemli gelişme, bir telomeraz aktivatörü olarak, sikloastragenolün keşfi olmuştur (Duman, 2019). Sikloastragenol, insanlarda telomerazı aktive ettiği bilinen tek bileşiktir ve bu sebeple ticari olarak oldukça değerli bir moleküldür (Yu et al., 2018). Bu bileşik, Geron Biyoteknoloji şirketi tarafından patentlenmiş olup araştırmanın sponsoru olan T.A

Sciences’a lisanslanmış ve T.A Sciences tarafından TA-65 markası altında bir yaşlanma karşıtı ürün olarak gıda takviyesi pazarına girmiştir (Borrel, 2012; Harley, et al., 2010, 2011). Sikloastragenol telomeraz aktivasyonu ve telomer uzaması dışında, anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-viral, anti-bakteriyel, anti-akciğer fibrozisi, anti-iskemik ve anti-hipoksik yaralanma ve anti-lipit birikimi özellikleri dahil olmak üzere kapsamlı bir farmakolojik etkiye sahiptir (Wang et al., 2018; Yu et al., 2018)

Doğal ürünlerden elde edilen biyolojik olarak aktif moleküllerden yeni ve daha güçlü moleküller elde etmek üzere kimyasal modifikasyonlar gerçekleştirilmektedir. Mikrobiyal biyotransformasyon bu alanda enzimatik biyotransformasyona veya kimyasal reaksiyonlara göre pek çok avantaja sahiptir. Enzimlerin elde edilmesine ve saflaştırılmasına gerek duyulmaz, ayrıca kompleks moleküllerin modifikasyonu ya da kimyasal reaksiyonlarla gerçekleştirilmesi zor modifikasyonlar için nispeten kolay, ekonomik ve ekolojik olması açısından da oldukça ilgi çekicidir. Yeni saponozit/sapogenol türevlerini üretmek ve biyoaktivitelerini, biyoyararlanımlarını arttırmak amacıyla sikloastragenol gibi kompleks moleküller mikrobiyal transformasyonlara tabi tutulabilmektedir (Duman, 2019; Kuban et al., 2010). Biyotransformasyon reaksiyonları için funguslar geleneksel olarak en çok çalışılan tam hücre sistemlerinden biri olmuştur. Bitkilerde fungus, nemli iklime sahip ortamlarda ve doğal enfeksiyonla oluşur. Bitkilerde bulunan özellikle endofitik funguslar kimyasal ve ilaç biyotransformasyon işlemleri için katalizör olarak önemli bir role sahiptir (Borges et al., 2009). Bu tez çalışmasında kullanılan, IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) ismi (5aR,6aS,8aR,9R,10S,11aS,13S)-10,13-dihidroksi-9-((2R,5S)-5-(2-hidroksipropan-2-il)-2-metiltetrahidrofuran-2-il)-1,1,8a,11a-tetrametiltetradekahidro-3H,6H-siklopenta[5,6]siklopropa[1,8a]nafto[2,1-c]oksepin-3-on olan 3,4-lakto sikloastragenol olarak da bilinen E-CG-01 kodlu molekül; *Astragalus* bitkisinden elde edilen sikloastragenolün, *Astragalus angustiflorus* yaprağından elde edilen 1E4BL1 kodlu yeni keşfedilmiş *Camarosporium laburnicola* fungal izolatından biyotransformasyon ile elde edilmiştir. Sikloastragenole göre biyoaktivitesinin daha yüksek olduğu, farklı dozlarının stabil bir şekilde telomeraz aktivasyonunda 4.6-10 katlık artış sağladığı belirlenmiş ve Prof. Dr. Erdal Bedir ve ekibi tarafından ulusal-uluslararası patent başvuruları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.9. E-CG-01'in kimyasal yapısı ve formülü

2.10. *In Vivo* Akciğer Fibrozisi Modeli

Hayvanlarda akciğer fibrozisi modeli oluşturmak üzere farklı yöntemler kullanılmıştır. Denenen *in vivo* modellerin hiçbiri insan İAF'nin tüm özelliklerini sergileyememiştir. İAF ve diğer fibrotik interstisyel akciğer hastalıklarının belirgin özelliklerini ele almak için asbest tozları, silika, FITC, TGF- β gibi sitokinlerin aşırı ekspresyonunu sağlayan transgenik yaklaşımlar, radyasyon ve BLM'nin gibi pek çok metot uygulanmıştır (Liu, T. et al., 2017; Moore et al., 2013).

BLM, lenfomalar, baş-boyun skuamoz hücreli karsinomlar, testis karsinomu, yumurtalık kanseri ve malign plevral efüzyonlar gibi çeşitli neoplastik hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bir kemoterapötik ajandır. BLM, yaklaşık 1500 Da'luk, suda çözünmeyen bir glikopeptidik antibiyotiktir ve *Streptomyces verticillus* bakterisinden izole edilen spesifik bir grup glikopeptid türevi doğal ürün grubunun bir parçasıdır. Kanser tedavisinde, ağırlıklı olarak akciğer, cilt ve mukoza zarlarında BLM kaynaklı toksisite meydana gelir. Akciğerde BLM-hidrolaz enzimi çok az seviyede eksprese edildiği için en ciddi yan etki, tedavi altındaki hastaların % 46'sına kadar ortaya çıkabilecek akciğer toksisitesidir (BLM akciğer toksisitesi, BAT) (Della Latta et al., 2015; Liu, T. et al., 2017). Bu nedenle BLM'nin insanlarda kanser önleyici ajan olarak

klirik kullanımı sınırlıdır. BAT oluşumu 70 yaşından büyük hastalarda ve önceden akciğer hastalığı veya böbrek yetmezliği olanlarda daha fazla görülmektedir. BLM tedavisi gören hastalarda akciğer hacminde azalma ve interstisyel hasar görülebilmektedir. Genel olarak, HRCT göğüs taramaları, interstisyel akciğer hastalıklarını ve İİP alt grubunu karakterize eden; her iki akciğerde de retiküler opasiteler (genellikle bazal, subpleural ve periferik akciğer seviyesinde düzensiz şekilde dağılmış) olarak görünen fibrotik değişiklikleri ve tipik bal peteği durumunu göstermektedir (Della Latta et al., 2015). BLM'nin insanlarda akciğer fibrozisine yol açabileceğinin onaylanması, deneysel modellerde kullanılmasını sağlamıştır. İAF'nin birçok yönünü yeniden oluşturma kabiliyeti, iyi tekrarlanabilirlik, indüksiyon kolaylığı gibi özellikleri ve en iyi karakterize edilmiş model olması nedeniyle en yaygın şekilde kullanılan akciğer fibrozisi modeli BLM modelidir (Liu, T. et al., 2017; Moore et al., 2013). Ayrıca pirfenidon ve nintedanibin prelinik çalışmaları BLM modeli kullanarak gerçekleştirilmiştir (Liu, T. et al., 2017).

BLM ile oluşturulan İAF hastalık modellerinde fareler, sıçanlar, kobaylar, hamsterler, tavşanlar, köpekler ve primatlar dahil olmak üzere birçok hayvan kullanılmıştır, ancak patogenezi çalışmaları için en kolay kontrol edilebilir olması sebebiyle en yaygın kullanılan kemirgenler; özellikle fareler olmuştur. Ayrıca prelinik çalışmalar için insan İAF ile klinik olarak en yakın modelin yaşlı fareler olduğu belirtilmiştir (Moore et al., 2013; Tashiro et al., 2017).

BLM intratrakeal (i.t.), intraperitoneal (i.p.), subkutan, intravenöz ve inhalasyon olmak üzere birçok yöntemle uygulanabilmektedir (Moore et al., 2013). Bu uygulama yöntemlerinin kendi güçlü ve zayıf yönleri bulunmaktadır. BLM'nin i.t. yolla verilmesi en sık kullanılan uygulama yöntemidir (Aguilar et al., 2009; Degryse et al., 2010; Izbicki et al., 2002; Moore et al., 2013; Tashiro et al., 2017). İntravenöz veya i.p. enjeksiyonlar subpleural skarlaşmaya neden olurken; BLM'nin i.t. uygulanması, bronşiyosentrik fibrotik değişiklikleri, akut interstisyel ve intraalveoler inflamasyonu, makrofaj aktivasyonunu ve TNF- α , GM-CSF ve bazı interlökinlerin yukarı regülasyonunu belirler (Della Latta et al., 2015). Hücre nekrozu ve/veya apoptoz sonrası iltihaplanma ve fibrozis gelişimi meydana gelir. Sistemik olarak verildiğinde (intravenöz, i.p. veya deri altından),

ilk yaralanma bölgesi pulmoner vasküler endotelyumdur ve ilaç ancak daha sonra hasarı indüklemek için alveoler epiteline erişebilir. Buna karşılık, akciğere spesifik uygulama ile birlikte, istenildiği gibi, BLM kaynaklı primer AEC hasarı meydana getirilmektedir (Liu, T. et al., 2017; Moore et al., 2013; Vandivort et al., 2016). Uygulama yolu ne olursa olsun, BLM ile DNA tek/çift sarmalının kopması, serbest radikallerin oluşumu ve oksidatif stresin indüklenmesi sonucu doğrudan hücre hasarı meydana gelir. BLM Fe(II) ile kompleks oluşturur ancak DNA hasarı açısından bakıldığında Fe(II)'nin mi BLM-DNA kompleksine bağlandığı ya da Fe(II)-BLM kompleksinin mi DNA'ya bağlandığı bilinmemektedir. Bağlanma mekanizmasından bağımsız olarak kompleks haldeki Fe(II)'nin oksidasyonu, büyük olasılıkla süperoksit ya da hidroksil radikali tarafından DNA hasarı ile sonuçlanmaktadır (Della Latta et al., 2015; Liu, et al., 2017; Moeller et al., 2008b; Moore et al., 2013; Tashiro et al., 2017; Valko et al., 2005). BLM'nin doğrudan hava yollarına iletilmesi, cerrahi boyun kesilmesinden sonra i.t. enjeksiyon veya cerrahi olmayan i.t. intübasyon ile gerçekleştirilmektedir (Liu, et al., 2017; Moore et al., 2013; Vandivort et al., 2016). Sistemik olarak verildiğinde yüksek konsantrasyonda ve tekrarlı BLM uygulaması gerekirken i.t. uygulamada daha az konsantrasyonda tek dozda model daha ekonomik oluşturulmaktadır (Liu, et al., 2017). BLM i.t. yolla uygulandığında nispeten kısa bir sürede (i.t. modelde 2-4 hafta, sistemik uygulama modelinde ise 4-12 hafta) fibrozisi indükleyebilir (Moore et al., 2013).

BLM'ye karşı gerçekleşen yanıt farenin türüne bağlıdır. Balb/c ırkı fareler BLM'ye karşı direçli iken C57BL/6 ırkı fareler daha fazla duyarlılık gösterir. Bu sebeple akciğer fibrozisi modelinde genellikle C57BL/6 ırkı fareler kullanılmaktadır (Moore et al., 2013).

Yapılan çalışmalar, yaşlı farelerin BLM kaynaklı yaralanmalara karşı genç farelere göre daha duyarlı olduklarını göstermiştir (Hecker et al., 2014; Moore et al., 2013; Sueblinvong et al., 2012). Yaşlanmaya eğilimli farelerde, yaşlanmaya dirençli farelere kıyasla daha şiddetli fibrozis gelişimi görülmüştür (Xu et al., 2009). Fibroziste yer alan birçok hücresel süreç muhtemelen yaşlı ve genç akciğerlerde farklı şekilde işlemektedir. Bu sebeple, BLM dozu belirlenirken fare yaşı dikkate alınmalıdır (Moore et al., 2013).

İAF’de fibrozis ilerleyici iken BLM modelinde zaman içerisinde kendiliğinden fibrozis rezolüsyonu meydana gelebilmektedir. Ancak bu durumun BLM konsantrasyonuna ve fare türüne göre değişebildiği belirtilmiştir. BLM uygulamasından sonra kronik inflamasyon belirgindir ve fibrozis gelişimi için önemlidir, ancak, İAF akciğer dokusunda inflamatur hücreler oldukça az sayıdadır ve hastalık anti-inflamatuvar tedavilere yanıt vermemektedir. Bu sınırlamalara rağmen BLM modeli *in vivo* mekanizmaların aydınlatılmasında ve ilaç keşiflerinde birçok avantajı sebebiyle bu konuda en uygun deneysel model olarak kalmaya devam etmektedir (Liu, et al., 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvan deneyleri için Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2019-049 sayılı etik kurul izni alınmıştır. C57BL6/kby ırkı, dişi erkek eşit sayıda 64 fare, Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı San. Ve Tic. A.Ş.'den temin edildi. Farelerin bakımı, Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapıldı. Klimatize ve ortam ısısı uygun (20-22 °C, nispi nem oranı % 30-45), 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık rejimine uygun bir ortam, ticari pelet yem ve *ad-libitum* su sağlandı. Uygun saklama kafesleri yine Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden tahsis edildi.

Bu çalışma kapsamında BLM ile oluşturulan fare akciğer fibrozisi modelinde etkisi araştırılan, Prof. Dr. Erdal Bedir ve ekibi tarafından ulusal ve uluslararası patent başvuruları gerçekleştirilmiş E-CG-01 molekülü İYTE Biyomühendislik Bölümü Doğal Ürün Kimyası Laboratuvarı'ndan temin edildi.

Ötenaziden sonra elde edilen örneklerin histolojik analizleri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD Laboratuvarı'nda, biyokimyasal analizler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD Laboratuvarı'nda, moleküler biyoloji analizleri ise Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya AD Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Çalışma Tasarımı

Çalışmada 13-14 haftalık C57BL6/kby ırkı dişi erkek karışık toplamda 57 fare kullanıldı. İ.t. olarak sadece serum fizyolojik (SF) uygulanan ve i.t. olarak sadece BLM uygulanan (fare akciğer fibrozisi modeli) kontrol grupları oluşturuldu. Bu denekler BLM ya da SF verildikten sonra 26. günde sakrifiye edildi.

Düşük, ara ve yüksek dozda verilen molekülün ve DMSO'nun akciğer üzerindeki etkisinin incelenmesi için de kontrol grupları oluşturuldu. BLM verilmeyen bu gruptaki

deneklere 14 gün boyunca molekül ya da DMSO i.p. olarak uygulandı ve denekler 29. günde sakrifiye edildi.

3 farklı dozdaki molekül, BLM verilmeden 3 gün önceden i.p. olarak uygulanmaya başlandı ve bu denekler i.t. BLM uygulandıktan sonra 26. günde sakrifiye edildi.

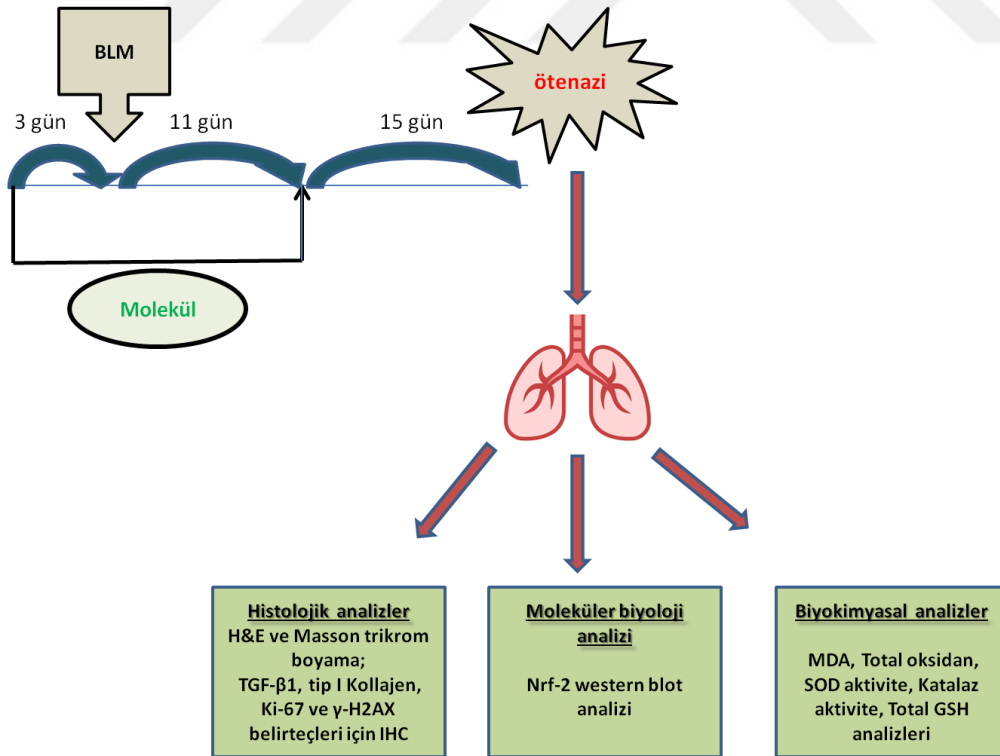
Deney grupları Tablo 3.1’de, çalışma planı ve yapılacak analizlerin özeti Şekil 3.2 ile sunuldu.

Tablo 3.1 Deney grubu planı

Deney Grupları	
1.	SF
2.	BLM
3.	DMSO
4.	2 mg/kg/gün Molekül : Düşük Doz E-CG-01 (D-Kontrol)
5.	6 mg/kg/gün Molekül : Ara Doz E-CG-01 (A-Kontrol)
6.	10 mg/kg/gün Molekül : Yüksek Doz E-CG-01 (Y-Kontrol)
7.	2 mg/kg/gün Molekül+BLM : Düşük Doz E-CG-01 + BLM (D-BLM)
8.	6 mg/kg/gün Molekül+BLM : Ara Doz E-CG-01 + BLM (A-BLM)
9.	10mg/kg/gün Molekül+BLM : Yüksek Doz E-CG-01 + BLM (Y-BLM)



Şekil 3.1 Farelerin kafeslerde deney gruplarına göre ayrılması



Şekil 3.2 Deneysel tasarımın şematik gösterimi

3.2. Fare Akciğer Fibrozis Modelinin Oluşturulması

3.2.1. Gereçler

- BLM (BioVision, 2246)
- SF
- PBS (Sigma, P4417)
- İnsülin enjektörü
- Gavaj iğnesi (Fine Scientific Tools 18061-50).

3.2.2. Yöntem

BLM (BioVision, 2246-10), BSC-2 kabininde hazırlandı. 2,1 mg liyofilize BLM sülfat 2,1 mL PBS içinde homojenize edilerek stok BLM çözeltisi elde edildi (Vandivort et al., 2016). Çözelti alikotlanarak -20 °C'de muhafaza edildi. Buz üzerinde 2 saat öncesinden çözdürüldü ve instilasyondan önce BLM çözeltisi oda sıcaklığına getirildi (Stevens et al., 2018). Farelere uygulamak üzere stok solüsyondan 2.5 U/kg vücut ağırlığı biriminde (Chu et al., 2017; Désogère et al., 2017b; Tashiro et al., 2017) olacak şekilde seyreltme yapıldı.

BLM içeren şırıngaya gavaj iğnesi takıldı. BLM farelere i.t. olarak gavaj iğnesi yardımıyla uygulandı. Akciğer hasarı BLM'nin tek dozu ile (2.5 U/kg) indüklendi. Gavaj iğnesi çıkarıldıktan sonra fare kafesine alındı ve hareket edene kadar gözlemlendi.



Şekil 3.3 Gavaj iğnesi



Şekil 3.4 BLM ve SF'in gavaj iğnesi yardımıyla farelere i.t. uygulanması

3.3. E-CG-01 Molekülünün Uygulanması

IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) ismi (5aR,6aS,8aR,9R,10S,11aS,13S)-10,13-dihidroksi-9-((2R,5S)-5-(2-hidroksipropan-2-il)-2-metiltetrahidrofuran-2-il)-1,1,8a,11a-tetrametiltetradekahidro-3H,6H-siklopenta[5,6]siklopropa[1,8a]nafto[2,1-c]oksepin-3-on olan E-CG-01 kodlu molekül, 125 mg/mL konsantrasyonda DMSO içinde çözündürülerek alikotlandı. -20 °C'de saklandı. Salin ile elde edilen stok solüsyondan seyreltmeler yapılarak farelere 2 mg/kg/gün, 6 mg/kg/gün ve 10 mg/kg/gün dozlarında 14 gün boyunca 5 mL/kg vücut ağırlığı hacminde i.p. olarak uygulandı. Kontrol grubu olarak %1,6 DMSO uygulandı.

3.4. Farelerin Günlük Kilo Takibi

Farelerin sağlık durumları - kilo kaybı, tüy görünümü, yürüme bozukluğu, vs. açısından - günlük olarak takip edildi.



Şekil 3.5 Farelerin tartımı.

3.5. Akciğer Ağırlıklarının İncelenmesi

Torakotomi sonrası akciğerler toplandı ve ıslak ağırlığı belirlemek için distile su ile kandan arındırılıp peçete üzerinde kurutulduktan sonra hemen tartıldı. Kontrol gruplarına göre karşılaştırma yapıldı.

3.6. Histolojik Takip ve Analizler

3.6.1. Akciğerlerin histolojik analizler için toplanması

3.6.1.1 Gereçler

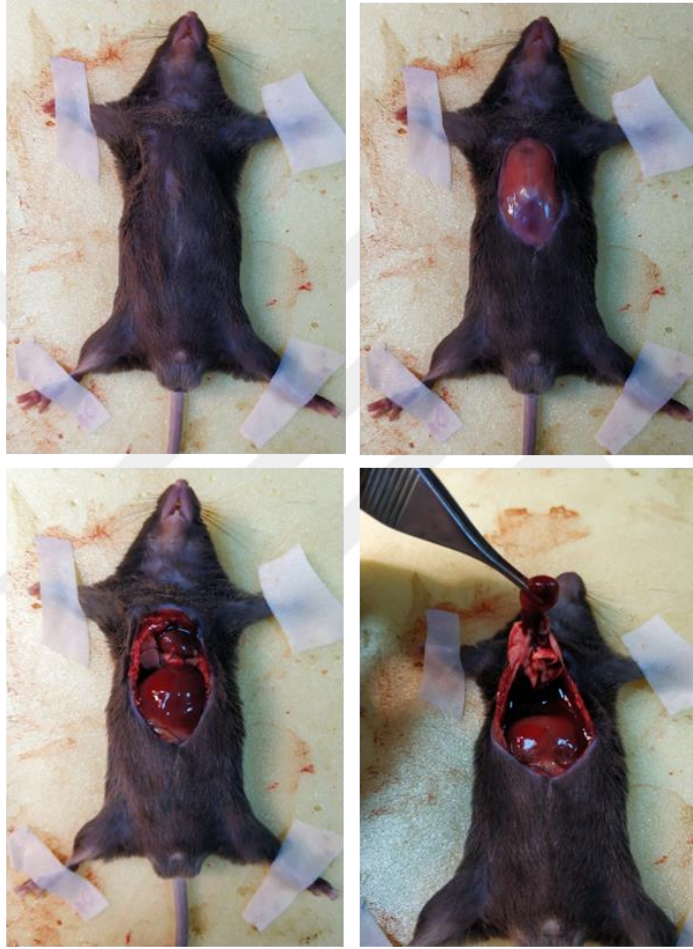
Pens, makas, distile su, %4 paraformaldehit (PFA) (önerilen 15-20:1 hacim: doku oranı korumanacak hacimde kullanıldı).

3.6.1.2. Yöntem

%4'lük PFA hazırlamak için 40 gr PFA (Merck, 1.04005.1000) 1 litre PBS içerisinde, 55-60 °C'de, çeker ocakta karıştırılarak çözüldü. 1N NaOH ile pH'ı 7,0'ye getirildi. Soğuyan PFA filtre kâğıdı ile süzüldü.

% 4 PFA içeren kaplar tüm tanımlama parametreleri (deney grubu, fare kimlik numarası, doku adı ve tarih) ile etiketlendi (Örneğin; SF, 1. Dişi, Akciğer, 01.09.2020).

Vücut ağırlıkları kaydedilen farelere ketamin/ksilazin derin anestezisi altında ötenazi yapıldı. Daha sonra fareler dorsal yaslanma pozisyonunda disseksiyon yapılan yere sabitlendi.



Şekil 3.6 Disseksiyon

Sternum üzerindeki cilt forseps ile tutuldu ve ventral orta hatta bir ilk insizyon yapıldı. İnsizyon ventral orta hat boyunca kranal ve kaudal olarak sürdürüldü. Deri, ventral torakstan karın bölgesine uzanan ventral orta hat insizyonunda bilateral olarak hafifçe açıldı. Periton boşluğunu ve ksifoid processini ortaya çıkarmak için karın içine ventral bir orta hat kesisi yapıldı. Ksifoid process forseps ile tutuldu. Makas ile göğüs kafesi ortadan kesilip kranal olarak geri çekilip çıkarıldı. Tüm göğüs boşluğu açığa çıkarıldı. Kesim sırasında akciğerlere hasar vermemeye dikkat edildi. Kalp ve diğer organ

dokuları trake ve akciğerlerden ayrıldı. Akciğerlerden kan distile su ile temizlendikten sonra %4 PFA içeren etiketlenmiş kaplara alındı.

3.6.2. Histolojik takip ve gömme

3.6.2.1. Gereçler

- PBS (Sigma, P4417)
- Etanol (Carlo Erba, 414609)
- Ksilol (Tekkim, TK090270.02500)
- Parafin (Tekkim, TK20066105004)
- Doku takip kasetleri, kurşun kalem, pens

3.6.2.2. Yöntem

5-6 gün PFA'da +4 °C'de bekletilen akciğerler 1 gün PBS'te, ertesi gün taze PBS'te bekletilerek fiksatifin dokulardan uzaklaşması sağlandı Daha sonra akciğer dokuları aşağıda belirtilen rutin histolojik doku takibine alındı.

Tablo 3.2 Histolojik doku takibinde uygulanan işlemler

	İşlem	Süre	Amaç
1	% 80 etil alkol	60 dk	Dehidratasyon
2	% 95 etil alkol	60 dk	
3	% 100 etil alkol	60 dk	
4	% 100 etil alkol	60 dk	
5	% 100 etil alkol	40 dk	
6	Oda sıcaklığında beklet	Kuruyana kadar	Kurutma
7	Ksilol	Gözle takip	Şeffaflaştırma
8	58-60°C'lik etüvde erimiş parafin I	30 dk	Parafinizasyon
9	Parafin II (gömme kalıbında)	30 dk	Bloklama
10	Oda sıcaklığında beklet	4 saat	Soğutma
11	+4 °C	Kesit alma işlemine kadar	Saklama

3.6.3. Kesit alma

Leica RM 2145 markalı mikrotomda 5 μ 'luk kesitler alındı. Kesitlerin 37°C'lik su banyosunda açılması sağlandı. Parafin eriyip düzleşince, doku açılınca etiketlenmiş polilizinli lamaların üzerine alındı. Suyu akıtıldı. Lamalar kurumaya bırakıldı. Dokunun iyice yapışmasını sağlamak için 60°C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Sonrasında oda sıcaklığında soğutuldu. Boyama işlemine kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi. Preparatlar boyama öncesinde 1 gün (24 saat) ksilol içinde bekletildi.

3.6.4. Histokimyasal boyama

3.6.4.1. H&E boyama için kullanılan gereçler ve uygulanan yöntem

- Asit alkol malzemeleri (100 mL%70'lik alkol, 10 mL HCl)
- Amonyaklı su (1-2 mL NH₃, 100 mL distile su)
- Harris Hematoksilen solüsyonu (Bio-optica, 0506002)
- Eozin (Bio-optica, 0510002)
- Entellan (Merck, M1079610500)
- Etanol
- Distile su

24 saat ksilol içinde bekletilip parafinden arındırılan preparatlar kuruduktan hemen sonra Tablo 3.3' te yer alan basamaklar takip edilerek boyandı.

Tablo 3.3 H&E boyama işlem basamakları

	İşlem	Süre
1	% 100 etil alkol	2 dk
2	% 100 etil alkol	2 dk
3	% 95 etil alkol	2 dk
4	% 80 etil alkol	2 dk
5	Distile su	4 dk
6	Hematoksilen	3 dk
7	Akarsu	Daldırılıp çıkarıldı
8	Asit alkol	Pembe rengini alana kadar (mikroskopik gözlem)
9	Akarsu	Daldırılıp çıkarıldı
10	Amonyaklı su	Mor renk oluşana kadar
11	Akarsu	Daldırılıp çıkarıldı
12	Distile su	1 dk
13	Eozin	2,5 dk
14	% 95 etil alkol	Daldırılıp çıkarıldı
15	% 100 etil alkol	Daldırılıp çıkarıldı
16	% 100 etil alkol	Daldırılıp çıkarıldı
17	Preparatlar iyice kurutuldu	
18	Ksilol	15 dk
19	Ksilol ile muamele edildikten sonra boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı. Görüntülemeye hazır hale getirildi.	

3.6.4.2. Masson Trikrom boyamada kullanılan gereçler ve yöntem

- Etil Alkol
- Distile su
- Ksilol
- Masson Trikrom boyama kiti (Bio-Optica, 04-011802)

Ksilol içerisinde 1 gün boyunca parafinden arındırılan preparatların Masson Trikrom boyama işlemi için Bio-Optica (BO 04-010802) kit protokolü (Tablo 3.4) uygulanmıştır.

Tablo 3.4 Masson trikrom boyamada uygulanan işlem basamakları

	İşlem	Süre
1	%100 etil alkol	2 dk
2	%95 etil alkol	2 dk
3	%80 etil alkol	2 dk
4	A ve B reaktiflerinden (Weigert demir hematoxilen boyası- 6'şar damla	10 dk
5	Boya süzüldü	
6	C reaktifinden (alkollü pikrik asit solüsyonu)- 10'ar damla	4 dk
7	Distile su	Daldır çıkar
8	D reaktifinden (Mallory'ye göre Ponceau asit fuksin)- 10'ar damla	4 dk
9	Distile su	Daldır çıkar
10	E reaktifinden (Fosfomolibdik asit çözeltisi)10'ar damla	10 dk
11	Boya süzüldü	
12	F reaktifinden (Masson aniline blue) 10'ar damla	5 dk
13	Distile su	Daldır çıkar
18	%80 Alkol	Daldır çıkar
19	%95 Alkol	Daldır çıkar
20	%100 Alkol	2 dk
21	Ksilol	20-40 dk
22	Ksilol ile muamele edildikten sonra boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatılarak görüntülemeye hazır hale getirildi.	



Şekil 3.7 Masson Trikrom boyama için çalışma düzeneği

3.6.4.3. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan gereç ve yöntemler

- Anti-TGF- β 1 (Bioss, BS-0086R)
- Anti- γ -H2AX (Bioss, BS-3185R)
- Anti-Ki-67 (Bioss, BS-2130R)
- SensiTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack (ScyTek, SHP125)
- Mayer's hematoxilen solüsyonu (Bio-Optica, 05-06002/L.)
- DAB (3,3-diaminobenzidine) substrat kiti (Abcam, ab64238)
- Pap-pen (Sigma, Z672548-1EA)

Parafinden arındırılan preparatların immünohistokimyasal boyama işlemi için Tablo 3.5'te belirtilen protokol uygulanmıştır.

Tablo 3.5 İmmunohistokimyasal boyamalarda uygulanan işlem basamakları

	İşlem	Süre
1	%100 etil alkol	2 dk
2	%100 etil alkol	2 dk
3	%95 etil alkol	2 dk
4	%80 etil alkol	2 dk
5	Distile su	3 dk
6	Sitrat tamponu (pH: 6.0) (90°C mikrodalga fırında)	30 dk
7	Soğuk su banyosu	20 dk (Preparatlar soğuyana kadar)
8	Distile su	5 dk
9	PBS ile hazırlanan %0.1'lik Triton X solüsyonu	5 dk
10	Metanol ile hazırlanan %3'lük H ₂ O ₂ 'de	10 dk
11	PBS	2 dk (Bu işlem 3 kez tekrar edildi)
12	Dokuların çevresi PAP pen ile sınırlandırıldı.	
13	Serum bloklama solüsyonu	30 dk
14	Primer antikor (Anti- TGF- β 1, tip I kollajen, γ -H2AX ve Ki-67 ile +4 °C'de)	Gece boyunca
15	PBS	2 dk (Bu işlem 3 kez tekrar edildi)
16	Biyotinlenmiş sekonder antikor (oda sıcaklığında)	30 dk
17	PBS	2 dk (Bu işlem 3 kez tekrar edildi)
18	HRP streptoavidin	30 dk
19	PBS	2 dk (Bu işlem 3 kez tekrar edildi)
20	DAB (3,3-diaminobenzidine) peroksidaz substrat solüsyonu	5-10 dk (mikroskopik gözlem)
21	Distile su	3 dk
22	Mayer's Hematoksilen	1 dk
23	Çeşme suyu	5 dk
24	Distile su	1-2 kez daldırıp çıkarma
25	% 95 etil alkol	1-2 kez daldırıp çıkarma
26	% 100 etil alkol	1-2 kez daldırıp çıkarma
27	% 100 etil alkol	1-2 kez daldırıp çıkarma
28	Ksilol (şeffaflaştırma)	2 dk (Bu işlem 3 kez tekrar edildi.)
29	Ksilol ile muamele edildikten sonra boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı. Görüntülemeye hazır hale getirildi.	

3.7. Doku Homojenizasyonu

3.7.1. Nrf2 western blot analizinde kullanılacak lizatların hazırlanması

Dokulardan ekstraktların elde edilmesinde NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kiti (Thermo, 78835) kullanıldı. Bu kitin talimatlarına göre uygulanan işlemler aşağıda belirtilmiştir.

1. Sitoplazmik ekstraksiyon ajanı I (CER I) ve nükleer ekstraksiyon ajanını (NER) kullanmadan hemen önce içerisine proteaz inhibitörü stok solüsyonundan (25x) (Roche, 04693116001), talimata uygun şekilde bu ajanları - konsantrasyonları kritik olduğu için - %5'ten fazla seyreltmeyecek şekilde eklendi.
2. Doku örnekleri PBS ile yıkandı. 500 g'de 5 dk santrifüjlendi. PBS dokudan uzaklaştırıldı.
3. CER I uygun hacmi pellet üzerine ilave edildikten sonra problu sonikatörde doku mekanik olarak parçalandı. Reaktiflerin hacimleri Tablo 3.6'da belirtilen şekilde uygulandı.
4. Doku homejenatı hazırlandıktan sonra sitoplazmik ve nükleer protein ekstraksiyonunu gerçekleştirmek üzere ilk olarak pelleti süspanse hale getirmek için, tüp 15 saniye boyunca en yüksek ayarda vortekslendi. 10 dk boyunca buz üzerinde inkübe edildi.
5. Tüp içerisine buz soğukluğunda Sitoplazmik ekstraksiyon ajanı II (CER II) ilave edildi.
6. En yüksek ayarda 5 saniye vortekslendi. Buz üzerinde 1 dk inkübe edildi.
7. En yüksek ayarda 5 saniye vortekslendi. Maksimum hızda 30 dk santrifüj edildi.
8. Süpernatant (sitoplazmik ekstrakt) yeni bir tüpe aktarıldı ve -80 °C'ye kaldırıldı.
9. Elde edilen (nükleusu içeren) pellet NER içerisinde süspanse edildi. 15 saniye boyunca vortekslendi.
10. Örnekler buz üzerine yerleştirildi. Örnekler 40 dk boyunca her 10 dk'da bir 15 saniye vortekslendi.
11. Maksimum hızda 20 dk boyunca santrifüjlendi.

12. Süpernatant (nükleer ekstrakt) hemen yeni bir tüpe aktarıldı.
13. Ekstraktlar -80 °C'ye kaldırıldı.

Tablo 3.6 Doku miktarına göre reaktif hacimleri.

Doku Ağırlığı (mg)	CER I (µL)	CER II(µL)	NER (µL)
20	200	11	100

3.7.2. Biyokimya analizlerinde kullanılacak lizatların hazırlanması

Total oksidan seviyesinin (TOS) ölçümü ve süperoksit dismutaz (SOD) analizi için homojenizasyon: Doku örnekleri 300 µL 1x PBS (Sigma, P5493) içinde homojenizatör yardımıyla mekanik parçalama yoluyla homojenize edildi.

MDA analizi için homojenizasyon: Doku örnekleri buz üzerinde 300 µL MDA lizis tamponunda (3 µL BHT solüsyonu içeren) homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Çözünmeyen materyalleri uzaklaştırmak için 13000 g'de 10 dk santrifüjlendi.

GSH analizi için doku homejenizasyonu: Dokular 300 µL GSH reaksiyon tamponunda homojenize edildi. 100 µL % 5'lik SSA eklendi ve iyice karıştırıldı. 10 dakika 8000 g'de santrifüjlendi. Süpernatant analiz için mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

Katalaz aktivite analizi için homojenizasyon: Doku parçaları buz üzerinde soğuk 200 µL Assay tamponunda homojenizatörde homojenize edildi. 4 °C'de 15 dk 10000 g'de santrifüj edildi. Süpernatantlar toplanıp buz üzerinde bekletildi.

3.8. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi (Bikinkonik Asit Yöntemi)

Doku homojenizasyonu sonrası elde edilen lizatlardaki protein miktarı Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23225) ile belirlendi. BCA Protein Assay, total proteinin kolorimetrik olarak tayini için bikinkoninik asit (BCA) yöntemine

dayanmaktadır. Bu metotta, alkali ortamda protein aracılığıyla Cu^{+2} , Cu^{+1} 'e indirgenmektedir. İndirgenen bu bakır katyonuna yüksek duyarlılık gösteren bikinkoninik asidin iki molekülünün bir bakır iyonu ile şelasyonu sonucu mor renkli reaksiyon ürünü oluşmaktadır. Suda çözünabilir kompleks, geniş çalışma aralığında (20-2000 $\mu\text{g/mL}$), artan protein konsantrasyonları ile 562 nm'de lineer absorbans göstermektedir.

Protein konsantrasyonları, kitte belirtilen aşağıdaki protokol takip edilerek sıgır serum albümin (BSA) standardından elde edilen kalibrasyon eğrisi denklemi ile belirlendi.

Kalibrasyon eğrisi için 0, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda BSA standartları hazırlandı.

Kitte belirtilen çalışma solüsyonu hazırlandı. 25'er μL mikropyletlere aktarılmış olan örnek ve standartlara 200 μL çalışma solüsyonu eklendi.

37 °C'de 30 dk inkübe edildi. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra absorbanslar **VersaMax** mikropilaka cihazında 562 nm'de okutuldu.



Şekil 3.8 BCA protein tayini için çalışma düzeneği

3.9. Biyokimyasal Analizler

3.9.1. TOS ölçümü

Canlı sistemlerde metabolik ve fizyolojik proseslerde üretilen serbest radikaller ve diğer ROS ve RNS zararlı oksidatif reaksiyonlar meydana getirerek oksidatif hasara ve doku işlev bozukluğuna neden olabilirler. Bazı durumlarda, oksidanlardaki artış ve antioksidanlardaki azalma önlenemez (Meo et al., 2016). Dokunun toplam oksidan stres düzeyi ticari kit (Rel Assay, RL0024) yardımı ile spektrofotometrik olarak yapıldı. Analiz prensibine göre örnekte bulunan oksidanlar, Fe (II) iyon-şelatlayıcı kompleksini Fe (III) iyonuna yükseltir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan güçlendirici moleküller tarafından uzatılır. Fe (III) iyonu asidik bir ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrede ölçülen renk yoğunluğu, örnekte bulunan total oksidan miktarıyla ilişkilidir. Deney H_2O_2 ile kalibre edilir ve sonuçlar litre başına mikromol H_2O_2 eşdeğeri olarak ifade edilir.

Homojenizasyonları yapılan doku örneklerinden elde edilen lizatlardan ve standartlardan (5,10 ve 20 $\mu\text{mol/L}$) mikroyet 25'er μL alınıp üzerine 150 μL Reagent 1 (25 mM H_2SO_4) ilave edildi. İyice karıştırdıktan 30 saniye sonra absorbens (A1) 530 nm dalga boyunda okutuldu.

8 μL Reagent 2 (25 mM H_2SO_4 , 5 mM Fe^{+2} iyonu, 10nM O-dianisidin) eklendi. 37 °C'de 5 dk bekletildi veya oda sıcaklığında 10 dk bekletildi ve absorbens (A2), 530 nm dalga boyunda tekrar okutuldu.

Aşağıdaki denkleme göre sonuçlar hesaplandı.

$$A2-A1=\Delta\text{Abs}$$

$$\text{Sonuç} = \frac{\Delta\text{Abs (örnek)}}{\Delta\text{Abs (standart)}} \times 10 *$$

*Standardın konsantrasyonu



Şekil 3.9 TOS ölçümü için çalışma düzeneği.

3.9.2. SOD aktivite analizi

SOD en önemli antioksidatif enzimlerden biridir. Süperoksit anyonunun H_2O_2 ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalize eder. Hassas SOD test kiti, süperoksit anyonu ile indirgenmesi üzerine suda çözünür bir formazan boyası üreten WST-1 kullanır. Bir süperoksit anyonu ile indirgenme oranı ksantin oksidaz (XO) aktivitesi ile doğrusal olarak ilişkilidir ve SOD tarafından inhibe edilir. Böylece SOD'un inhibisyon aktivitesi bir kolorimetrik yöntemle belirlenebilir. SOD aktivitesi ticari kit (Biovision, K335) yardımıyla test edildi.

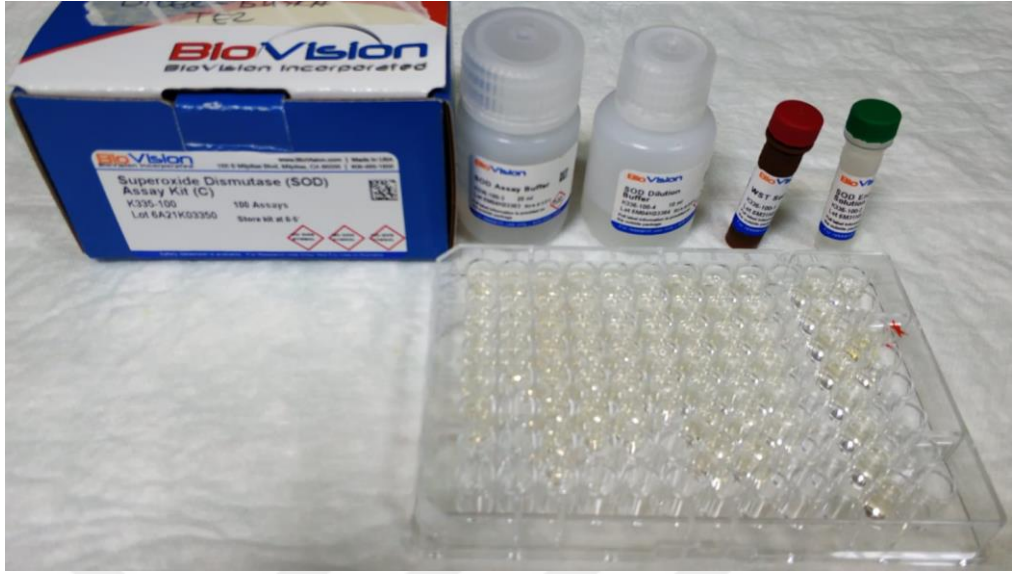
Doku homojenatları $4^{\circ}C$ 'de 5 dakika boyunca $14000\ g$ 'de santrifüjlendi. Süpernatant, sitosolik ve mitokondrilerden toplam SOD aktivitesini içerir. Analiz için kuyucuklara yüklenen solüsyon miktarları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3.7 SOD analizinde kullanılan çözelti miktarları

	Örnek	Kör 1	Kör 2	Kör 3
Örnek	20 μL		20 μL	
ddH ₂ O		20 μL		20 μL
WST çalışma solüsyonu	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
Enzim çalışma solüsyonu	20 μL	20 μL		
Seyreltme tamponu			20 μL	20 μL

Pleyt $37^{\circ}C$ 'de 20 dk inkübe edildi. 450 nm dalga boyunda absorbanlar okutuldu. SOD aktivitesi (% inhibisyon oranı) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$SOD\ aktivitesi = \frac{(Abs\ Kör1 - Abs\ Kör3) - (Abs\ örnek - Abs\ Kör2)}{(Abs\ Kör1 - Abs\ Kör3)} \times 100$$



Şekil 3.10 SOD aktivite analizi için çalışma düzeneği

3.9.3. Lipid peroksid düzeyinin ölçümü

Patofizyolojik süreçlerde oksidatif stresi değerlendirmek için yağların oksijen ile yükseltgenmesi sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun ölçülmesi önemlidir. Lipid peroksid düzeyi, ticari kit (BioVision, K739-100) kullanarak Uchiyama ve Mihara (1978) yöntemiyle belirlendi. Lipid peroksidasyonu, doğal yan ürünler olarak MDA ve 4 hidroksinonenal (4-HNE) oluşturur. Lipid peroksidasyonunun son ürünleri, oksidatif hasarı ölçmek amacıyla hedeflenir. Bu kit MDA'nın hassas tespiti için kullanılmaktadır. MDA moleküllerinin her biri pH:2-3 değerindeki 2 molekül TBA ile tepkimeye girer ve pembe renkte kromojen oluşturur. Bu yöntemde kromojenin 532-535 nm dalga boyunda verdiği absorpsiyon spektrofotometrik olarak değerlendirilir ve aynı koşullarda çalışılan standart ile kıyaslanarak MDA konsantrasyonu bulunur.

MDA standart eğrisi elde etmek üzere bu stoktan seri seyreltmeler yapılarak 0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 nM MDA standardı hazırlandı.

Her standart ve doku homojenatından 200 μ L ısıya dayanıklı cam tüplere aktarıldı. 600 μ L buz soğukluğundaki TBA eklenerek protein presipitasyonu yapıldı. Tüpler etüvde 95 °C'de 1 saat inkübe edildi ve sonrasında çeşme suyu altında soğutuldu.

200'er μ L'si 96 gözlü mikroyellere alınan standart ve örneklerin absorbans değerleri 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutuldu.



Şekil 3.11 MDA analizi çalışma düzeneği

3.9.4. GSH analizi

GSH, memeli hücrelerinde oksidatif strese karşı hücrel savunmada kritik bir rol oynayan hücre içi antioksidan özellikte tiyoldür (Kurutas, 2016). Deney, DTNB ve GSH redüktaz tarafından GSH geri dönüşüm sistemine dayanmaktadır. DTNB ve GSH reaksiyon ürünü olan 2-nitro-5-tiyobenzoik asit sarı renk oluşturur. Bu sayede GSH konsantrasyonu, 412 nm'de absorbanı ölçülerek belirlenebilmektedir. Yan ürün olan GSSG, GSH redüktaz ile GSH'ye indirgenebilmektedir ve GSH daha fazla 2-nitro-5-tiyobenzoik asit üretmek için DTNB ile tekrar reaksiyona girer. Bu nedenle, geri dönüşüm sistemi toplam GSH tespitinin hassasiyetini önemli ölçüde artırır. Kit; proteinlerin örneklerden uzaklaştırılması için, GSH oksidasyonunun ve γ -glutamil transpeptidaz reaksiyonunun oluşmaması için 5-Sülfosalisilik asit (SSA) içerir. GSH seviyesi ticari kit (Biovision, K261) yardımıyla ölçülecektir.

Kit içeriği aşağıdaki gibidir:

- GSH reaksiyon tamponu
- GSH substratı (DTNB)
- NADPH üreten karışım
- GSH redüktaz
- SSA
- GSH standardı

Standart eğri oluşturmak üzere, her etiketli mikrosantrifüj tüpüne 1 µg/µL konsantrasyondaki GSH standardından %1 SSA ile 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 ng/µL konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı.

Test edilecek standart ve örnekler için yeterli reaksiyon karışımı hazırlandı:

10 µL NADPH üreten karışım

10 µL GSH redüktaz*

60 veya 70 µL GSH reaksiyon tamponu

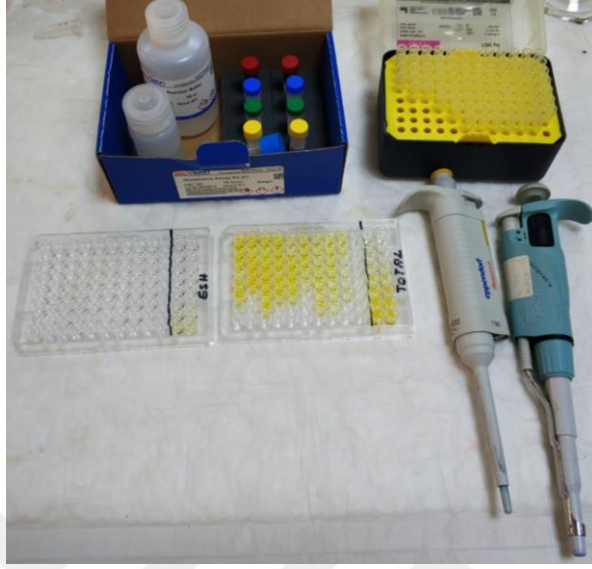
* Yalnızca indirgenmiş GSH formunu tespit etmek için Glutasyon Redüktaz çıkarıldı. 10 µl GSH redüktaz yerine 10 µl GSH reaksiyon tamponu kullanıldı.

Her kuyucuğa 80 µL reaksiyon karışımı eklendi ve NADPH oluşturmak için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. GSH standart çözeltilerine ve örnek çözeltilerine 10 µL eklendi. 5-10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

10 µL substrat çözeltisi eklendi ve örnekler oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edildi. 405 nm absorbansı okutuldu. Standart eğriye göre GSH konsantrasyonları hesaplandı.

Total GSH aşağıdaki denklem üzerinden belirlendi.

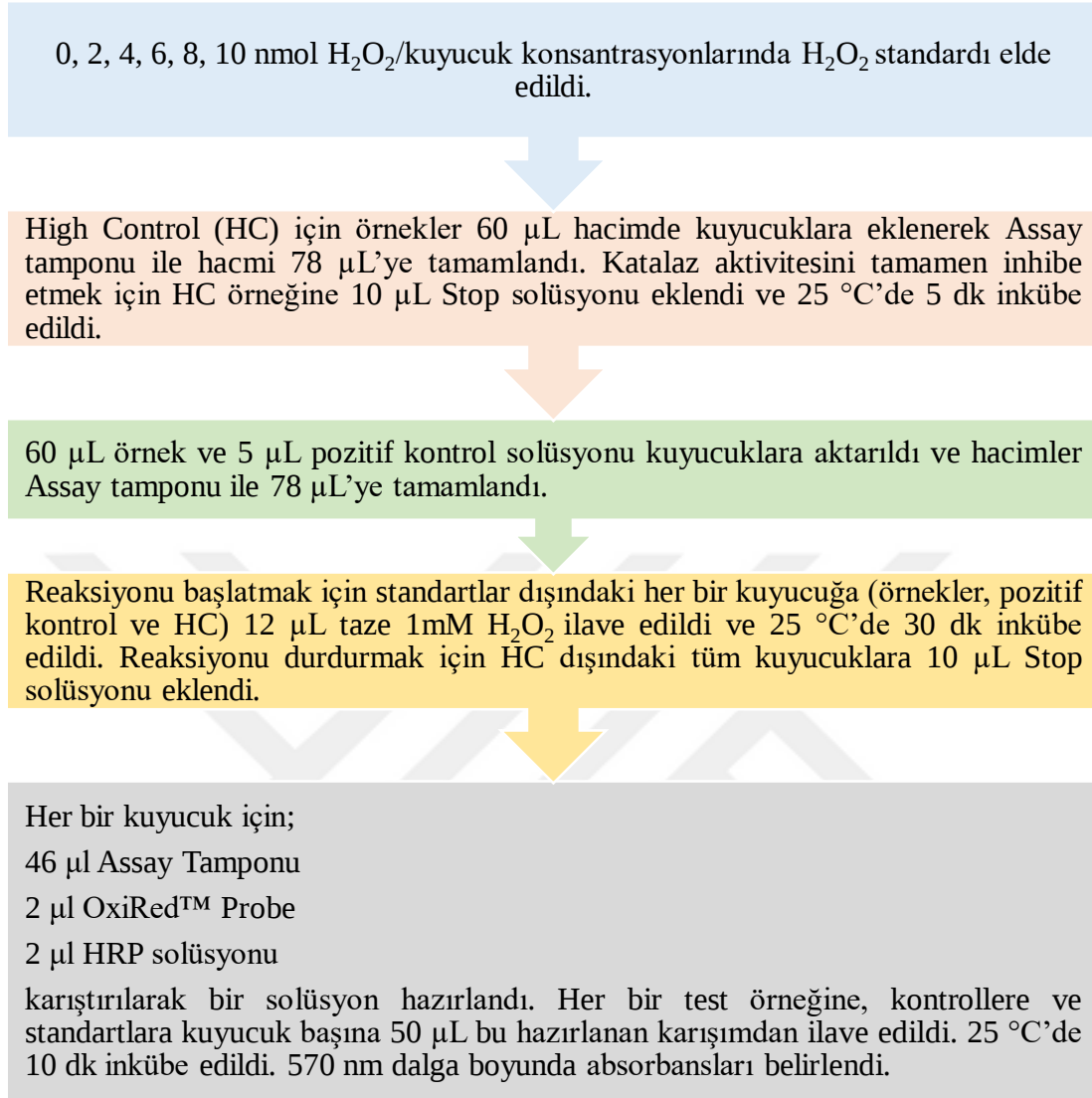
$$\text{Total GSH} = (\text{Abs}_{\text{örnek}} - \text{Abs}_{\text{kör}}) / \text{Standar eğri eğimi}$$



Şekil 3.12 GSH analizi için çalışma düzeneği

3.9.5. Katalaz aktivite analizi

Katalaz, hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunan bir ubikuitöz antioksidan enzimdir. H_2O_2 'nin suya ve oksijene dekompozisyonunu katalize etme işlevi görür (Odaşima et al., 2010). Katalaz aktivitesi ticari kit (Biovision, K773) yardımıyla belirlendi. Analizde, katalaz ilk önce su ve oksijen üretmek için H_2O_2 ile reaksiyona girer, dönüştürülmemiş H_2O_2 , 570 nm'de ölçülebilen bir ürün üretmek için OxiRed™ prob ile reaksiyona girer. Katalaz aktivitesi sinyal ile ters orantılıdır.



Sonuçlar aşağıdaki gibi hesaplandı.

Örnekteki katalaz tarafından (ayrıştırılan H₂O₂) meydana getirilen sinyal değişimi:

$$\Delta A = A_{HC} - A_{\text{örnek}}$$

$$\text{katalaz aktivitesi} = \frac{B}{30 \times V} \times \text{örnek seyreltme faktörü} = \text{nmol/}$$

$$dk/mL = mU/mL$$

A_{HC} : 30 dk reaksiyon gerçekleştirildikten sonra HC için elde edilen absorbens değeri

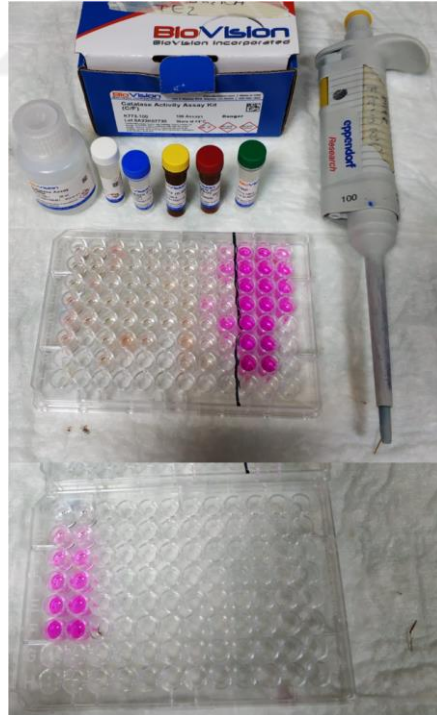
$A_{\text{örnek}}$: 30 dk reaksiyon gerçekleştirildikten sonra örnekler için elde edilen absorbens değeri

B: standart eğri denkleminde absorbenslara karşılık elde edilen nmol cinsinden H_2O_2 değeri

V: son durumda kuyucuktaki örnek hacimleri (60 μL)

30: reaksiyon süresi (dk)

U (ünite) birimi: Bir U katalaz, 25 °C ve pH 4.5'te dakikada 1.0 $\mu mol H_2O_2$ ayrıştıran katalaz miktarıdır.



Şekil 3.13 Katalaz aktivite analizi için çalışma düzeneği

3.10. Moleküler Biyoloji Analizi - İmmunoblotlama (Western Blot)

3.10.1. Gereçler

- Nrf2 antikoru (Bioss-USA, bsm-52179R)
- Sodyum deoksikolat (Sigma, D6750)
- Trizma base (Sigma, T1503)
- Amonyum peroksidisülfat (Merck, 101200.1000)
- Glisin (Merck 104201)
- Disodyum hidrojen fosfat (Merck, 106586.0500)
- Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat (Merck, 106346.1000)
- Skim milk (Bioshop Canada, SKI400.500)
- Sodyum klorür (Merck, 106400.5000)
- PVDF membran (Millipore, IPVH00010)
- Tween 20 (Merck, 822184.0500)
- Sodyum dodesil sülfat (Sigma, L3771)

3.10.2. Yöntem

3.10.2.1 Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması

Jel dökme aparatı kuruldu. %8 konsantrasyonda ayırma jeli hazırlandı. Amonyum persülfat ilavesi ile polimerizasyon işlemi başlatılarak aparattaki iki cam arasına döküldü. Ayırma jelinin polimerizasyonu gerçekleştikten sonra jelin üst bölümü dH₂O ile yıkandı. Ayırma jelinin üzerine hazırlanan yığınlama jeli döküldü. Jelin üzerine kuyucukların oluşumunu sağlayan tarak kapatıldı. 45 dk süresince jel polimerleştikten sonra aparattan çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirildi. Tank 1X yürütme tamponu ile dolduruldu. Jeldeki tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Gerekli hacimde 4X yükleme tamponu içerisine %10 oranında β -merkaptoetanol eklendi ve kısa süreli santrifüj yapıldı. Nükleer-Sitoplazmik protein ayrımı gerçekleştirilmiş ve BCA analizi ile protein konsantrasyonu belirlenen örneklerin (protein lizatlarının) 50-100 μ g miktarlarına karşılık gelen hacmin üzerine su ve 4X yükleme tamponu eklenerek toplam hacim 30 μ L'ye tamamlandı.

Hazırlanan protein örnekleri 95° C’ de 5 dakika denatüre edildi. Örnekleri kuyucuk bölümlerine yüklendi. Yükleme işlemi bittiğinde elektroforez sisteminin kapağı kapatıldı ve elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi başlatıldı. Elektroforez işlemi 200 Volt’ta yaklaşık 45 dk boyunca gerçekleştirildi. Protein örnekleri jel üzerinde istenilen kademeye kadar yürütüldüğünde elektroforez işlemi sonlandırılarak transfer işlemine geçildi.

Tablo 3.8 SDS-PAGE Ayırma Jelinin (Separating Gel) hazırlanması

Ayırma Jeli				
Jel yüzdesi	%8	%10	% 12	%15
*Bir jel için 10 mL olacak şekilde:				
% 30’luk Akrilamit (29:1)	2,67 mL	3,33 mL	4 mL	5 mL
4X Ayırma Tamponu	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Distile su	4,8 mL	4,1 mL	3,5 mL	2,5 mL
% 10’luk AP	50-100 µL (Oda sıcaklığında her bir jel için 75 µL)			

Tablo 3.9 SDS-PAGE Yığınlama Jelinin (Stacking Gel) hazırlanması

Depolama Jeli (%3,5’luk) 3 mL	
%30’luk Akrilamit	0,35 mL
4X Depolama Tamponu	0,75 mL
Distile su	1,9 mL
% 10’luk AP	20-30 µL (Oda sıcaklığında 25 µL)

3.10.2.2 Proteinlerin PVDF membrana transferi

Western blot sandviç aparatı sırasıyla bir sünger, 2 adet Whatman kâğıdı, proteinlerin yürütüldüğü jel, PVDF membran, 2 adet Whatman kâğıdı ve bir sünger yerleştirilerek hazır hale getirildi. Aparata yerleştirilmeden önce PVDF membran metanol

içinde ıslatıldı. Proteinlerin membrana transferini gerçekleştirmek üzere oluşturulan sandviç aparatı, transfer tankına yerleştirildi. 1X transfer tamponu eklendi ve aparatın kenarlarına soğutucu bloklar yerleştirildi. Hızlı transfer için 300 mA 90 dakika, gece boyu transfer için ise 40 mA koşulları uygulandı.

3.10.2.3 Membranın bloklanması

Proteinlerin jel yüzeyinden PVDF membrana transferi gerçekleştirildikten sonra primer antikor ile işaretleme sırasında membran yüzeyine spesifik olmayan bağlanmaların meydana gelmesini engellemek amacıyla PVDF membranın bloklanması gerekmektedir. Bloklama işlemi PVDF membranın 1X yıkama tamponu ile hazırlanan %5'lik süt çözeltisi içinde oda sıcaklığında 1 saat bekletilmesi ile gerçekleştirildi.

3.10.2.4 Primer antikor ile işaretleme

Bloklama işleminden sonra membran 1X yıkama tamponu ile 5 dk yıkandı. Primer antikorlar %5 yağsız süt tozu (pH 7.4) içeren 1X bloklama tamponu ile hazırlandı. Koruyucu olarak 1:1000 oranında sodyum azit çözeltisi eklererek +4°C'de muhafaza edildi. Protein işaretleme oda sıcaklığında 1 saat ya da gece boyu +4 °C olacak şekilde yapıldı.

3.10.2.5. Sekonder antikor ile işaretleme

Primer antikor ile işaretleme yapıldıktan sonra spesifik olmadan meydana gelen antikor bağlanmalarını ortamdaki uzaklaştırmak için membran 1X yıkama tamponu ile 5 kez 5'er dk olacak şekilde yıkandı. Sonrasında PVDF membran %5 yağsız süt tozu içeren bloklama tamponu içinde hazırlanmış olan sekonder antikorlar ile 1 saat oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Seyreltme oranı 1/10.000 olan, üzerinde Horse Radish Peroxidase enzimi bağlı olan anti-Tavşan (Thermo, 31460) ya da anti-Fare (Thermo, 31430) sekonder antikorlar kullanıldı. Sekonder antikorlar ile işaretleme sonrasında spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak üzere PVDF membran yıkama solüsyonu ile 5'er dakika boyunca 5 kez olacak şekilde yıkandı.

3.10.2.6. Kemilüminesans görüntüleme

Kemiluminesans görüntülemenin temel prensibi ECL kiti içerisinde bulunan luminol maddesinin sekonder antikorların ucuna takılı olan Horse Radish Peroxidase Enzimi ile kimyasal tepkimeye girmesi sonucu oluşan 3-aminofthalatın ışımasının 428 nanometre dalga boyunda CCD kamera ile ölçülmesi esasına dayanır.

Clarity Western ECL Substrat (Bio-Rad, 1705061) kitinde bulunan solüsyonlar taze olarak 1:1 oranında hazırlanıp membran yüzeyine uygulandı, sonrasında ECL substratının fazlası peçeteye süzdürüldü. Membran yüzeyinde gerçekleşen kimyasal reaksiyon sonunda oluşan ışık CCD kamera içeren Vilber Loumart Fusion Fx-7 (Thermo Fisher Scientific) ile yakalandı ve ölçülebilir veri haline dönüştürüldü. Oluşan ışık yoğunluğu membran yüzeyinde o noktada bulunan antikor yoğunluğu ile dolayısıyla tespit etmek istediğimiz protein yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bu ışık yoğunluğu sayısal değer analizi yapabilen özel görüntüleme ve veri işleme programlarından olan ImageJ programı ile analiz edildi.

3.11 İstatistiksel Analizler

Her bir örneğin absorbans değeri, o deney setine ait kontrol grubunun ortalama absorbans değeri ile kıyaslanmak üzere grafiklendi. Grafiklerde en az 4 tekrarın ortalaması $\pm$ ortalamanın standart hatası (SEM) sütun grafik olarak verildi. Skorlamalarda 10'ar tekrarın medyan değerleri kutu dağılım grafiği olarak verildi.

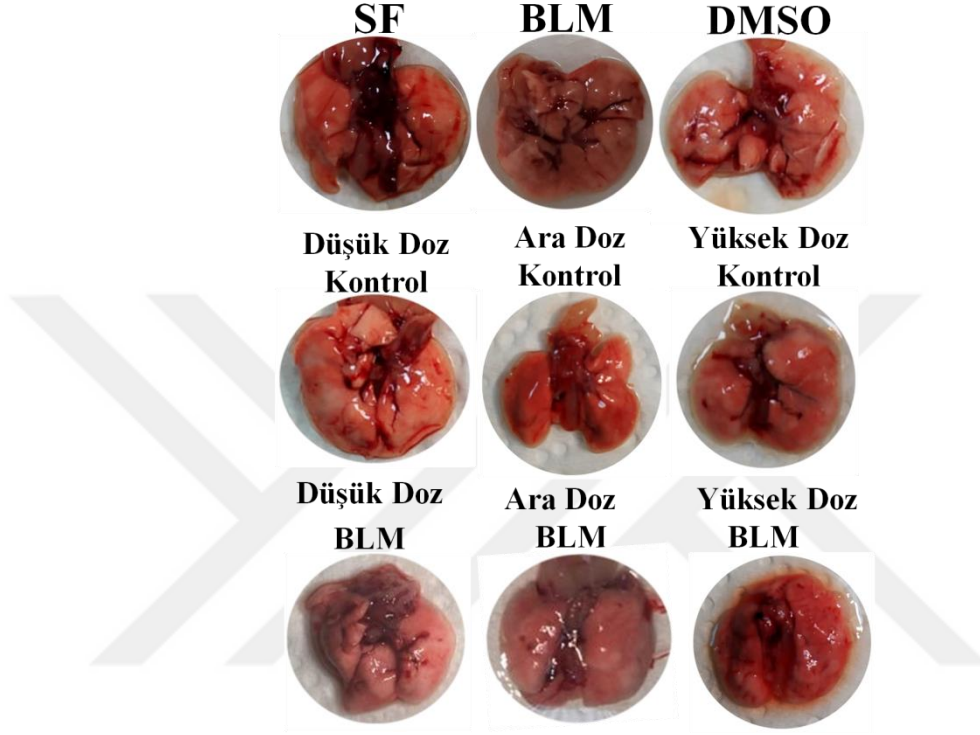
Uygulanan testlerden elde edilen verilerin normal dağılımı ve anlamlılık derecelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için IBM SPSS Statistics ver. 25.00 (Statistical Package for Social Sciences), grafik çizimleri için ise GraphPad prism programı (versiyon 6, GraphPad Software, Inc., San Diego Kaliforniya, ABD) kullanıldı. Birbirinden bağımsız ikiden fazla deney grupları arasındaki istatistiksel farklar parametrik analizler için tek yönlü ANOVA (varyans analizi) yöntemi ile, parametrik olmayan analizler için ise Kruskal Wallis yöntemi ile %95 güven aralığında ($p \leq 0.05$) değerlendirildi. Parametrik analizler için gruplar arasında ikili ilişkiler, varyansların homojen dağılması durumunda

Tukey çoklu karşılaştırma ile ve homojen dağılmayan varyanslar için ise Dunnet T3 çoklu karşılaştırma (post-hoc) yöntemiyle saptanmıştır. Kruskal Wallis yöntemi sonrası ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi yapılmıştır. Birbirinden bağımsız iki grup arasındaki istatistiksel farklar ise parametrik analizler için 2 independent t testi ile parametrik olmayan analizler için Mann Whitney U testi ile %95 güven aralığında değerlendirildi. Skorlamalarda parametrik olmayan analiz uygulanmıştır.



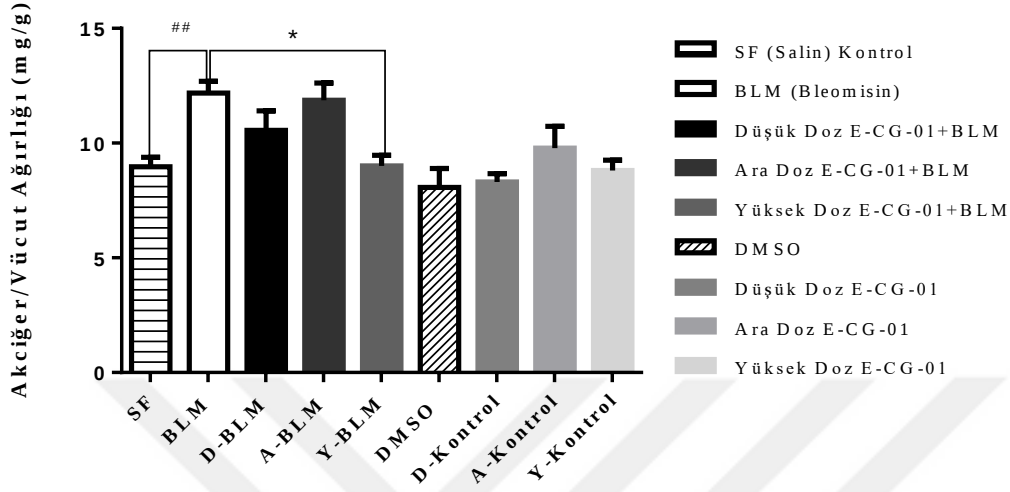
4. BULGULAR

4.1. Islak Akciğer Ağırlıkları



Şekil 4.1 Deney gruplarına ait akciğer görüntüleri

Akciğer/Vücut Ağırlığı Karşılaştırma Grafiği

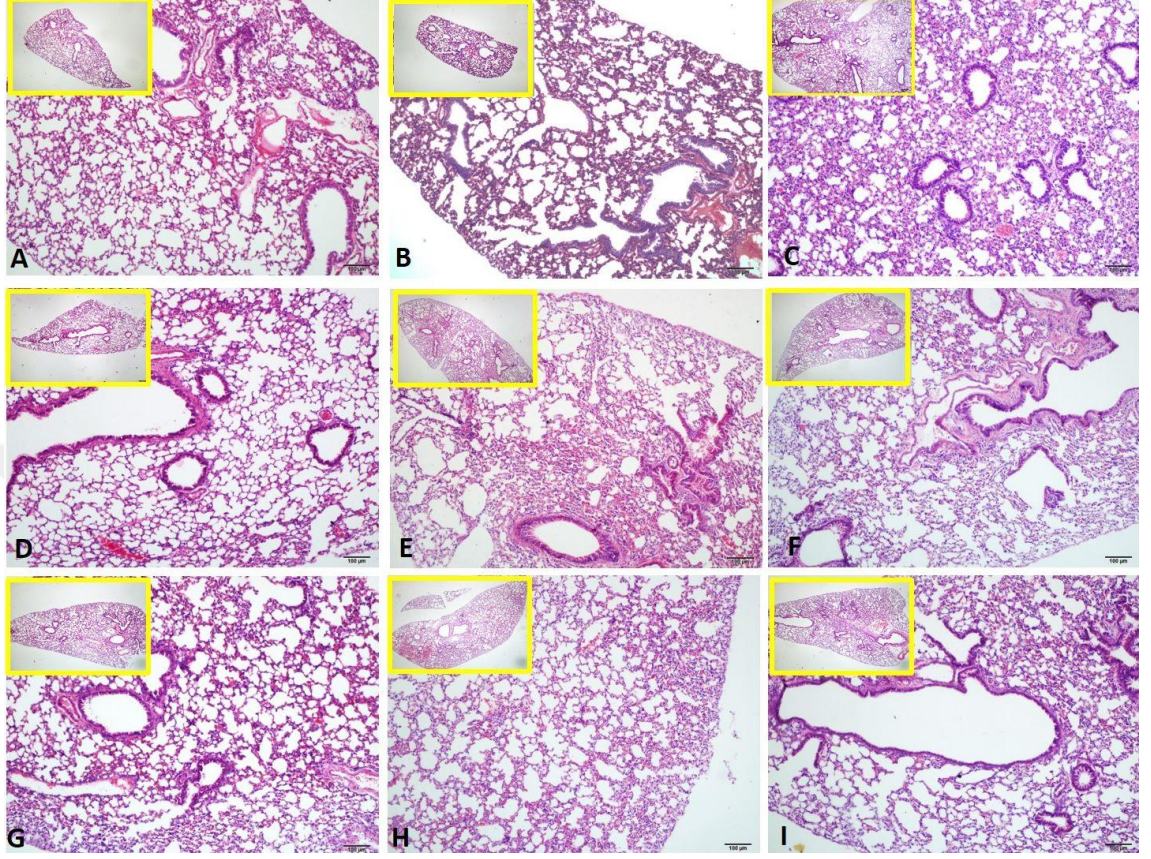


Şekil 4.2 Deney gruplarına ait akciğer/vücut ağırlık oranları. BLM deney grubuna (akciğer fibrozis modeline) ait akciğer/vücut ağırlık oranında SF kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görülmüştür. E-CG-01 molekülünün yüksek dozunun BLM'den kaynaklanan akciğer/vücut ağırlık oranındaki artışı engellediği görülmüştür. DMSO ve E-CG-01'in kontrol gruplarının akciğer/vücut ağırlık oranında değişime sebep olmadığı belirlenmiştir. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. (* $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$)

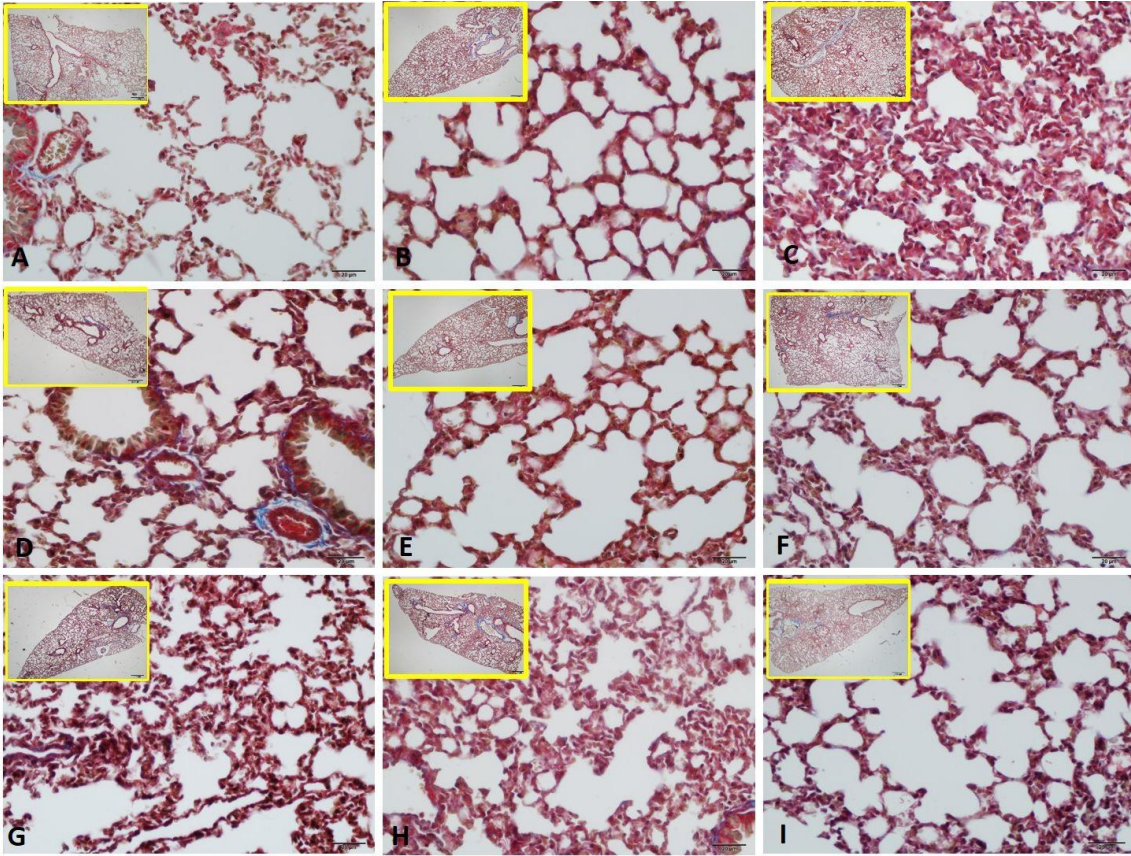
Deney gruplarına ait akciğer görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.

BLM grubuna ait akciğer/vücut ağırlığı oranında artış olduğu görüldü. BLM'den kaynaklanan artan akciğer ağırlığını azaltmayı yalnızca yüksek dozda uygulanan E-CG-01'in sağladığı belirlendi. DMSO ve molekül kontrol gruplarına ait akciğer/vücut ağırlık oranlarında SF kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.2).

4.2. Histoloji



Şekil 4.3 H&E boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, i) Yüksek doz E-CG-01+BLM. Büyük resimler X40, Küçük resimler X4 büyütme (Büyütme ölçeği X10= 500 μ m, X20= 250 μ m, X40= 125 μ m).



Şekil 4.4 Masson trikrom boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, ı) Yüksek doz E-CG-01+BLM. Büyük resimler X40, Küçük resimler X4 büyütme (Büyütme ölçeği X10= 500 μ m, X20= 250 μ m, X40= 125 μ m).

SF grubuna ait akciğer dokusu histolojik kesitleri incelendiğinde normal bir akciğer parankimasında görülmesi gereken organizasyona sahip oldukları saptandı. Alveol duvarlarının yapısında tek katlı yassı epitel ve düz kas demetleri içeren çok ince bir bağ dokusuna sahip oldukları, alveollerin etrafında kan kapillerleri içeren çok ince bir bağ dokusunun çevrili olduğu saptandı. Komşu alveoller arasında alveolar septum olarak bilinen bölgenin normal histolojik yapıda olduğu görüldü. Bu bölgede kan hava bariyeri bulunmaktadır. Alveol epitelinin tip 1 ve tip 2 AEC ve az sayıda fırçamsı hücre, alveolar toz hücreleri ve dendritik hücreler olmak üzere 3 temel hücreden oluştuğu görüldü ve yapılanmanın normal histolojik yapıda olduğu saptandı. Tip 2 AEC'nin normal histolojik yapıda oldukları ve alveolar hava boşluğuna doğru yerleştikleri görüldü. Alveolar

lümende ve intertisyumda bulunan alveolar toz hücrelerinin yapısal, sayısal ve dağılımlarının normal olduğu görüldü (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

Düşük doz, ara doz ve yüksek doz E-CG-01 ve DMSO kontrol gruplarının hemen hemen benzer histopatolojik yapıda oldukları görüldü. Özellikle düşük doz E-CG-01 kontrol grubunun alveol duvarlarının yapısında DMSO grubuna benzer şekilde minimal düzeyde kalınlaşma olduğu görüldü. Alveolar septum yapısında da aynı şekilde minimal düzeyde ödem olduğu saptandı. Yine alveolar septum dokusu içinde yer yer polimorfonükleer lökositlerin yerleştiği görüldü. Molekülün doz artışına bağlı olarak ara ve yüksek doz kontrol gruplarında, düşük doz kontrol grubunda görülen histopatolojik değişimlerinin ortadan kalktığı saptandı. Deney gruplarına göre ödem ve alveol duvar kalınlığı karşılaştırması Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

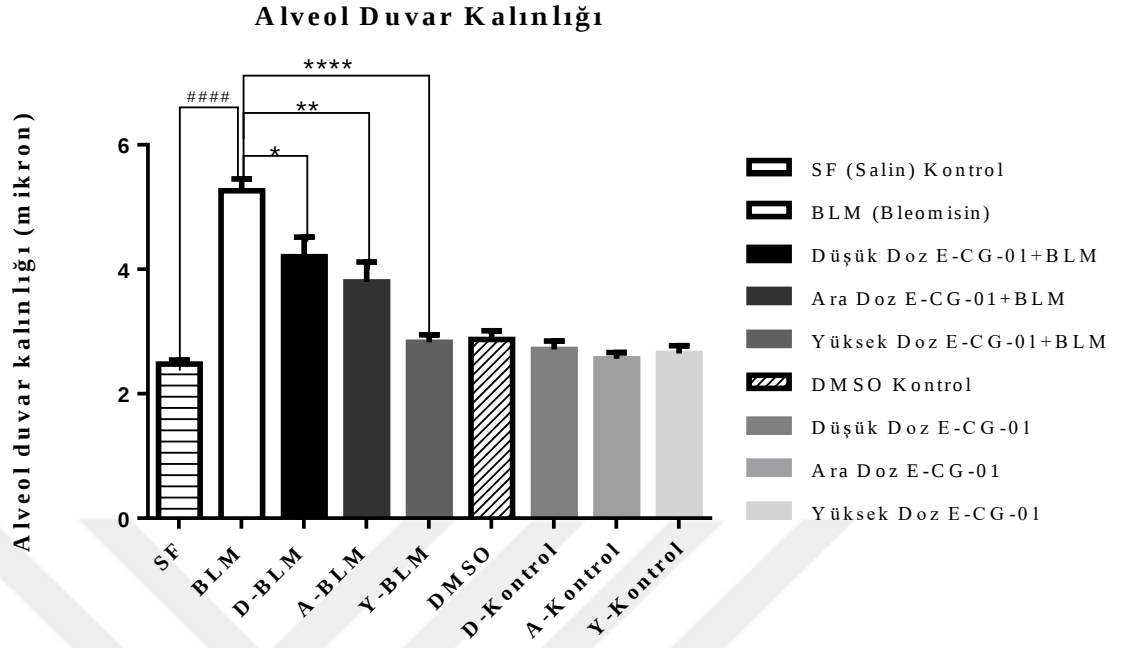
BLM grubunun tüm deney grupları içinde en dramatik histopatolojik değişim gösteren grup olduğu saptandı (Şekil 4.7). Alveol duvarların etrafındaki bağ dokusunda kalınlaşma ve bu bağ dokusunun içinde yerleşen kapiller damarlarda ileri derece dilatasyon saptandı. Alveolar yapıların büyük kısmında oblitere oldukları saptandı. Alveol yapısını oluşturan tek katlı yassı hücrelerin yerine tek katlı kübik hücrelerin doldurduğu saptandı. Komşu alveoller arasında alveolar septum olarak bilinen bölgede ileri derece kalınlaşma ve ödem görüldü. Bu alanlara polimorfonükleer lökositlerin gelmesi oldukça dikkat çekici idi. Yine bu gruba ait örneklerde yamalı görünüm şeklinde, alveol boşluklarını oblitere eden ileri seviyede fibrozis saptanmış olup bazı alanlarda yer yer fibrotik tıkaç benzeri yapıların var olduğu görüldü.

Düşük doz E-CG-01+BLM grubu alveol duvarlarının etrafındaki bağ dokusunda orta derece kalınlaşma ve bu bağ dokusunun içinde yerleşen kapiller damarlarda orta derece dilatasyon saptandı (Şekil 4.7). Alveolar yapıların çok az alanda oblitere oldukları saptandı. Alveolar septumda yine yer yer bazı alanlarda orta derece kalınlaşma ve ödem görüldü. Ancak BLM kontrol grubu ile kıyaslandığında düşük doz E-CG-01'in BLM ile indüklenen alveol duvarının kalınlaşmasında ve ödem oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış sağladığı belirlendi. Polimorfonükleer lökositlerin BLM grubu ile kıyaslandığında oldukça az alanda var oldukları görüldü. Bu gruba ait örneklerde yamalı

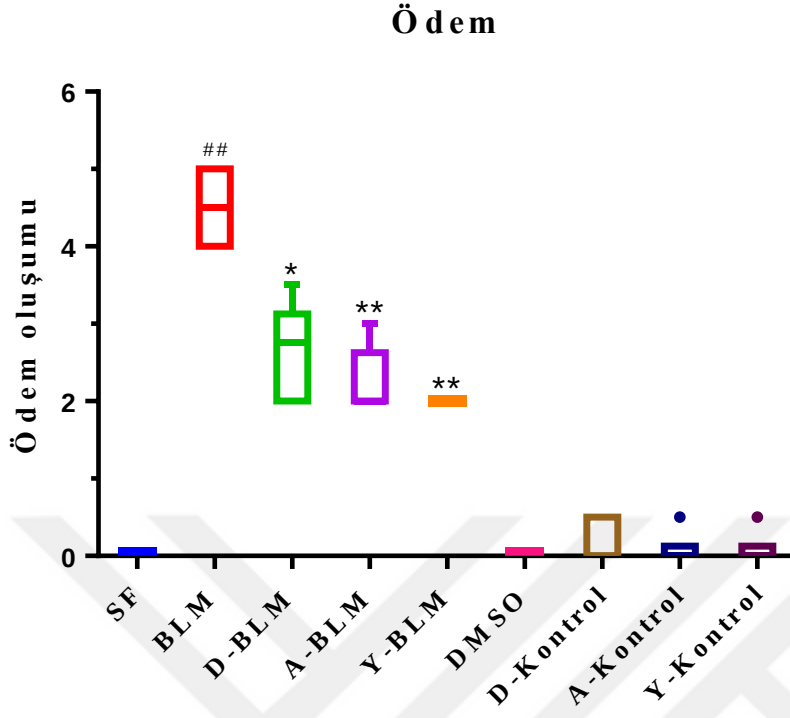
görünüm şeklinde, alveol boşluklarını oblitere eden ileri seviyede fibrozis bulgusu saptanmamıştır.

Ara doz E-CG-01+BLM grubu alveol duvarların etrafındaki bağ dokusunda minimal derecede kalınlaşma ve bu bağ dokusunun içinde yerleşen kapiller damarlarda yine düşük doz molekül verilen deney grubuna göre görece daha az dilatasyon varlığı saptandı (Şekil 4.7). Alveolar yapıların oldukça çok az alanda oblitere oldukları daha çok kontrol gruplarına benzer bir histopatolojik yapıda oldukları görüldü. Alveolar septumda oldukça az alanda olmak üzere minimal kalınlaşma ve ödem oluştuğu; BLM kontrol grubu ile kıyaslandığında ara doz E-CG-01'in BLM ile indüklenen alveol duvarının kalınlaşmasında ve ödem oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış sağladığı görüldü. Polimorfonükleer lökositlerin akciğer parankimi içinde fark edilir olmadığı bir histopatolojik görünüm saptandı.

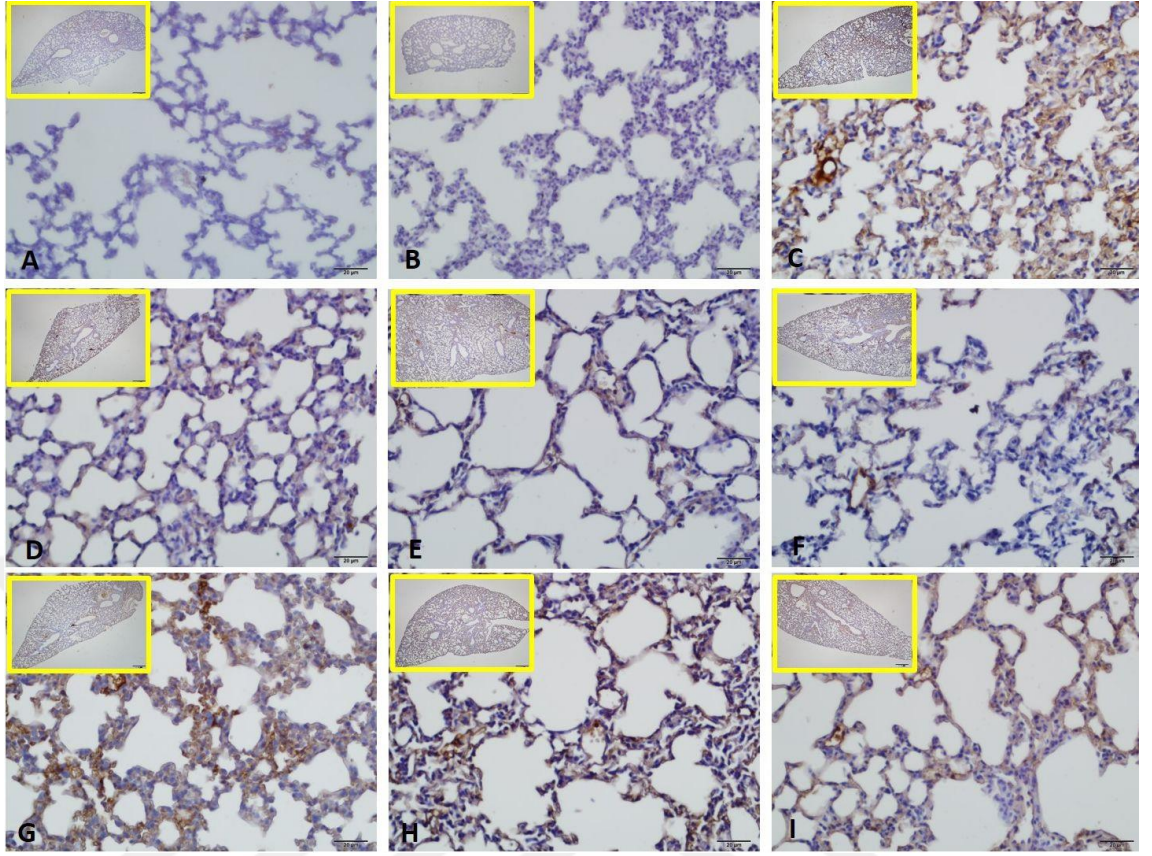
Yüksek doz E-CG-01+BLM grubu alveol duvarlarının etrafındaki bağ dokusunun normal histolojik görünümüne yakın olduğu ve bağ dokuda kalınlaşma ve doku içinde yerleşen kapiller damarların SF ve DMSO grubuna benzer bir görünümde olduğu saptandı (Şekil 4.7). Alveolar yapıların oldukça hemen hemen hiçbir alanda oblitere olmadığı görüldü. Alveolar septumda kalınlaşma ve ödem varlığı saptanmadı. BLM kontrol grubu ile kıyaslandığında yüksek doz E-CG-01'in BLM ile indüklenen alveol duvarının kalınlaşmasında ve ödem oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış sağladığı görüldü. Polimorfonükleer lökositlerin akciğer parankimi içinde gözlemlenmedi.



Şekil 4.5 Deney gruplarına göre ait alveol duvar kalınlığı. BLM grubuna ait alveollerin duvar kalınlıkları SF kontrole göre yüksek seviyede artmıştır. BLM'den kaynaklanan alveol duvarlarındaki kalınlaşmayı E-CG-01'nin üç farklı dozu da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. DMSO ve E-CG-01 kontrol gruplarının alveol duvarlarının kalınlaşmasında etkisi olmadığı görülmüştür. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$ **** $p \leq 0.0001$).

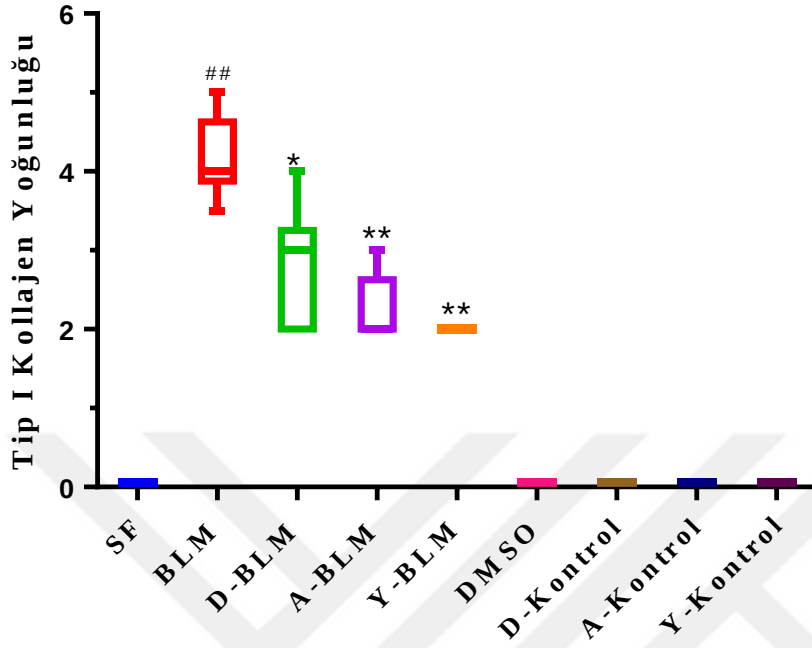


Şekil 4.6 Deney gruplarına ait ödem oluşumu. BLM grubunda SF kontrole göre ödem oluşumu gerçekleşmiştir. BLM uygulaması sonrası artan ödem oluşumunu E-CG-01'nin üç farklı dozu da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. DMSO ve E-CG-01 kontrol gruplarının ödem oluşumunda etkisi olmadığı görülmüştür. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ## $p \leq 0.01$).



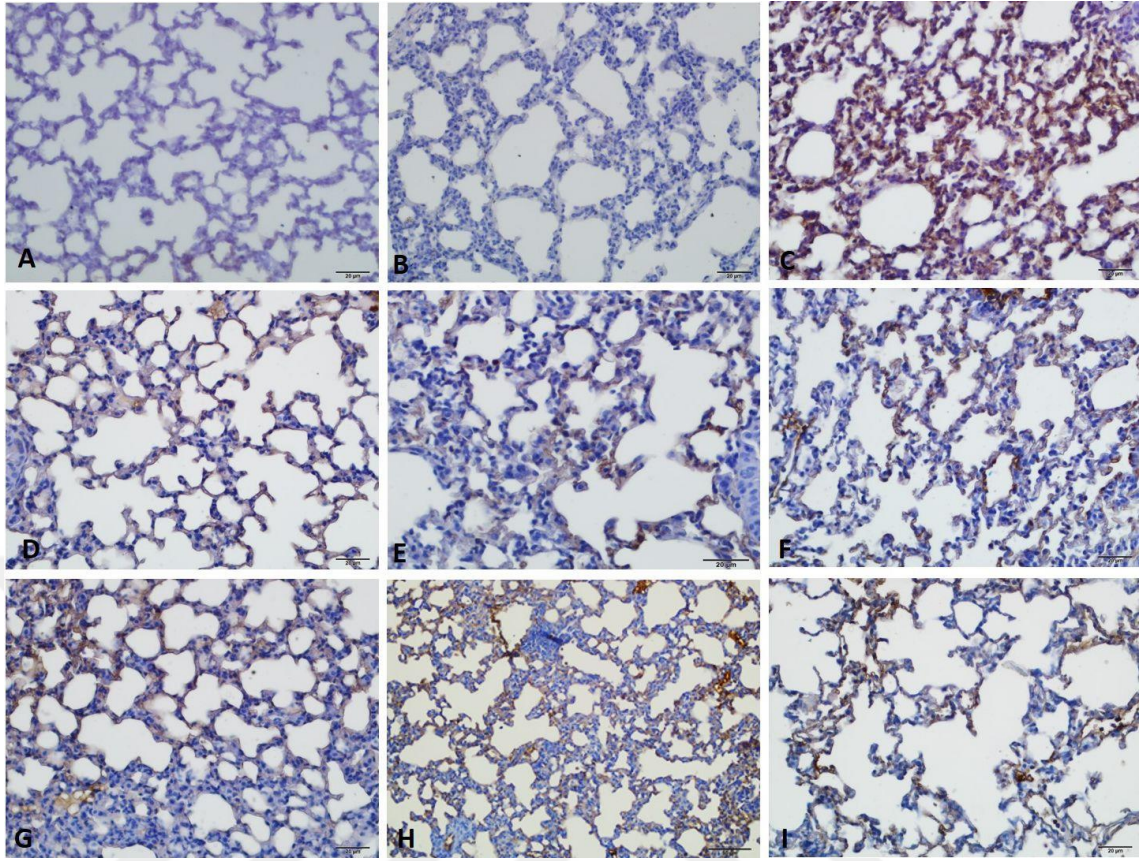
Şekil 4.7 Anti- Tip 1 kollajen boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, ı) Yüksek doz E-CG-01+BLM. Büyük resimler X40, Küçük resimler X4 büyütme (Büyütme ölçeği X10= 500 μ m, X20= 250 μ m, X40= 125 μ m).

Tip I Kollajen Grafiği

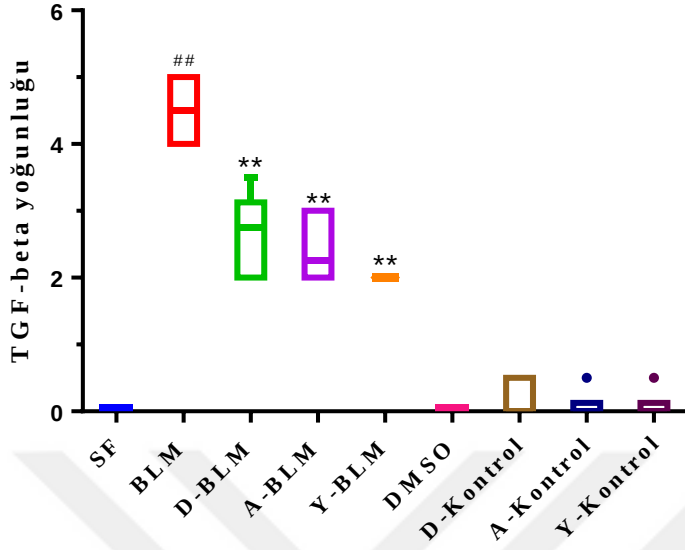


Şekil 4.8 Deney gruplarına göre tip I kollajen yoğunluğu. BLM grubunda SF kontrole anlamlı seviyede tip I kollajen oluşumu gerçekleşmiştir. BLM ile indüklenen tip I kollajen oluşumunu E-CG-01'nin üç farklı dozu da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. DMSO ve E-CG-01 kontrol grupları tip I kollajen üretimine yol açmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ## $p \leq 0.01$).

SF kontrole kıyasla BLM grubunda tip I kollajen yoğunluğunda artış olduğu görüldü. BLM kontrol grubu ile kıyaslandığında düşük, ara ve yüksek doz E-CG-01'in BLM ile indüklenen tip I kollajen birikiminde azalış sağladığı saptandı. DMSO ve molekül kontrol gruplarının tip I kollajen üretimine sebep olmadığı görüldü (Şekil 4.8).

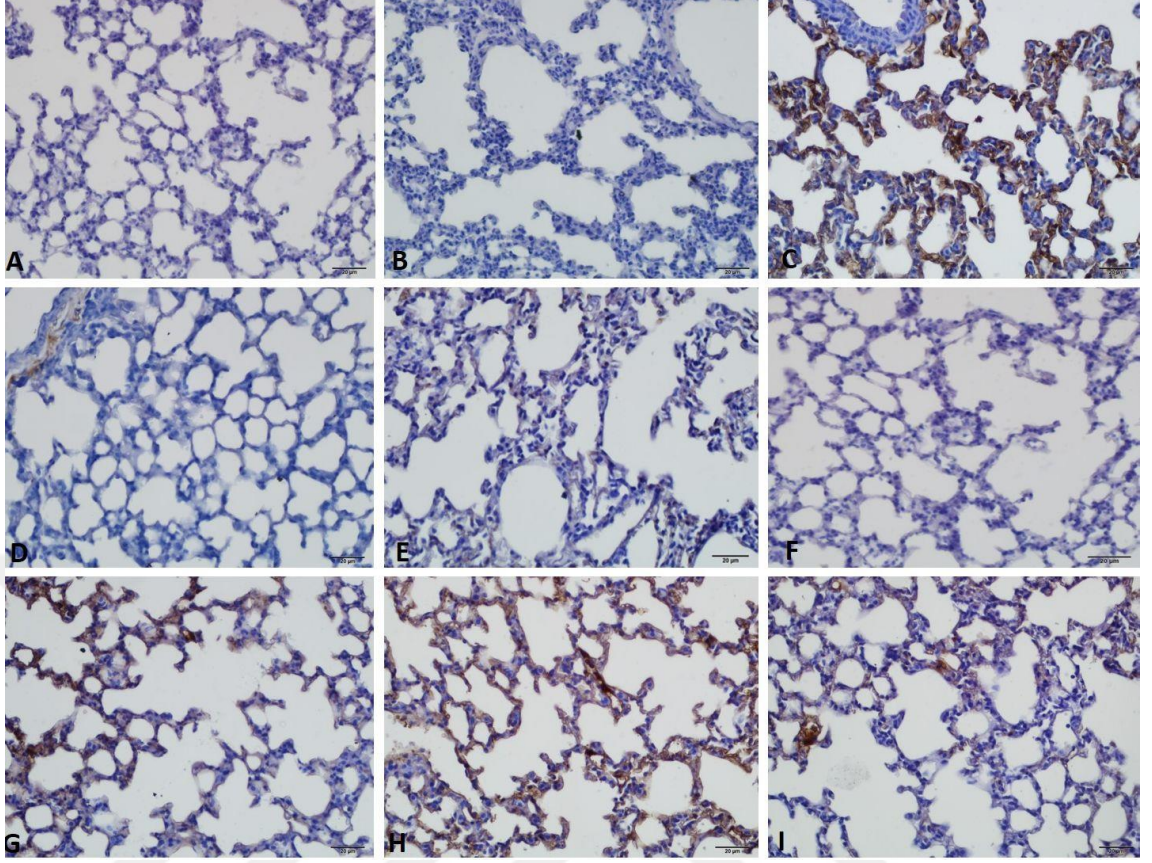


Şekil 4.9 Anti TGF- β boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, ı) Yüksek doz E-CG-01+BLM. Büyük resimler X40 (Büyütme ölçeği X10= 500 μ m, X20= 250 μ m, X40= 125 μ m).

TGF- β Grafiği

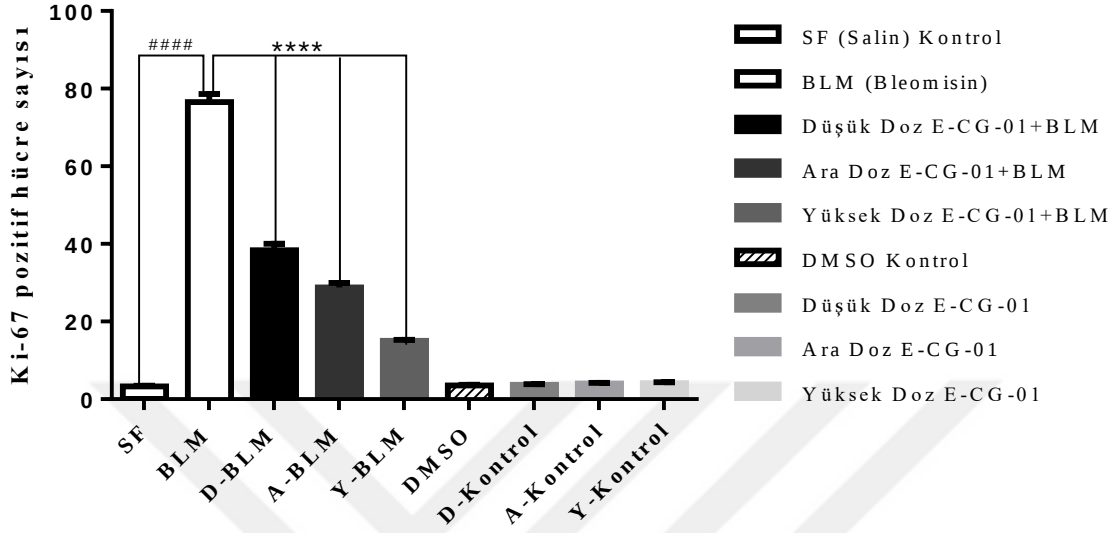
Şekil 4.10 Deney gruplarına göre TGF- β yoğunluğu. BLM grubunda SF kontrolle kıyaslandığında TGF- β seviyesinde artış görülmüştür. E-CG-01'nin üç farklı dozu da BLM sebebiyle oluşan TGF- β 'nin yoğunluğunu azaltmıştır. DMSO ve E-CG-01 kontrol grupları TGF- β üretimine yol açmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. (** $p \leq 0.01$, ## $p \leq 0.01$)

BLM grubuna ait alveolar septumda oldukça yoğun TGF- β ekspresyonunun varlığı saptandı. SF ve DMSO grubunda ise TGF- β ekspresyonunun olmadığı görüldü. Düşük, ara ve yüksek doz E-CG-01 kontrol gruplarının TGF- β ekspresyona sebep olmadığı saptandı. BLM kontrol grubu ile kıyaslandığında düşük, ara ve yüksek doz E-CG-01'in BLM'nin sebep olduğu TGF- β ekspresyonundaki artışı istatistiksel olarak anlamlı şekilde engellediği görüldü. TGF- β ekspresyon seviyesi açısından bu deney grupları arasında SF kontrol grubuna en yakın olan grubun doz E-CG-01+BLM grubu olduğu görüldü. Anti-TGF- β boyama ve skorumla sonuçları sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



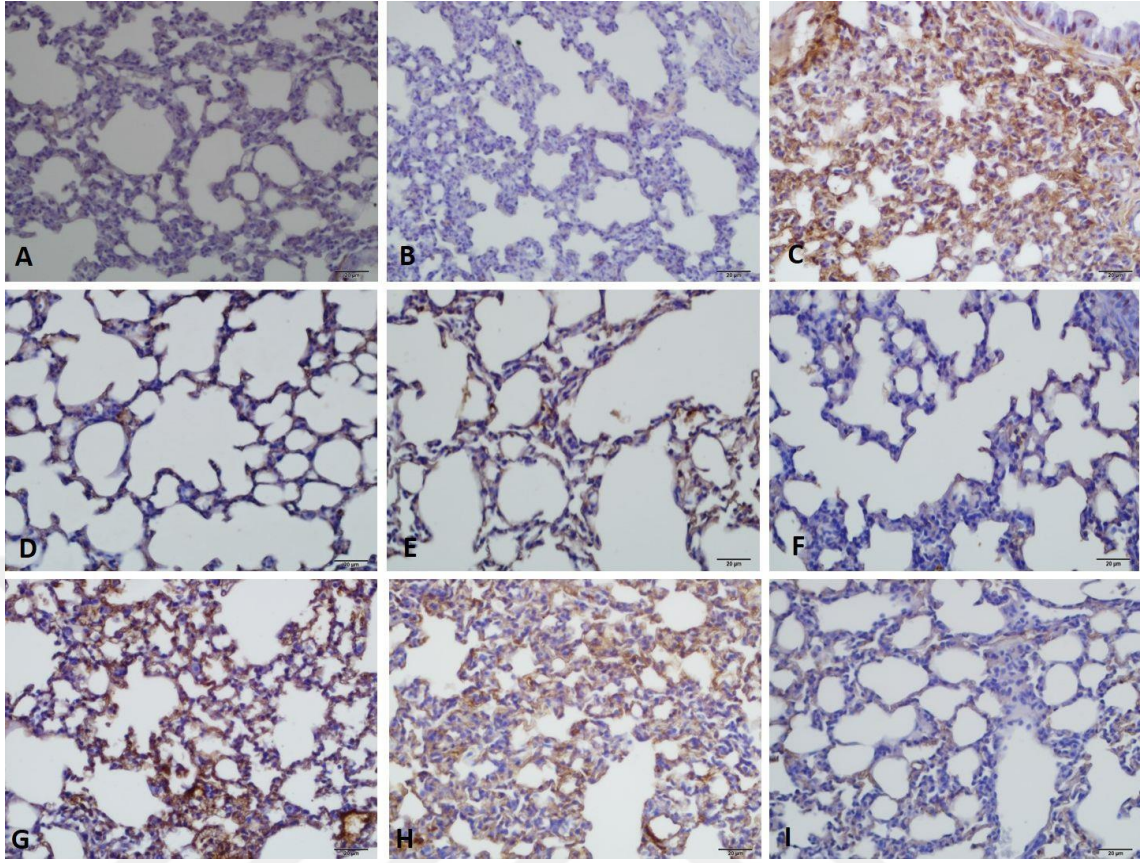
Şekil 4.11 Anti-Ki-67 boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, i) Yüksek doz E-CG-01+BLM. Büyük resimler X40 (Büyütme ölçeği X10= 500 μ m, X20= 250 μ m, X40= 125 μ m).

Ki-67



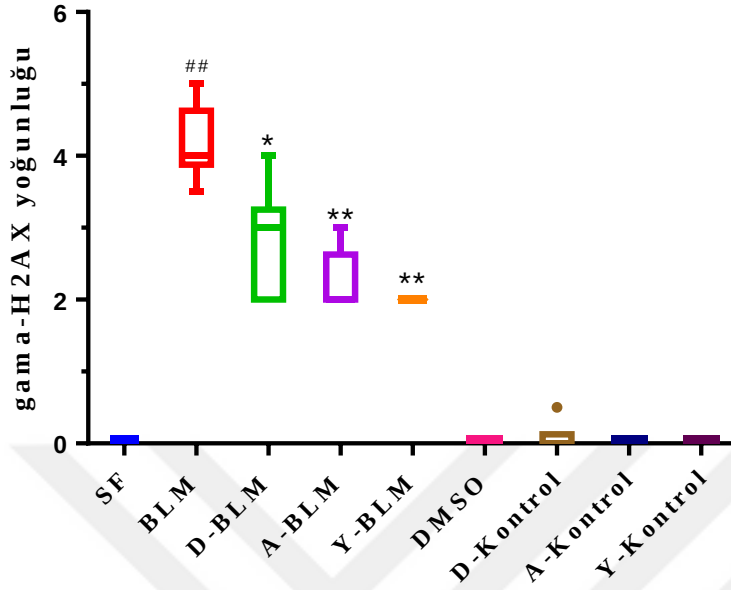
Şekil 4.12 Deney gruplarına göre Ki-67 pozitif hücre yoğunluğu. SF kontrole kıyasla BLM grubunda Ki-67 pozitif hücre sayısının arttığı görülmüştür. E-CG-01'nin üç farklı dozunun da BLM sebebiyle artan Ki-67 pozitif hücre yoğunluğunu azalttığı belirlenmiştir. DMSO ve E-CG-01 kontrol grupları Ki-67 pozitif hücre sayısında değişime sebep olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. (**** $p \leq 0.0001$, ### $p \leq 0.0001$)

SF kontrole kıyasla BLM grubunda Ki-67 eksprese eden hücre sayısında anlamlı derece farklılık olduğu belirlendi. Anti-Ki-67 boyama ve Ki-67 pozitif hücre sayımı sonuçları sırasıyla Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir. BLM grubunda alveolar septumda oldukça yoğun Ki-67 ekspresyonunun varlığı saptanmıştır. SF ve DMSO kontrolleri kıyaslandığında Ki-67 ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ayrıca, molekül kontrol gruplarının DMSO ile kıyaslanması sonucunda E-CG-01'in Ki-67 ekspresyon seviyesinde değişime sebep olmadığı gösterildi. BLM kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük, ara ve yüksek dozda uygulanan E-CG-01'in BLM ile indüklenen Ki-67 ekspresyon seviyesindeki artışı önlediği belirlendi.



Şekil 4.13 Anti- γ H2AX boyama. a) SF kontrol grubu, b) DMSO grubu, c) BLM grubu, d) Düşük doz E-CG-01 kontrol grubu, e) Ara doz E-CG-01 kontrol grubu, f) Yüksek doz E-CG-01 kontrol grubu, g) Düşük doz E-CG-01+BLM, h) Ara doz E-CG-01+BLM, ı) Yüksek doz E-CG-01+BLM. (Büyütme ölçeği X10= 500 μ m, X20= 250 μ m, X40= 125 μ m).

gamma-H2AX Grafiği

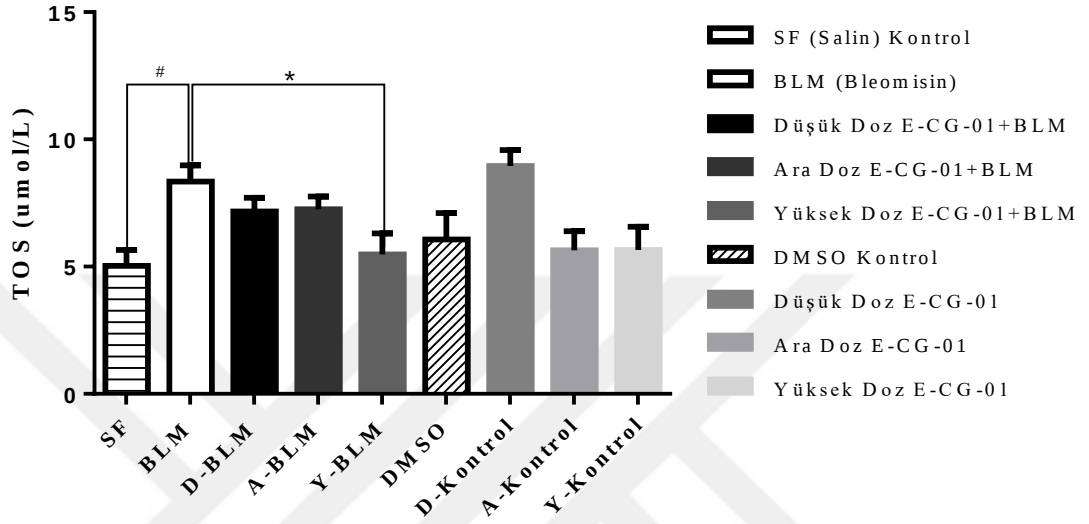


Şekil 4.14 Deney gruplarına göre γ -H2AX yoğunluğu. BLM grubunda γ -H2AX'te artış görülmüştür. E-CG-01'nin üç farklı dozda da BLM sebebiyle gerçekleşen γ -H2AX'teki artışı anlamlı düzeyde engellemiştir. DMSO ve E-CG-01 kontrol grupları γ -H2AX yoğunluğunda değişime sebep olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ## $p \leq 0.01$).

SF kontrolü ile karşılaştırıldığında BLM grubunda γ -H2AX yoğunluğunda artış görüldü. DMSO ve molekül kontrol gruplarının γ -H2AX yoğunluğunda değişime sebep olmadığı dolayısıyla DNA hasarına yol açmadığı belirlendi. E-CG-01'in üç farklı dozda da BLM ile meydana gelen γ -H2AX seviyesindeki artışı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı gösterildi. Elde edilen bu sonuçlar Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir.

4.3. Biyokimya Analizleri

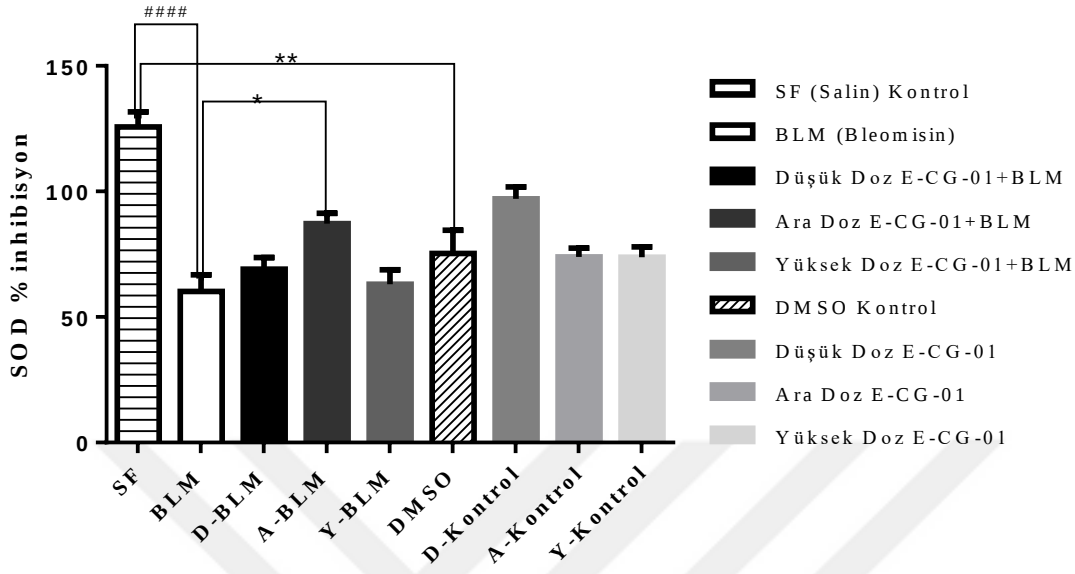
Total Oksidan Grafiği



Şekil 4.15 Deney gruplarına ait TOS grafiği. BLM grubuna ait TOS değerinde SF kontrolüne göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. BLM sebebiyle artan TOS sadece yüksek dozda E-CG-01 uygulanması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. DMSO ile SF grupları arasında farklılık görülmemiştir. E-CG-01 kontrol grupları DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında TOS değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalışa sebep olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. (* $p \leq 0.05$, # $p \leq 0.05$)

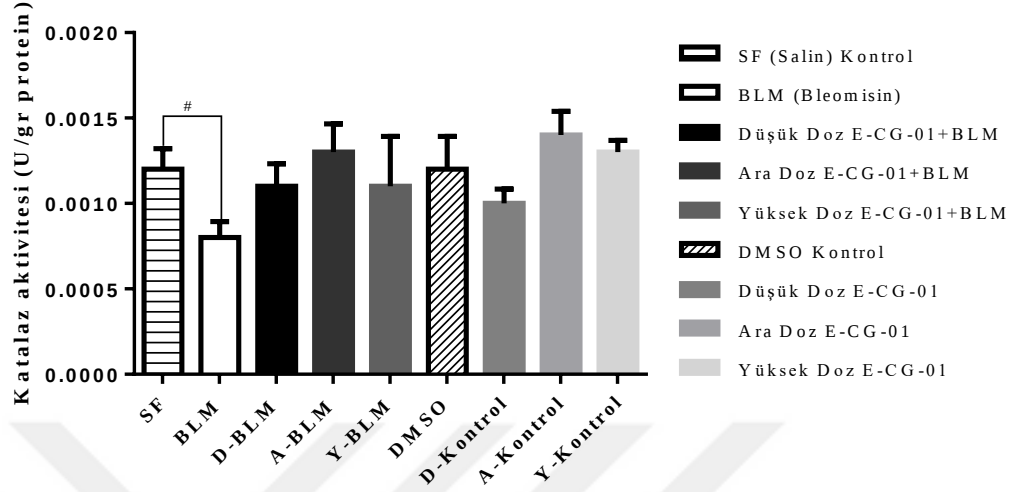
BLM grubunda TOS'un kontrole göre daha yüksek olduğu görüldü. Bu sonuç akciğer fibrozisi gelişiminde oksidan hasarın önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ek olarak DMSO'nun ve molekül kontrol gruplarının TOS seviyesinde artışa neden olmadığı belirlendi. BLM tarafından indüklenen TOS seviyesindeki artışı yalnızca yüksek dozda uygulanan E-CG-01'in azalttığı görüldü. TOS'a göre yapılan deney grupları arasındaki karşılaştırma Şekil 4.15'te gösterilmiştir.

Süperoksit Dismutaz % İnhibisyon



Şekil 4.16 Deney gruplarına ait SOD aktivite grafiği. BLM grubuna ait SOD % inhibisyonunda SF kontrolüne göre istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmüştür. BLM sebebiyle azalan SOD aktivitesi yalnızca ara dozda E-CG-01 uygulanması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. DMSO grubuna ait SOD aktivitesi SF kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır. E-CG-01 kontrol grupları DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında SOD % inhibisyon değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalışa sebep olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, #### $p \leq 0.0001$)

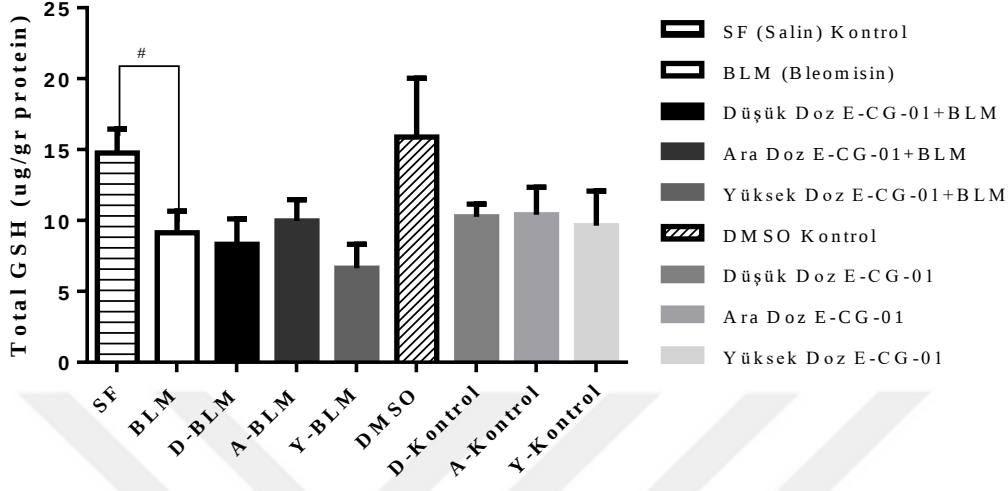
Katalaz Aktivite Grafiği



Şekil 4.17 Deney gruplarına ait katalaz aktivite grafiği. BLM grubuna ait katalaz aktivitesinde SF kontrolüne göre istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmüştür. BLM sebebiyle azalan SOD aktivitesinde, üç farklı dozda E-CG-01 uygulanması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı değişim olmamıştır. DMSO grubuna ait katalaz aktivitesi SF kontrol grubu ile kıyaslandığında farklılık olmadığı görülmüştür. E-CG-01 kontrol grupları DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında katalaz aktivite değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalışa sebep olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. ($^{\#}p \leq 0.05$)

BLM uygulanan grupta SOD ve katalaz aktivitelerinde SF kontrole göre azalma olduğu görüldü. Deney gruplarına göre yapılan SOD ve katalaz aktivite karşılaştırmaları sırasıyla Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de gösterilmiştir. DMSO kontrol grubunda SOD aktivitesinin SF kontrol grubuna göre azalmış olduğu gösterildi. Molekül kontrol gruplarındaki SOD ve katalaz aktivitesi DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında fark görülmedi. Ara doz E-CG-01+BLM deney grubunun, BLM kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda SOD aktivitesinde artış sağladığı görüldü. Ayrıca düşük, ara ve yüksek doz E-CG-01+BLM deney grupları BLM kontrol grubu ile karşılaştırıldığında katalaz aktivitesinde anlamlı düzeyde fark olmadığı belirlendi.

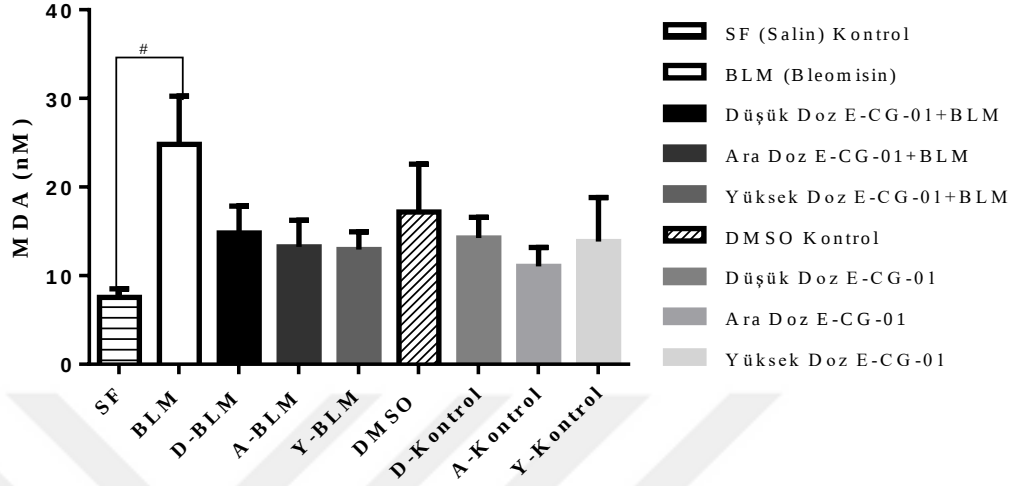
Total GSH Grafiği



Şekil 4.18 Deney gruplarına ait total GSH grafiği. BLM grubuna ait total GSH miktarında SF kontrolüne göre istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmüştür. BLM sebebiyle azalan total GSH miktarında, üç farklı dozda E-CG-01 uygulanması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı değişim olmamıştır. DMSO grubuna ait total GSH miktarı SF kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark görülmemiştir. E-CG-01 kontrol grupları DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında total GSH miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmamıştır. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. ($^{\#}p \leq 0.05$)

BLM'nin fare akciğerindeki total GSH miktarında azalmaya sebep olduğu gösterildi. SF ile kıyaslandığında DMSO'nun total GSH seviyesini etkilemediği, ayrıca DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığında molekül kontrol gruplarının da değişime sebep olmadığı belirlendi. BLM sebebiyle meydana gelen total GSH miktarındaki azalışı E-CG-01'in üç farklı dozunun da engelleyemediği belirlendi. Elde edilen bu sonuçlar Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

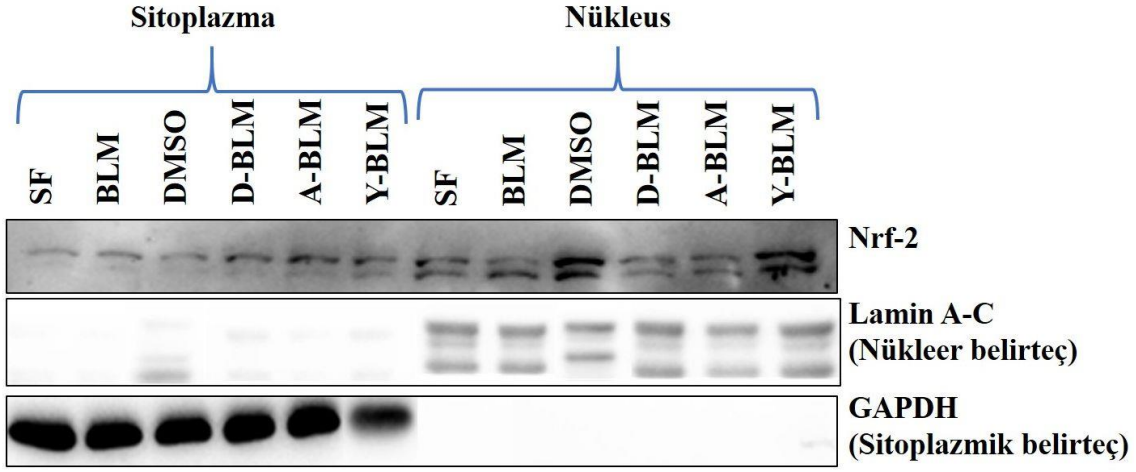
MDA Grafiği



Şekil 4.19 Deney gruplarına ait MDA grafiği. BLM grubuna ait MDA miktarında SF kontrolüne göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. BLM sebebiyle artan MDA miktarında, üç farklı dozda E-CG-01 uygulanması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmemiştir. DMSO grubuna ait MDA miktarı SF kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark bulunmamıştır. E-CG-01 kontrol grupları DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında MDA miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir. BLM ve DMSO grupları SF grubu ile karşılaştırılmıştır. E-CG-01+BLM deney grupları BLM grubuna göre, molekül kontrol grupları ise DMSO ile kıyaslanmıştır. ($^{\#}p \leq 0.05$)

Kontrole göre BLM grubunda MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü. MDA seviyesinin deney gruplarına göre kıyaslanması Şekil 4.19'da gösterilmiştir. DMSO'nun ve molekül kontrol gruplarının MDA seviyesine etkisi olmadığı belirlendi. Üç farklı dozda uygulanan E-CG-01+BLM deney grupları BLM kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişim sağlayamadığı görüldü.

4.4 Moleküler Analiz



Şekil 4.20 Nükleer-Sitoplazmik ayırım sonrası NRF2 western blot sonucu.

Nükleer-sitoplazmik ayırım sonrası yapılan western blot analizi sonucunda DMSO'nun Nrf2'nin nükleer translokasyonunu arttırdığı görüldü. BLM'nin SF ile karşılaştırıldığında Nrf2'nin nükleer birikimine etki etmediği görüldü. Molekül uygulanan deney gruplarına bakıldığında nükleer proteinde artış yalnızca yüksek dozda uygulanan E-CG-01'de saptandı (Şekil 4.20).

TARTIŞMA

Bu çalışmada farede i.t. yolla uygulanan BLM ile oluşturulan deneysel akciğer fibrozisi modelinde üç farklı dozda uygulanan E-CG-01'in anti-oksidan özellikleri yoluyla fibrozise karşı profilaktik etkisine bakılmıştır.

Sikloastragenolün toksisitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, yüksek dozlarda sikloastragenol (40-150 mg/kg/gün) sıçanlara oral gavaj ile uygulanmış ve klastojenik, mutajenik olmadığı, toksik/ genotoksik etki göstermediği belirtilmiştir (Szabo, 2014). Sikloastragenol gibi bazı biyoaktif moleküller yüksek dozlarda toksik etki göstermemesine rağmen daha etkili sonuç göstermeleri sebebiyle çok daha düşük dozları da değerlendirilmektedir. Örneğin bir çalışmada, optimal dozu hakkında bilgi eksikliği olan resveratrol molekülünün, kanser kemopreventif etkisini incelemek üzere iki farklı konsantrasyonu denenmiştir. Bu molekülün düşük dozunun, kolorektal karsinogenez fare modelinde intestinal adenom gelişimini 200 kat daha yüksek olan dozundan daha kuvvetli bir şekilde bastırdığı gösterilmiştir (Cai et al., 2015). Ayrıca sikloastragenolün SH-SY5Y hücrelerinin canlılığına etkisi bir poster çalışmasında *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Denenen en yüksek konsantrasyon olan 100 μ M'da toksik etki görülmemiştir ancak etkin değeri çok daha düşük bir konsantrasyonda (EC50 değeri:0.3 nM) elde edilmiştir (Doğan et al., 2016). Bu tez çalışmasına benzer olan bir akciğer fibrozisi çalışmasında sikloastragenolün bir türevi olan GRN510 molekülünün 10 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün konsantrasyonları denenmiş ve iki konsantrasyon için de olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Le Saux et al., 2013). Bu çalışmaya göre bizim molekülümüzün yüksek dozu olarak, GRN510 için etkili olduğu görülen 10 mg/kg/gün konsantrasyonu belirlenmiştir. İkinci konsantrasyon olarak, Doğan vd. tarafından *in vitro* uygulanan çalışmada, molekülün çok daha düşük konsantrasyonlarda daha etkili olduğunun gösterilmesi sebebiyle, 5'te bir oranında daha düşük doz belirlenmiştir. Bu iki doz dışında 6 mg/kg/gün konsantrasyonda bir ara doz uygulanmıştır.

Oksidatif stres hipotezi, genel kabul görmüş bir yaşlanma mekanizmasıdır. Süperoksit anyonu, H_2O_2 ve hidroksil radikali dahil olmak üzere ROS'lar, hücre işlevlerine zarar verir. Bu sebeple hücre yaşlanmasının ve hastalıkların birincil nedeni

olarak görülür. Fare ile gerçekleştirilen D-galaktoz-indüklü bir yaşlanma modelinde sikloastragenol tedavisinin deri, kalp ve karaciğerde doza bağımlı olmayan şekilde toplam antioksidan kapasitesini ve SOD aktivitesini arttırırken aynı zamanda MDA seviyesini azalttığı belirtilmiştir (Yu et al., 2018). Sikloastragenolün güçlü bir antioksidan olduğu belirtilmiştir (Weiss and Weiss, 2014). Ayrıca sikloastragenolün antioksidan etkilerinin kimyasal yapısında bulunan hidroksil ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Oksidatif stres telomer yıpranmasının ana nedeni olduğu için, sikloastragenolün telomer koruyucu etkilerinin hem antioksidan hem de telomerase aktivasyon özellikleriyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Yu et al., 2018). Endoplazmik retikulum stresi durumunda endotel hücrelerinin homeostazisinin araştırıldığı bir çalışmada sikloastragenolün ROS oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhao, et al., 2015).

DMSO genellikle hücre, doku ya da organ koruma amacıyla veya çözücü madde olarak, ayrıca radikal temizleyici özellikleri nedeniyle farmasötik ajanlar olarak tıbbi uygulamalar bulmuştur. Bununla birlikte, DMSO'nun fizyolojik ve farmakolojik özellikleri ve etkileri tam olarak anlaşılmamıştır. Bir çalışmada DMSO farklı hücre tiplerinde ROS ilişkili sitotoksikite açısından farklı etki göstermiştir. Ökaryotik bir organizma olan *Saccharomyces cerevisiae*, hücrenin oksidatif strese kurtulma kabiliyetini etkileyen fizyolojik parametreleri incelemek için uygun bir model olduğu belirtilmiştir ve DMSO'nun oksidatif stres altındaki mayada sitotoksik etki gösterirken bunun aksine, insan SK-Hep1 hücrelerinde oksidatif stres kaynaklı sitotoksikite üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği belirtilmiştir. (Kwak et al., 2010; Sadowska-Bartosz et al., 2013). DMSO'nun iç kulağa uygulanan bileşikler çözmede genellikle kullanılan bir çözücü olması sebebiyle sıçan koklear organoid kültürleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve doz bağımlı toksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Qi et al., 2008). Sıçanlarla gerçekleştirilen bir nefrotoksikite çalışmasında 10 gün boyunca %12.5, %25 ve %50 DMSO i.p. uygulandığında SOD, indirgenmiş GSH ve lipid peroksidasyonunda SF kontrol grubuna göre bir fark olmadığı belirlenmiştir (Ali and Mousa, 2015). C57BL/6 farelere toplamda 10 gün %10 i.p. DMSO uygulandığında, DMSO'nun akciğer fibrozisine sebep olmadığı gösterilmiştir (Liu, et al., 2020). Bizim çalışmamızda da çözücü olarak DMSO kullanıldı. DMSO kontrol grubu, %1,6 konsantrasyonda DMSO'nun 14 gün boyunca i.p. uygulanması ile oluşturuldu. DMSO kontrol grubunun

histoloji analizlerinin sonuçlarına bakıldığında akciğer fibrozisine yol açmadığı görüldü. Ayrıca SF kontrol grubu ile kıyaslandığında; SOD aktivitesinde azalmaya sebep olduğu ancak, TOS'ta değişime sebep olmadığı belirlendi.

BLM ile indüklenen akciğer hasarı modeli, çoğu klinik kullanım için önerilmiş olan, İAF için potansiyel (hem önleyici hem de terapötik) anti-fibrotik tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde büyük katkı sağlamıştır. BLM modelinde anti-fibrotik potansiyel sergilediği gösterilmiş moleküllerden N-Asetilsistein, molsidomine, resveratrol, berberine, melatonin, kersetin, kurkumin, E vitamini, erdostein, amifostin, U-74389, ginkgo biloba, talidomid antioksidan özellik göstermektedir. Ancak antioksidan enzimlerin ve serbest radikal temizleyicilerin, BLM'nin neden olduğu akciğer hasarının şiddetini azaltmadaki yararlı rolü, klinik öncesi hayvan modellerinde gösterilmiş olmasına rağmen, bu sınıfa ait ilaçlar henüz klinik kullanım için yeterli/uygun kabul edilmemektedir. Bu moleküllerden sadece GSH prekürsörü olan N-Asetilsistein, klinik deneyleri İAF hastaları için umut vaat ettiği belirtilmişti ancak, sonrasında yapılan plasebo kontrollü PANTHER-İAF klinik çalışması hiçbir olumlu etki ortaya koymamıştır. Dolayısıyla, oksidan/antioksidan dengesizliğinin yanı sıra ECM birikiminin hedeflenmesi, immun yanıtın modülasyonu, hücre bazlı tedaviler gibi ya da İAF'nin yaşa bağlı bir hastalık olması sebebiyle, telomer kısalması, yaşlanma, genomik dengesizlik ve epigenetik değişiklikler gibi yaşa bağlı birçok hücrel anormallik İAF için tedavi stratejileri geliştirmek açısından potansiyel ilgi alanları olarak önerilmektedir (Arora et al., 2018; Day, 2008). Bu amaçla bizim de bu tez çalışması kapsamında E-CG-01 molekülünü seçme sebebimiz antioksidan özelliği yanında telomeraz aktivatörü olduğu bilinen sikloastragenol molekülünün bir türevi olmasıdır. Ancak tez kapsamında yalnızca antioksidan özelliği değerlendirildi.

Literatürde akciğer fibrozisi modeli için çok çeşitli i.t. BLM dozları bildirilmiştir. Yüksek dozlar, genellikle akut yaralanma aşamasında ve kronik fibrozis tam olarak gelişmeden önce ölüm oranını önemli ölçüde artırabilmektedir (Liu, et al., 2017). Birçok çalışma ile 8-16 haftalık C57BL/6 ırkı farelere 1 ile 4 U/kg arasında değişen i.t. BLM dozları uygulanmıştır. 3-5 U/kg BLM'nin mortalitede artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Canlılığın yüksek olduğu akciğer fibrozisinin en etkili modeli 2-2,5 U/kg doz ile

sağlanıyor gibi görünmektedir. Birçok çalışmada i.t. BLM uygulamasından sonra farelerin kesimi 14. gün ile 32. günler arasında değişiklik göstermektedir. Akciğerde kollajen birikiminin genellikle i.t. BLM uygulamasından yaklaşık 21-28. günlerde (Liu, et al., 2017; Moore and Hogaboam, 2008; Scotton and Chambers, 2010) en üst seviyeye geldiği belirtilmiştir (Barbayianni et al., 2018; Cargnoni et al., 2009; Chu et al., 2017; Désogère et al., 2017a; Gibbons et al., 2011; Della Latta et al., 2018; Li et al., 2019; Liu, et al., 2017; Mi et al., 2011; O'Reilly et al., 2017; Santos-Silva et al., 2012; Swaney et al., 2010; Tashiro et al., 2017; Vandivort et al., 2016; Xiao et al., 2012; Xie et al., 2015). Bizim çalışmamızda da mortalite göz önünde bulundurularak BLM dozu 2,5 U/kg olarak belirlendi ve deney i.t. BLM uygulamasından sonra 26. günde sonlandırıldı.

BLM-indüklü akciğer fibrozisi modelinde, inflamatuvar fazın gerçekleştiği erken evrede (≤ 7 gün: i.t. BLM uygulamasından sonra ilk 7 gün içinde) uygulanmaya başlanan ilaç/moleküllerin hastalığa karşı profilaktik/önleyici (antioksidan/antiinflamatuvar) etkisi değerlendirilirken; inflamatuvar yanıtın kademeli olarak azalıp, fibrosis fazının gerçekleştiği geç evrede (>7 gün: i.t. BLM uyguladıktan 7 gün sonra) uygulandığında terapötik (antifibrotik) etkisi değerlendirilmektedir (Aono et al., 2005; Bogatkevich et al., 2011; Boyacı et al., 2006; Li et al., 2019; Liu, et al., 2017; Moeller et al., 2008a; Shariati et al., 2019; Yildirim et al., 2006). Bizim çalışmamızda da i.t. BLM uygulamasından 3 gün önce ve 14 gün boyunca i.p. E-CG-01 verilerek molekülün akciğer fibrozisinin ilerlemesini önleyici etkisi incelendi ve BLM uyguladıktan sonra 26. günde denekler kurban edildi.

İ.t. BLM uygulanması akciğer inflamasyonuna, fibrozise dolayısıyla da akciğer ağırlığında ve akciğer/vücut ağırlığı oranında artışa sebep olmaktadır (Cowley et al., 2019; Gilhodes et al., 2017; Milton et al., 2012; Shariati et al., 2019). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da BLM akciğer/vücut ağırlığı oranında artışa sebep oldu. Yüksek dozda uygulanan E-CG-01, BLM'nin indüklediği bu akciğer ağırlığındaki artışı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttı. DMSO ve 3 farklı dozda uygulanan E-CG-01'in akciğer/vücut ağırlık oranlarında değişime sebep olmadığı görüldü.

İAF'nin tipik radyolojik görünümü, fibrozis alanları arasına serpiştirilmiş normal akciğer bölgelerini içeren heterojen bir yapıya sahiptir (Herrera et al., 2019; Smith, M. et al., 2013). İAF'nin doğal ilerleyişine benzer şekilde BLM indüklü akciğer fibrozisinde de lezyonlar/fibrozis heterojen olarak dağılmaktadır (Ruscitti et al., 2017; Serrano-Mollar et al., 2007). Benzer şekilde bizim histoloji sonuçlarımızda da fibrozisin düzensiz yapıda olduğu belirlendi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

Histopatolojik değerlendirmeler sonucunda BLM uygulanan fare akciğerlerinde 14, 21 ve 28. günlerde, oluşan ödem ve fibrozis sebebiyle alveol duvarlarında kalınlaşma olduğu bilinmektedir. Vasküler endotelyal hücreler ile tip 1 AEC'ler arasındaki bazal membran kalınlaşıp – tip I/tip III- kollajen fibrillerle dolmaktadır (Kilic et al., 2014; Pan et al., 2014; Shi et al., 2019; Yao et al., 2019; Zhang, et al., 2015; Zhao, H. et al., 2020). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde BLM uygulanan akciğer dokularında kollajen birikimi ve ödem oluşumu ile birlikte alveol duvarlarında kalınlaşmanın görüldüğü histopatolojik değişim saptandı. DMSO ve üç farklı dozda uygulanan E-CG-01'in fibrozis oluşumuna katkı sağlamadığı belirlendi. E-CG-01'in 3 farklı dozda da BLM ile indüklenen fibrozisin ilerleyişini önlediği gösterildi (Bkz. Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.8).

TGF- β 1 akciğer dokusunda hücre çoğalması ve farklılaşmasını, fibroblastlarda ECM elemanlarının üretimini arttırdığı, fibrozis gelişimini uyardığı, yara iyileşmesinde merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. TGF- β , pro-fibrojenik faktörlerin anahtar faktörü olarak kabul edilir. İAF hastalarının akciğerinde ve BLM indüklü akciğer fibrosis modellerinde de 14., 21. ve 28. günlerde TGF- β seviyelerinde artış olduğu bilinmektedir (Liu, et al., 2020; Lomas et al., 2012; Özbilim et al., 2003; Zhang, et al., 2015; Zhao, et al., 2020). Bizim çalışmamızda da BLM grubunda yüksek seviyede TGF- β ekspresyonunun varlığı gösterildi. SF ve DMSO ve üç farklı dozda uygulanan E-CG-01'in TGF- β ekspresyonunda artışı tetiklemediği görüldü. BLM grubu ile karşılaştırılan düşük, ara ve yüksek doz E-CG-01+ BLM grubunun BLM'nin sebep olduğu TGF- β ekspresyonundaki artışı istatistiksel olarak anlamlı şekilde önlediği belirlendi.

Nükleer ve nükleolar bir protein olan Ki-67 hücre döngüsünün tüm aktif aşamalarında (G1, S, G2 ve mitoz) mevcut olması, ancak dinlenme halindeki hücrelerde (G0) bulunmaması sebebiyle hücre proliferasyon belirteci olarak kullanılmaktadır. Ki-67 ekspresyonu yüksek sellüler proliferasyonda artmaktadır. (Scholzen and Gerdes, 2000). Ki-67'nin ekspresyonu ile İAF'de histolojik hastalık aktivitesinin korelasyonunun, İAF için gelecekteki prognostik göstergelerden biri olabileceği belirtilmiştir. Antijen Ki-67 ekspresyonunun kontrol akciğer dokusunda ihmal edilebilir düzeyde iken, İAF hastalarında önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Hiperplastik tip 2 AEC'lerin fibroblastik odak alanlarından uzakta çoğalmasının, mikro saldırılara yönelik akciğer onarımının sağlanması amacıyla gerçekleşiyor olabileceği belirtilmiştir (Lomas et al., 2012; Vuorinen et al., 2008). Fareler ile gerçekleştirilen bir BLM indüklü akciğer fibrozisi çalışmasında BLM uygulamasından sonra 21. günde Ki-67 ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir (Shi et al., 2019). Benzer bir çalışmalarda da SF uygulanan akciğerler minimal bazal Ki-67 ekspresyonu sergilerken, BLM uygulanan akciğerlerde Ki-67 ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir (Aoshiba et al., 2013; Mikamo et al., 2018). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da BLM grubunda Ki-67 eksprese eden hücre sayısında artış olduğu belirlendi. SF ve DMSO kontrol grupları karşılaştırıldığında Ki-67 pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ayrıca, molekül kontrol gruplarının DMSO ile kıyaslanması ile E-CG-01'in Ki-67 pozitif hücre sayısında değişime sebep olmadığı belirlendi. Düşük, ara ve yüksek dozda uygulanan E-CG-01'in BLM ile indüklenen Ki-67 ekspresyon seviyesindeki artışı engellediği belirlendi.

DNA hasarı onarımındaki en erken olaylardan biri, histon 2AX'in (H2AX) fosforilasyonu sonucu γ -H2AX'in oluşmasıdır ve bu DNA hasarının belirteci olarak kullanılmaktadır (Aoshiba et al., 2013; Mcdonough et al., 2018). İAF'nin yaşlanma ile birlikte artan telomer kısalması ile de ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Kritik bir eşiğin altındaki telomerler, kromozom dengesizliğine ve DNA hasar yanıtı yollarının aktivasyonuna neden olarak hücre yaşlanma ve apoptoz ile sonuçlanır. Bu sebeple kromozomal hasarı gözlemlemek üzere yapılan bir çalışmada normal akciğere kıyasla İAF hastalarına ait akciğerlerde γ -H2AX belirtecinde üç kat artış olduğu belirlenmiştir (Mcdonough et al., 2018). Bir BLM indüklü akciğer fibrozisi çalışmasında, BLM kaynaklı γ -H2AX'teki artış 7. günde en yüksek seviyeye ulaşmış 21. güne kadar

azalarak devam ettiği gösterilmiştir. Ek olarak γ -H2AXpozitif hücrelerin %90'ının genel bir epitel belirteci olan E-cadherin ifade ettiği belirlenmiştir. Dolayısıyla i.t. uygulanan BLM'nin esas olarak AEC'lerini etkileyen kalıcı bir DNA hasarına yol açtığını göstermektedir (Aoshiba et al., 2013). Lenfositlerle *in vitro* çalışmada da BLM'nin γ -H2AX seviyesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Scarpato et al., 2013). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da BLM grubunda γ -H2AX yoğunluğunda artış görüldü. DMSO ve molekül kontrol gruplarının DNA hasarına yol açmadığı gösterildi. Üç farklı dozda uygulanan E-CG-01'in BLM ile oluşan DNA hasarındaki artışı azalttığı belirlendi.

Oksidatif stres, akciğerler de dâhil olmak üzere çeşitli organlarda fibrozisin altında yatan önemli bir moleküler mekanizma olarak gösterilmektedir. Ancak bununla birlikte çevresel maruziyetlerden ve inflamatuvar/interstisyel hücrelerden salınan ROS'ların fibroze aracılık etmesindeki nedensel rolü ve fibrozisli hastalarda ROS üretimindeki dengesizliğin en iyi nasıl hedefleneceği kesin olarak belirlenmemiştir (Cheresh et al., 2013).

Yaşlanma, antioksidan savunmaların tükenmesi ile ilişkilidir ve yaşlanma ile ilişkili bir hastalık olan İAF'de antioksidanların azaldığına dair çokça kanıt bulunmaktadır. Oksidatif stres; redoks dengesizliği, DNA hasarı, epigenetik değişiklikler, hücresel yaşlanma, mitokondriyal disfonksiyon, ER stresi gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla yaşlanmanın ana itici güçlerinden biridir. Dolayısıyla İAF, oksidatif stres ile ilişkili hızlandırılmış bir yaşlanma fenotipini temsil edebilir (Otoupalova et al., 2020).

Akciğerde BLM ile oluşturulan toksisite, doğrudan oksidatif hasarla başlatılır. Bu da daha sonra hem hücre dışı hem de hücre içi ROS oluşumunun aracılık ettiği fibroze yol açmaktadır (Allawzi et al., 2020). ROS üretmek için BLM, moleküler oksijen ve demir gibi iki değerlikli iyonlarla bir kompleks (BLM-Fe (III)-OOH) oluşturur. Pirimidin ve imidazol kısımlarının oksijen ve demiri bağlamasıyla; $O_2^{\cdot -}$ (süperoksit anyonu), hidroksil radikalleri ve Fe (III) gibi serbest radikal türlerinin oluşumuyla sonuçlanır. BLM kompleksi daha sonra DNA sarmalına bağlanarak DNA sarmal kırılmalarına ve lipid peroksidasyonuna neden olur (Allawzi et al., 2020; Shariati et al., 2019). Oluşan ROS

aynı zamanda inflamatuvar sinyal yollarını aktive ederek oksidatif hasara neden olur (Shariati et al., 2019).

BLM akciğer hasarı modelinde oksidatif hasar, ROS üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasındaki denge eksikliğinden kaynaklanan bir durumdur (Shariati et al., 2019). BLM akciğer hasarı modelinde oksidatif stres ve inflamasyonun erken evrede olduğu ve fibrozisin geç evrede olduğu bildirilmiştir. Ancak fibrozis sırasında oksidatif stresin ve inflamasyonun devam ettiği ve fibrozisin gelişimde rol oynadığı da bildirilmiştir. TGF- β ROS'un aşırı üretimine yol açarken, ROS da TGF- β üretimini aktive etmektedir. Bu da akciğer hasarının geç fazında oksidatif stresin yüksek seviyede kalmasının sebebi olabilir (Shariati et al., 2019). Bizim çalışmamızda da BLM'in TOS'ta artışa sebep olduğu belirlendi. Ek olarak DMSO'nun ve molekül kontrol gruplarının TOS üretimine yol açmadığı gösterildi. BLM grubu ile kıyaslandığında sadece yüksek doz E-CG-01+BLM'in TOS'u azalttığı görüldü.

Akciğer, ROS'un detoksifikasyonu için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Spesifik olmayan (enzimatik olmayan) mekanizmalar, küçük moleküller (GSH, ürik asit, askorbik asit gibi), vitaminler, peptitler gibi antioksidanları içerirken; spesifik detoksifikasyon sistemleri özel enzimatik sistemleri içerir (Otoupalova et al., 2020).

Çoğu antioksidan savunma mekanizması esas olarak hücre içi olduğu için hücre dışı redoks ortamı, esas olarak hücre dışı ROS oluşumu tarafından belirlenir ve hücre dışı mikro ortamdaki anahtar tiyol redoks çiftlerinin oranları ölçülerek değerlendirilebilmektedir. Redoks dengesi, elektronların indirgeyici ve oksitleyici maddeler arasında değiş tokuş edildiği koordineli reaksiyonlar dizisini içerir. Hücre dışı bölmede, redoks çiftleri arasında sistein/sistin, indirgenmiş/oksitlenmiş glutatyon (GSH/GSSG) ve hücre zarındaki reaktif protein tiyolleri bulunur. Hücre içinde redoks çiftleri, sistein/sistin ve GSH/GSSG'nin yanı sıra metabolik redoks çiftlerini, ör. NAD(P)H/NA(P)D⁺ veya FADH/FAD⁺ içerir. GSH redüktaz, GSH peroksidaz ve peroksiredoksinleri içeren karmaşık bir enzim sistemi, H₂O₂'nin detoksifikasyonunu, ayrıca GSH ve NADH'nin redoks durumunu düzenler (Allawzi et al., 2020).

GSH, akciğer antioksidan savunması için gerekli olan tripeptid yapıda önemli bir çözüner antioksidandır. Sitozol, mitokondri, ER, çekirdek ve alveolar sıvıda bol miktarda bulunur. GSH, H_2O_2 ve organik peroksitleri detoksifiye ederek GSSG oluşumuna yol açar. Bu reaksiyon esas olarak GSH peroksidaz tarafından katalize edilir. GSSG, kofaktör olarak NADPH kullanan GSH redüktaz enzimi tarafından GSH'ye geri indirgenebilmektedir. GSH ayrıca membranları peroksidasyona karşı korur. GSH ayrıca proteinlerdeki sistein üzerindeki tiyol gruplarına bağlanarak proteinleri oksidasyondan korur. Hem hücre içi hem de hücre dışı GSH, oksidatif hasara karşı akciğer savunması için gereklidir (Otoupalova et al., 2020).

ROS ile ilişkili olan TGF- β , akciğer dokusunda GSH sentezini inhibe eder (Otoupalova et al., 2020; Shariati et al., 2019). Okside GSH (GSSG) da yaşla birlikte artar, bu da fibrozisin kalıcılığını teşvik etmede rol oynar (Allawzi et al., 2020).

İAF hastalarında, alveolar sıvıda GSH konsantrasyonlarının azaldığı gösterilmiş ve İAF hastalarının serumunda GSSG/GSH oranının kontrole göre anlamlı olarak daha yüksek bulunduğu belirtilmiştir (Otoupalova et al., 2020). Benzer şekilde BLM uygulanan farelerin akciğerinde GSH seviyelerinde azalma olduğu gösterilmiştir (Arora et al., 2018; Chu et al., 2017; Hemmati et al., 2019). BLM uygulanan hayvanlarda gözlenen GSH seviyesindeki düşüş, bu antioksidanın serbest radikallerin aşırı üretimine karşı koymak için kullanılmasından kaynaklanıyor gibi görünmektedir (Arora et al., 2018). Bizim çalışmamızda da BLM'nin fare akciğerindeki total GSH seviyesinin azalmasına neden olduğu saptandı. DMSO ve molekül kontrol gruplarının total GSH miktarı üzerinde etkisi olmadığı belirlendi. BLM sebebiyle azalan total GSH seviyesini E-CG-01'in üç farklı dozunun da normal düzeye getiremediği görüldü.

Oldukça reaktif ve kararsız olmasına rağmen, $O_2^{\cdot -}$ 'nin direkt hücresel hedefleri sınırlıdır. Bu nedenle $O_2^{\cdot -}$, BLM'ye maruziyet sonrasında artabilirken, H_2O_2 'ye dönüşümü ve ardından oluşan $\cdot OH$ ve diğer reaktif türleri oksidatif hasardan doğrudan sorumlu olabilmektedir (Allawzi et al., 2020).

SOD, süperoksit radikallerinin H_2O_2 'ye dönüştürülmesini katalize ederek $O_2^{\cdot -}$ seviyelerinin detoksifikasyonunu sağlar (Cheresh et al., 2013). SOD, hücrelerde antioksidan savunmanın ilk hattı olarak davranmaktadır (Santos-Silva et al., 2012). Memeli SOD'un her üç izoformu (hücre içi bakır-çinko SOD; mitokondriyal manganez SOD ve hücre dışı SOD (EC-SOD)) akciğerde bulunur (Cheresh et al., 2013). EC-SOD diğer dokulara kıyasla akciğerde yüksek oranda eksprese edilir ve akciğer fibrozisi dâhil ROS ile indüklenen akciğer hastalıklarının patogeneğinde rol oynar (Cheresh et al., 2013; Gao et al., 2008). EC-SOD'un BLM, asbest ve radyasyon ile indüklenen çeşitli murin akciğer fibrozisi modellerinde koruyucu rol üstlendiği ve EC-SOD-nakavt farelerde çevresel toksinlere maruziyet sonrası fibrozisin önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir (Allawzi et al., 2020; Cheresh et al., 2013). EC-SOD bulunmayan farelerde BLM indüklü akciğer hasarı meydana gelirken; insan EC-SOD'unun farelerin akciğerlerinde aşırı eksprese edilmesi, bu fareleri BLM kaynaklı hasar ve kollajen ile ölçülen fibrozise karşı önemli ölçüde koruduğu gösterilmiştir (Allawzi et al., 2020; Bowler et al., 2002; Fattman et al., 2003; Gao et al., 2008). Böylece EC-SOD oksidatif redoks potansiyelini ortadan kaldırmak, hasarlı bölgede çözünürlüğü hızlandırmak ve fibrozisi azaltmak açısından önemlidir (Allawzi et al., 2020).

İmmünokimyasal çalışmalar sonunda akciğerde EC-SOD'un alveolar septada tip I kollajen ile yüksek seviyelerde ilişkili olduğu bulunmuştur. Sonraki çalışmalarda, EC-SOD'un tip I kollajene spesifik olarak bağlandığı ve tip I kollajeni oksidatif fragmentasyondan önemli ölçüde koruduğu belirtilmiştir (Gao et al., 2008). Ayrıca, EC-SOD^{-/-} fare ile yapılan çalışmada BLM indüklü akciğer hasarı sonrasında, kollajenin oksidatif olarak parçalanması ile ilgili bir belirteç olan 2-pirolidon'da kontrole göre artış olduğu görülmüştür. (Fattman et al., 2003). Özellikle tip I kollajen fragmentleri güçlü kemoatraktanlardır ve inflamatuvar hücrelerin aktivatörüdür. EC-SOD'un ECM'deki birkaç bileşeni doğrudan bağlama yeteneği, belirli matris bileşenleri ile yüksek konsantrasyonlarda var olmasını sağlar. Bu spesifik lokalizasyon, oksidan kaynaklı ECM degradasyonunu önlemesi ve bunun sonucunda fibrotik sitokin olan TGF- β 'nın aktivasyonunu ortadan kaldırması ile koruyucu etkinin merkezinde olabilir. Dolayısıyla İAF'de düşük seviyeli interstisyel EC-SOD, bu hastalığın daha da ilerlemesine neden olan antioksidan dengesizliklere katkıda bulunabilir (Gao et al., 2008). Diğer iki SOD

izoformunun akciğer fibrozisinin patogeneziindeki rolü tam anlaşılamamıştır. Mitokondrial, bakır-çinko SOD^{-/-} farelerde oksidatif stresin daha az olduğu ve asbestozisin gelişmediği belirtilmiştir (Cheresh et al., 2013).

Aşırı H₂O₂ neredeyse tüm hücre bileşenleri için zararlıdır ve bu nedenle hızlı ve etkili bir şekilde uzaklaştırılması aerobik organizmalar için hayati önem taşır. Katalaz, fizyolojik koşullar altında üretilen H₂O₂'nin oksijene ve suya detoksifiye edilmesinden sorumlu başlıca hücre içi antioksidan enzimlerden biridir (Odaşima et al., 2010).

C57BL/6, DBA/2 ve BALB/c ırkı fareler ile gerçekleştirilen bir BLM indüklü akciğer fibrozis çalışmasında C57BL/6, DBA/2 ırkı farelerde SOD ekspresyonunda ve SOD aktivitesinde azalma olduğu gösterilirken BALB/c ırkı farelerde her ikisinde de değişim olmadığı görülmüştür. Aynı çalışmada DBA/2 ve BALB/c ırkı farelerde katalaz ekspresyonunda azalış olurken C57BL/6 ırkı farede katalaz ekspresyonunda artış görülmüştür. Ancak C57BL/6 ırkı fare de dâhil olmak üzere tüm fare ırklarında katalaz aktivitesinde düşüş olduğu gösterilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak azaltılmış SOD aktivitesinin daha düşük seviyelerde H₂O₂ ile sonuçlandığını ve bunun katalaz enziminin ekspresyonunun C57BL/6 farelerinde artmasına rağmen substrat (H₂O₂) yokluğundan dolayı katalaz aktivitesini doğrudan etkilediğini belirtmişlerdir. (Santos-Silva et al., 2012). Bunun dışında da yapılan çalışmalar, akciğer fibrozis hastalarının akciğer dokusunda ve BLM ile fibrozis oluşturulmuş fare akciğerlerinde katalaz aktivitesinde azalma olduğunu göstermektedir (Arora et al., 2018; Odaşima et al., 2010; Shariati et al., 2019; Trajano et al., 2016).

Benzer şekilde bizim çalışmamızda da BLM'nin SOD ve katalaz aktivitelerini inhibe ettiği belirlendi. SF kontrol grubu ile kıyaslandığında DMSO kontrol grubunda SOD % inhibisyonunun azalmış olması %1,6 konsantrasyonda i.p. uygulanan DMSO'nun SOD aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir. Molekül kontrol grupları DMSO ile karşılaştırıldığında SOD ve katalaz aktivitesinde fark ortaya çıkmadı. Dolayısıyla molekül kontrol gruplarında molekülün DMSO'dan kaynaklanan SOD aktivitesinin inhibisyonunu önleyemediği belirlendi. Ancak buna rağmen ara doz uygulanan E-CG-01'in, BLM'den kaynaklanan SOD aktivitesindeki azalışı istatistiksel

olarak anlamlı seviyede engellediği belirlendi. Ancak ara doz E-CG-01+BLM grubu ile SOD aktivitesinde sağlanan bu artış TOS'un azaltılmasına yetmemiştir. Ek olarak BLM sebebiyle meydana gelen katalaz aktivitesindeki azalışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde önlenmesinde üç farklı dozda uygulanan E-CG-01'in yeterli olmadığı belirlendi.

Fareler ile gerçekleştirilen BLM indüklü akciğer fibrozisi modellerinde kontrolle kıyaslandığında BLM'nin MDA seviyesinde artışa sebep olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Arora et al., 2018; Shariati et al., 2019; Zhao, et al., 2018). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde BLM'nin MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış sağladığı gösterildi. DMSO'nun ve E-CG-01'in MDA miktarında değişime neden olmadığı belirlendi. Üç farklı dozda uygulanan E-CG-01'in BLM ile indüklenen MDA seviyesindeki artışı istatistiksel olarak anlamlı seviyede engelleyemediği saptandı.

Keap1/Nrf2–ARE sinyal yolağının aktivasyonunun oksidatif stres ile ilgili hastalıkların ilerlemesini inhibe ettiği; kanser, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, akciğer fibrozisi, romatoid artrit gibi pek çok hastalığın tedavisi için yeni bir potansiyel farmakolojik hedef olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, Nrf2 sinyal yolağı sıkı bir şekilde düzenlenir. Bazal koşullar altında, yeni sentezlenen Nrf2, sitozolde bulunan Keap1 tarafından tutulur. Sitozolde Keap1 ile kompleks halinde iken Nrf2'ye ubiquitin eklenerek proteozomlar tarafından parçalanması kolaylaşmaktadır (Chapple et al., 2012; Chen et al., 2016; Silva, et al., 2018; Zaafan et al., 2019). Nrf2-Keap1 kompleksinin ayrışması, Nrf2/ARE aktivasyonu için temel bir ön koşuldur ve iki mekanizma aracılığıyla gerçekleşir. Bunlardan biri Keap1'in yapısında bulunan sisteinlerin ROS ya da elektrofillerle reaksiyona girmesi sonucu proteinde meydana gelen yapısal değişiklikler ardından Nrf2 ile arasındaki bağın kopmasıyla Nrf2'nin salınması, diğeri ise protein kinazların aktivasyonu sonucu Nrf2'ye fosfat grubunun eklenmesiyle Keap1 aracılı kompleksten ayrılmasıdır. Keap1/Nrf2–ARE yolağına etki etme yeteneği gösteren doğal ya da sentetik bileşikler olabilen Nrf2 aktivatörleri içerisinde, Keap1 sisteinlerine etki eden elektrofilik aktivatörler dışında Keap1/Nrf2'nin protein-protein etkileşim arayüzünü hedefleyen elektrofilik olmayan aktivatörler de bulunmaktadır. Nrf2 kompleksten ayrıldıktan sonra fosforillenir. Böylece hücre çekirdeğine translokasyonu ve birikimi gerçekleşir. Çeşitli detoksifikasyon ve antioksidan genlerinin promotör bölgelerinde

ARE'ye bağlanır. Böylece SOD, GSH peroksidaz gibi çeşitli antioksidan genlerini aktive eder (Boots et al., 2020; Silva, et al., 2018; Smith, et al., 2016).

Bir çalışmada Nrf2 nakavt farelerde, yabani tip kontrolüne göre BLM ile tetiklenen akciğer fibrozisine karşı duyarlılığın arttırdığı gösterilmiştir. Dolayısıyla Nrf2'nin fibroze karşı önemli bir koruma sağladığı belirtilmektedir (Cho et al., 2004). Ancak oksidatif strese yanıt olarak Nrf2'nin pasif aktivasyonunun vücudu oksidatif hasardan etkili bir şekilde koruyamadığı, Nrf2'nin küçük moleküler kimyasal indükleyiciler ile aktivasyonunun antioksidan seviyesini/aktivitesini arttırabileceği belirtilmiştir. Nrf2'nin küçük moleküller ile aktive edilmesinin oksidatif stresle ilgili hastalıkların ilerlemesini inhibe ettiği deneysel modellerde gösterilmiştir (Chapple et al., 2012; Chen et al., 2016; Harvey et al., 2011). Dolayısıyla Nrf2'nin çekirdekte birikiminin, kesin olarak Nrf2 aktivasyonu ve antioksidan gen ekspresyonunun indüksiyonu ile sonuçlanacağını söylemek mümkün değildir.

C57BL/6 ırkı fareler ile gerçekleştirilen benzer iki çalışmada BLM'nin 14. ve 28. günlerde Nrf2 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Zhang, et al., 2018; Zhou et al., 2016). Fareler ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise BLM'nin Nrf2/ β -aktin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Yan et al., 2017). Benzer bir BLM-indüklü akciğer fibrozisi çalışmasında BLM'nin kontrole göre Nrf2 nükleer translokasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Cho et al., 2004). Sıçanlar ile yapılan bir başka çalışmada ise BLM grubuna ait nükleer Nrf2'nin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gösterilmiştir (Tang et al., 2016). Dolayısıyla BLM'nin Nrf2 ekspresyonu ya da nükleer birikimi üzerindeki etkisi ile ilgili literatürde tutarlı sonuçlar olmadığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda BLM'nin, Nrf2'nin nükleer birikiminde SF kontrolü ile kıyaslandığında değişim olmadığı görüldü. HUVECs (İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri) ile yapılan bir çalışmada %0,8 DMSO'nun Nrf2 nükleer translokasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Liang et al., 2011). H9c2 kardiyomiyosit (sıçan embriyonik kardiyomiyoblasttan elde edilmiş) hücreleri üzerinde DMSO'nun H_2O_2 'den kaynaklı oluşan hasarı önlemedeki antioksidan etkisini inceleyen bir çalışmada DMSO'nun Nrf2'nin nükleusa translokasyonunu önemli ölçüde indüklediği belirtilmiştir (Man et al., 2014). Bizim çalışmamızda da %1,6 DMSO'nun nükleer Nrf2 birikiminde SF kontrole

göre kıyasla artışa sebep olduğu görüldü. Bu çalışma ile redoks dengesizliğinin Nrf2'ye bağlı onarım yoluyla fibrozise karşı koruma sağlanıp sağlanmadığını belirlemek amaçlandı. Nrf2'nin çekirdeğe yer değiştirmesi anlamlı derecede gerçekleşmesine rağmen bu durum analiz edilen antioksidan aktivitelerine yansımada ancak, BLM kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TOS'ta azalış sağladığı gösterilen yüksek dozda E-CG-01'in bu sonuç ile uyumlu olarak Nrf2'nin nükleer translokasyonunda artış sağladığı belirlendi (Şekil 4.20). Tüm analizler bir arada değerlendirildiğinde sonuçlar, yüksek dozda E-CG-01'in Nrf2 nükleer birikiminde artış sağlayıp bu hastalık modelinin patofizyolojisi ile bağlantılı artan ROS artışını engelleyerek akciğer fibrozisine karşı koruma sağlamış olabileceğini gösterdi. Histoloji analizlerinin değerlendirilmesi sonucunda ise E-CG-01'in üç farklı dozunun da fibrozisin ilerlemesine karşı koruyucu etkisi olduğu görüldü. Ancak bunun olası mekanizması tam olarak belirlenemedi. Bu sonuç E-CG-01'in antioksidan etkisi dışında telomeraz aktivatörü olma özelliği ile telomerleri uzatması gibi diğer fibrozisi önleyici mekanizmalar açısından da etkili olabileceğini göstermiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, BLM ile elde edilen deneysel fare akciğer fibrozisi modelinde, mekanizması tam bilinmemekle birlikte üç farklı dozda kullanılan E-CG-01'in profilaktik etkisi olduğu görüldü.

Molekölün fibrozisin ilerlemesini önleyici etkisi histoloji analizleri ile incelendi. Düşük, ara ve yüksek dozda uygulanan molekülün, BLM kaynaklı artan alveol duvar kalınlığı ve tip I kollajen yoğunluğu gibi akciğer fibrozisinin belirtilerinde BLM kontrol grubuna kıyasla azalma sağladığı belirlendi. Antioksidan özellikleri açısından bu etkinin olası mekanizmasının değerlendirilmesinde TOS, katalaz ve SOD aktivite, total GSH, MDA ölçümü için spektrofotometrik yöntemler ve Nrf2'nin nükleer protein seviyesini belirlemek üzere western blot analizi gerçekleştirildi. Yalnızca yüksek dozda E-CG-01 uygulanan deney grubunda Nrf2 nükleer protein seviyesinde artış olduğu görüldü; ayrıca, bu sonuç ile uyumlu olarak TOS seviyesinde anlamlı azalış olduğu belirlendi. Ancak antioksidan aktivitesinde/seviyesinde değişim olmadığı görüldü.

Yüksek dozda E-CG-01 uygulaması ile -antioksidanların ekspresyonunun artışına etki etmesi beklenen- artan Nrf2 nükleer protein seviyesi sayesinde BLM'den kaynaklı yükselen ROS ve/veya RNS seviyelerinin azalması sonucu DNA ve AEC hasarının ve sonrasında gelişen ROS/RNS kaynaklı diğer fibrozis oluşum yollarının engellenmiş olabileceği düşünülmektedir.

Molekülün çözünürlüğünün arttırılmasıyla biyoyararlanımının da artma ihtimali ile birlikte daha etkili sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca molekül uygulanan gün sayısının attırılmasıyla düşük ve ara dozlarda da E-CG-01'in antioksidan özelliğinin daha etkili olması mümkün olabilir. Ek olarak, akciğer fibrozisinin heterojen patern göstermesi sebebiyle akciğer dokusunun küçük parçalara ayrılarak farklı analizler için dağıtılması tutarsız sonuçlara sebebiyet verebilir. Bu sebeple daha az sayıda analiz yaparak ya da sıçan gibi daha büyük akciğere sahip deneklerle çalışılmasıyla birlikte her deney grubuna ait bir farenin -akciğerinin en az üç farklı bölgesinden- 3 tekrarlı doku

örneğin analiz edilmesinin bu hastalık modeli için daha tutarlı sonuçlar sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak bazı iyileştirmelerin gerçekleştirilebilmesi durumunda sonuçları destekleyecek daha kapsamlı çalışmaların yapılması için umut verici sonuçlar elde edilmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adler, M., Mayo, A., Zhou, X., Franklin, R.A., Meizlish, M.L., Medzhitov, R., Kallenberger, S.M., and Alon, U.,** 2020, Principles of Cell Circuits for Tissue Repair and Fibrosis, *ISCIENCE*, 23(2).
- Aguilar, S., Scotton, C.J., McNulty, K., Nye, E., Stamp, G., Laurent, G., Bonnet, D., and Janes, S.M.,** 2009, Bone Marrow Stem Cells Expressing Keratinocyte Growth Factor via an Inducible Lentivirus Protects against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis, *PloS one*, 4(11): e8013.
- Alder, J.K., L. Chen, J.J., Lancaster, L., Danoff, S., Su, S., Cogan, J.D., Vulto, I., Xie, M., Qi, X., Tudor, R.M., Phillips, J.A., Lansdorp, P.M., Loyd, J.E., and Armanios, M.Y.,** 2008, Short Telomeres Are a Risk Factor for Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35): 13051–13056.
- Alhajj, M., Bansal, P., and Goyal, A.,** 2020, Physiology, Granulation Tissue, StatPearls. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554402/#__NBK554402_dtls__. (Erişim Tarihi 26.10.20).
- Ali, B.H. and Mousa, H.M.,** 2015, Effect of Dimethyl Sulfoxide on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats, *Human & experimental toxicology*, 20(4): 199–203.
- Allawzi, A., Elajaili, H., Redente, E.F., and Nozik-Grayck, E.,** 2020, Oxidative Toxicology of Bleomycin: Role of the Extracellular Redox Environment, *Current Opinion in Toxicology*, 13: 68–73.
- Aono, Y., Nishioka, Y., Inayama, M., Ugai, M., Kishi, J., Uehara, H., Izumi, K., and Sone, S.,** 2005, Imatinib as a Novel Antifibrotic Agent in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice, (20).
- Aoshiba, K., Tsuji, T., Kameyama, S., Itoh, M., Semba, S., Yamaguchi, K., and Nakamura, H.,** 2013, Experimental and Toxicologic Pathology Senescence-Associated Secretory Phenotype in a Mouse Model of Bleomycin-Induced Lung Injury, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(7–8): 1053–1062.
- Armanios, M.,** 2012, Telomerase and Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 730(1–2): 52–58.
- Arora, A., Bhuria, V., Hazari, P.P., Pathak, U., Mathur, S., Roy, B.G., Sandhir, R.,**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Soni, R., Dwarakanath, B.S., and Bhatt, A.N.**, 2018, Amifostine Analog, DRDE-30, Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice, *Frontiers in pharmacology*, 9: 394.
- Atamer, T.**, 2020, Hemostaz Mekanizması, *TÜRK HEMATOLOJİ DERNEĞİ*.
- Bajpai, V.B., Rather, I.A., and Shukla, S.**, 2016, Oxidative Stress: Role of Natural Antioxidant Compounds. In *Microbes in Food and Health*, , 65–75.
- Barbayianni, I., Ninou, I., Tzouveleakis, A., and Aidinis, V.**, 2018, Bleomycin Revisited: A Direct Comparison of the Intratracheal Micro-Spraying and the Oropharyngeal Aspiration Routes of Bleomycin Administration in Mice, *Frontiers in medicine*, 5: 269.
- Barratt, S.L., Creamer, A., Hayton, C., and Chaudhuri, N.**, 2018, Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF): An Overview, *Journal of clinical medicine*, 7(8): 201.
- Bartnik, M. and Facey, P.C.**, 2017, Glycosides. In *Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies*, Elsevier Inc., 101–161.
- Bedir, E.**, 1998, Bazı Astragalus Türlerinin Sikloartan Triterpenik Saponozitleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi.
- Bobrysheva, I. V. and Kachshenko, S.A.**, 2011, Histology Cytology Embryology, Lugansk State Medical University.
- Bogatkevich, G.S., Ludwicka-bradley, A., Nietert, P.J., Akter, T., Ryn, J. Van, and Silver, R.M.**, 2011, Antiinflammatory and Antifibrotic Effects of the Oral Direct Thrombin Inhibitor Dabigatran Etxilate in a Murine Model of Interstitial Lung Disease, 63(5): 1416–1425.
- Boots, A.W., Veith, C., Albrecht, C., Bartholome, R., Driittij, M.J., Claessen, S.M.H., Bast, A., Rosenbruch, M., Jonkers, L., Van Schooten, F.J., and Schins, R.P.F.**, 2020, The Dietary Antioxidant Quercetin Reduces Hallmarks of Bleomycin-Induced Lung Fibrogenesis in Mice, *BMC Pulmonary Medicine*, 20: 1–16.
- Borensztajn, K., Crestani, B., and Kolb, M.**, 2013, Idiopathic Pulmonary Fibrosis : From Epithelial Injury to Biomarkers – Insights from the Bench Side, *Respiration*, 86(6): 441–452.
- Borges, K.B., Borges, W. de S., Durán-Patrón, R., Pupo, M.T., Bonato, P.S., and**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Collado, I.G.**, 2009, Stereoselective Biotransformations Using Fungi as Biocatalysts, *Tetrahedron Asymmetry*, 20(4): 385–397.
- Borrel, B.**, 2012, Lawsuit Challenges Anti-Ageing Claims, *Nature*, 488: 2012.
- Bowler, R.P., Nicks, M., Warnick, K., and Crapo, J.D.**, 2002, Role of Extracellular Superoxide Dismutase in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 282(4): 719–726.
- Boyacı, H., Maral, H., Turan, G., Başıyigit, İ., Dillioğlu, M.Ö., Yıldız, F., Tugay, M., Pala, A., and Erçin, C.**, 2006, Effects of Erdosteine on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 281: 129–137.
- Bringardner, B.D., Baran, C.P., Eubank, T.D., and Marsh, C.B.**, 2008, The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Antioxidants & redox signaling*, 10(2): 287–302.
- Cai, H., Rufini, A., Horner-Glister, E., and Jawad, D.**, 2015, Cancer Chemoprevention: Evidence of a Nonlinear Dose Response for the Protective Effects of Resveratrol in Humans and Mice, *Science translational medicine*, 7(298): 298ra117-298ra117.
- Camelo, A., Dunmore, R., Sleeman, M.A., and Clarke, D.L.**, 2014, The Epithelium in Idiopathic Pulmonary Fibrosis : Breaking the Barrier, *Frontiers in pharmacology*, 4: 173.
- Cargnoni, A., Gibelli, L., Tosini, A., Signoroni, P.B., Nassuato, C., Arienti, D., Lombardi, G., Albertini, A., Wengler, G.S., and Parolini, O.**, 2009, Transplantation of Allogeneic and Xenogeneic Placenta-Derived Cells Reduces Bleomycin-Induced Lung Fibrosis, 18: 405–422.
- Carlson, B.M.**, 2014, Digestive and Respiratory Systems and Body Cavities. In *Human Embriology & Developmental Biology*, Philadelphia, 749–757.
- Carrington, R., Jordan, S., Pitchford, S.C., and Page, C.P.**, 2018, Use of Animal Models in IPF Research, *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 51: 73–78.
- Chapple, S.J., Siow, R.C.M., and Mann, G.E.**, 2012, Crosstalk between Nrf2 and the Proteasome: Therapeutic Potential of Nrf2 Inducers in Vascular Disease and Aging, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(8): 1315–1320.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, W., Li, S., Li, J., Zhou, W., Wu, S., Xu, S., Cui, K., Zhang, D.D., and Liu, B.,** 2016, Artemisitene Activates the Nrf2-Dependent Antioxidant Response and Protects against Bleomycin-Induced Lung Injury, *FASEB Journal*, 30(7): 2500–2510.
- Cheresh, P., Kim, S.-J., Tulasiram, S., and Kamp, D.W.,** 2013, Oxidative Stress and Pulmonary Fibrosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(7): 1028–1040.
- Chioma, O.S. and Drake, W.P.,** 2017, Role of Microbial Agents in Pulmonary Fibrosis, *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90: 219–227.
- Cho, H.-Y., Reddy, S.P.M., Yamamoto, M., and Kleeberger, S.R.,** 2004, The Transcription Factor NRF2 Protects against Pulmonary Fibrosis, *The FASEB Journal*, 18(11): 1258–1260.
- Chu, H., Shi, Y., Jiang, S., Zhong, Q., Zhao, Y., Liu, Q., Ma, Y., Shi, X., Ding, W., Zhou, X., Cui, J., Jin, L., and Guo, G.,** 2017, Treatment Effects of the Traditional Chinese Medicine Shenks in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis through Regulation of TGF-Beta / Smad3 Signaling and Oxidative Stress, *Scientific Reports*, 7(2252): 1–12.
- Chuquimia, O.D., Petursdottir, D.H., Periolo, N., and Fernández, C.,** 2013, Alveolar Epithelial Cells Are Critical in Protection of the Respiratory Tract by Secretion of Factors Able To Modulate the Activity of Pulmonary Macrophages and Directly Control Bacterial Growth, *Infection and immunity*, 81(1): 381–389.
- Coward, W.R., Saini, G., and Jenkins, G.,** 2010, The Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Therapeutic advances in respiratory disease*, 4(6): 367–388.
- Cowley, P.M., Roberts, C.R., and Baker, A.J.,** 2019, Monitoring the Health Status of Mice with Bleomycin-Induced Lung Injury by Using Body Condition Scoring, *Comparative medicine*, 69(2): 95–102.
- Day, B.J.,** 2008, Antioxidants as Potential Therapeutics for Lung Fibrosis, *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(2): 355–370.
- Degryse, A.L., Tanjore, H., Xu, X.C., Polosukhin, V. V., Jones, B.R., McMahon, F.B., Gleaves, L.A., Blackwell, T.S., and Lawson, W.E.,** 2010, Repetitive Intratracheal Bleomycin Models Several Features of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 299(4): 442–452.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Della Latta, V., Cecchetti, A., Comelli, L., Ucciferri, N., C, D.P., Terreni, M., Burchielli, S., Pelosi, G., and Rocchiccioli, S.,** 2018, A Proteomics Approach to the Study of Bleomycin- Induced Lung Fibrosis, 5: 1–7.
- Della Latta, V., Cecchetti, A., Del Ry, S., and Morales, M.A.,** 2015, Bleomycin in the Setting of Lung Fibrosis Induction: From Biological Mechanisms to Counteractions, *Pharmacological Research*, 97: 122–130.
- Désogère, P., Tapias, L.F., Rietz, T.A., Rotile, N., Blasi, F., Day, H., Elliott, J., Fuchs, B.C., Lanuti, M., and Caravan, P.,** 2017a, Optimization of a Collagen-Targeted PET Probe for Molecular Imaging of Pulmonary Fibrosis, *Journal of Nuclear Medicine*, 58(12): 1991–1996.
- Désogère, P., Tapias, L.F., Rietz, T.A., Rotile, N., Blasi, F., Day, H., Elliott, J., Fuchs, B.C., Lanuti, M., and Caravan, P.,** 2017b, Optimization of a Collagen-Targeted Positron Emission Tomography Probe for Molecular Imaging of Pulmonary Fibrosis., *Journal of Nuclear Medicine*,: 617–643.
- Doğan, A.A., Taşdemir, Ş., Bedir, E., and A., Ş.,** 2016, “Effects of Cycloastragenol on an in Vitro Parkinson’s Disease Model”, Poster, Basel, Switzerland, <https://zenodo.org/record/154344#.XfDxEjMzbIU> (Erişim Tarihi: 11/12/2019).
- Donohue, J.F.,** 2006, Ageing, Smoking and Oxidative Stress, *Thorax*, 61: 461–462.
- Duffield, J.S., Lupher, M., Thannickal, V.J., and Wynn, T.A.,** 2013, Host Responses in Tissue Repair and Fibrosis, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 8: 241–276.
- Duman, S.,** 2019, FUNGAL BIOTRANSFORMATION OF NOVEL 20 (27)-OCTANOR CYCLOASTRAGENOL AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE PURIFIED, MSc Thesis, İzmir Institute of Technology.
- Eroğlu, E.,** 2010, Akciğerlerin Prenatal ve Postnatal Dönemlerdeki Gelişiminin Sıçan Modeli Üzerinde Işık Mikroskopik Düzeyde Araştırılması: Embriyolojik ve Histokimyasal Bir Çalışma, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi.
- Evans, W.C. and Evans, D.,** 2009, Basic Metabolic Pathways and the Origin of Secondary Metabolites-Glycosides. In *Trease and Evans’ Pharmacognosy*, Elsevier Inc., 154–167.
- Fattman, C.L., Chang, L.Y., Termin, T.A., Petersen, L., Enghild, J.J., and Oury,**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

T.D., 2003, ENHANCED BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY DAMAGE IN MICE, *Free Radical Biology & Medicine*, 35(7): 763–771.

Fernandez, I.E. and Eickelberg, O., 2012, The Impact of TGF- β on Lung Fibrosis: From Targeting to Biomarkers, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3): 111–116.

Fois, A.G., Paliogiannis, P., Sotgia, S., Mangoni, A.A., Zinellu, E., Pirina, P., Carru, C., and Zinellu, A., 2018, Evaluation of Oxidative Stress Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Therapeutic Applications: A Systematic Review, *Respiratory research*, 19(1): 51.

Fujimoto, H., Kobayashi, T., and Azuma, A., 2015, Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Treatment and Prognosis, *Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine*, 9(S1): 179–185.

Fujita, M., Ye, Q., Ouchi, H., Harada, E., Inoshima, I., Kuwano, K., and Nakanishi, Y., 2006, Doxycycline Attenuated Pulmonary Fibrosis Induced by Bleomycin in Mice, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(2): 739–743.

Gao, F., Kinnula, V.L., Myllarniemi, M., and Oury, T.D., 2008, Extracellular Superoxide Dismutase in Pulmonary Fibrosis, *Antioxidants & redox signaling*, 10(2): 343–354.

Genetics Home Reference, 2019, “Idiopathic Pulmonary Fibrosis,” <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/idiopathic-pulmonary-fibrosis#> (Erişim Tarihi: 11/04/2019).

Gibbons, M.A., Mackinnon, A.C., Ramachandran, P., Dhaliwal, K., Duffin, R., Pythian-Adams, A.T., Rooijen, N. Van, Haslett, C., Howie, S.E., Simpson, A.J., Hirani, N., Gauldie, J., Iredale, J.P., Sethi, T., and Forbes, S.J., 2011, Ly6Chi Monocytes Direct Alternatively Activated Profibrotic Macrophage Regulation of Lung Fibrosis, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 184(5): 569–581.

Gilhodes, J.C., Jule, Y., Kreuz, S., Stierstorfer, B., Stiller, D., and Wollin, L., 2017, Quantification of Pulmonary Fibrosis in a Bleomycin Mouse Model Using Automated Histological Image Analysis, *PloS one*, 12(1): 1–14.

Glassberg, M.K., 2019, Overview of Idiopathic Pulmonary Fibrosis , Evidence-Based Guidelines , and Recent Developments in the Treatment Landscape, *The American Journal of Managed Care*, 25: S195–S203.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grimminger, F., Günther, A., and Vancheri, C.**, 2015, The Role of Tyrosine Kinases in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *European Respiratory Journal*, 45(5): 1426–1433 <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00149614>.
- Guo, S. and Dipietro, L.A.**, 2010, Factors Affecting Wound Healing, *Journal of dental research*, 89(3): 219–229.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M.T.**, 2008, Wound Repair and Regeneration, *Nature*, 453(7193): 314–321.
- Harley, C.B.**, 2002, Telomerase Is Not an Oncogene, *Oncogene*, 21(4): 494–502.
- Harley, C.B., Chin, A.C., Akama, T., Ip, N.Y., Wong, Y., and Miller-Martini, D.M.**, 2010, United States Patent, US7846904B.
- Harley, C.B., Liu, W., Blasco, M., Vera, E., Andrews, W.H., Briggs, L.A., and Raffaele, J.M.**, 2011, A Natural Product Telomerase Activator As Part of a Health Maintenance Program, *Rejuvenation Research*, 14(1).
- Harvey, C.J., Thimmulappa, R.K., Sethi, S., Kong, X., Brown, R.H., David, F., Wise, R., and Biswal, S.**, 2011, Targeting Nrf2 Signaling Improves Bacterial Clearance by Alveolar Macrophages in Patients with COPD and in a Mouse Model, *Science translational medicine*, 3(78).
- Hecker, L., Logsdon, N.J., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Bernard, K., Hock, T., Meldrum, E., Sanders, Y.Y., and Thannickal, V.J.**, 2014, Reversal of Persistent Fibrosis in Aging by Targeting Nox4-Nrf2 Redox Imbalance, *Science translational medicine*, 6(231): 231ra47.
- Hecker, L.**, 2018, Mechanisms and Consequences of Oxidative Stress in Lung Disease : Therapeutic Implications for an Aging Populace, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 314(4): L642–L653.
- Hemmati, A.A., Pashmforosh, M., Tabandeh, M.R., Rezaie, A., Vardanjani, H.R., Pipelzadeh, M.H., and Karampour, N.S.**, 2019, Protective Effects of Morin Against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 14(4): e79624.
- Herrera, J., Forster, C., Pengo, T., Montero, A., Swift, J., Schwartz, M.A., Henke, C.A., and Bitterman, P.B.**, 2019, Registration of the Extracellular Matrix Components Constituting the Fibroblastic Focus in Idiopathic Pulmonary Fibrosis,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

JCI Insight, 4(1).

Hill, C., Jones, M.G., Davies, D.E., and Wang, Y., 2019, Epithelial-Mesenchymal Transition Contributes to Pulmonary Fibrosis via Aberrant Epithelial/Fibroblastic Cross-Talk, *Journal of lung health and diseases*, 3(2): 31–35.

Ionkova, I., 1995, Astragalus Species (Milk Vetch): In Vitro Culture and the Production of Saponins, Astragaline, and Other Biologically Active Compounds. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry 33 Medicinal and Aromatic Plants VIII*, ed. BAjaj, Y.P.S. New Delhi, India: Springer US, 100–101.

İşisağ Üçüncü, S., Ergen, G., and Arıkan, H., 2009, Histoloji, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 212-218 s.

Izbicki, G., Segel, M.J., Christensen, T.G., Conner, M.W., and Breuer, R., 2002, Time Course of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis, *International journal of experimental pathology*, 83(3): 111–119.

Jun, J.-I. and Lau, L.F., 2018, Resolution of Organ Fibrosis, *The Journal of clinical investigation*, 128(1): 97–107.

Keane, T.J., Horejs, C., and Stevens, M.M., 2018, Scarring vs. Functional Repair: Matrix-Based Strategies to Regulate Tissue Healing, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 129: 407–419.

Keeley, E.C., Mehrad, B., and Strieter, R.M., 2011, The Role of Fibrocytes in Fibrotic Diseases of the Lungs and Heart, *Fibrogenesis & tissue repair*, 4(1): 2–7.

Kendall, R.T. and Feghali-Bostwick, C.A., 2014, Fibroblasts in Fibrosis: Novel Roles and Mediators, *Frontiers in pharmacology*, 5: 1–13.

Khan, Y.S. and Lynch, D.T., 2019, “Histology, Lung”, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534789/> (Erişim Tarihi: 09/12/2019).

Kia’i, N. and Bajaj, T., 2019, “Histology, Respiratory Epithelium”, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541061/> (Erişim Tarihi: 09/12/2019).

Kierszenbaum, A., 2006, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Ankara: Palme Yayıncılık, 339-362s.

Kilic, T., Ciftci, O., Cetin, A., and Kahraman, H., 2014, Preventive Effect of Chrysin

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats, *Inflammation*, 37(6): 2116–2124.
- King, C.S. and Nathan, S.D.**, 2017, Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Effects and Optimal Management of Comorbidities, *The Lancet Respiratory Medicine*, 5(1): 72–84.
- King Jr, T.E., Pardo, A., and Selman, M.**, 2011, Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *The Lancet*, 378(9807): 1949–1961.
- Kliment, C.R. and Oury, T.D.**, 2010, Oxidative Stress, Extracellular Matrix Targets, and Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Free Radical Biology and Medicine*, 49(5): 707–717 <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.036>.
- Klinberg, F., Hinz, B., and White, E.S.**, 2013, The Myofibroblast Matrix: Implications for Tissue Repair and Fibrosis, *The Journal of pathology*, 229(2): 298–309.
- Koh, T.J. and DiPietro, L.A.**, 2011, Inflammation and Wound Healing: The Role of the Macrophage, *Expert reviews in molecular medicine*, 13: e23.
- Kolb, M., Bonella, F., and Wollin, L.**, 2017, Therapeutic Targets in Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Respiratory medicine*, 131: 49–57.
- Kong, C.M., Lee, X.W., and Wang, X.**, 2013, Telomere Shortening in Human Diseases, *The FEBS journal*, 280(14): 3180–3193.
- Koziel, J.E., Fox, M.J., Steding, C.E., Sprouse, A.A., and Herbert, B.**, 2011, Medical Genetics and Epigenetics of Telomerase, *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(3): 457–467.
- Kuban, M., Gaye, O., and Bedir, E.**, 2010, Biotransformation of Cycloastragenol by *Cunninghamella Blakesleeana* NRRL 1369 Resulting in a Novel Framework, *Organic Letters*, 12(19): 4252–4255.
- Kurundkar, A. and Thannickal, V.J.**, 2016, Redox Mechanisms in Age-Related Lung Fibrosis, *Redox Biology*, 9: 67–76.
- Kurutas, E.B.**, 2016, The Importance of Antioxidants Which Play the Role in Cellular Response against Oxidative/Nitrosative Stress: Current State, *Nutrition Journal*, 15(71): 1–22.
- Kwak, G., Choi, S.H., and Kim, H.**, 2010, Dimethyl Sulfoxide Elevates Hydrogen

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Peroxide-Mediated Cell Death in *Saccharomyces Cerevisiae* by Inhibiting the Antioxidant Function of Methionine Sulfoxide Reductase A, *BMB reports*, 43(9): 622–628.

Lederer, D.J. and Martinez, F.J., 2018, Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *New England Journal of Medicine*, 378(19): 1811–1823.

Le Saux, J.C., Davy, P., Brampton, C., Ahuja, S.S., Fauce, S., Shivshankar, P., Nguyen, H., Ramaseshan, M., Tressler, R., Pirot, Z., Harley, C.B., and Allsopp, R., 2013, A Novel Telomerase Activator Suppresses Lung Damage in a Murine Model of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *PLoS One*, 8(3): 1–12.

Li, X., Bi, Z., Liu, S., Gao, S., Cui, Y., Huang, K., Huang, M., Mao, J., Li, L., Gao, J., Sun, T., Zhou, H., and Yang, C., 2019, Antifibrotic Mechanism of Cinobufagin in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice, *Frontiers in Pharmacology*, 10: 1–14.

Liang, C., Xue, Z., Cang, J., Wang, H., and Li, P., 2011, Dimethyl Sulfoxide Induces Heme Oxygenase-1 Expression via JNKs and Nrf2 Pathways in Human Umbilical Vein Endothelial Cells, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 355(1–2): 109–115.

Liu, P., Miao, K., Zhang, L., Mou, Y., Xu, Y., Xiong, W., Yu, J., and Wang, Y., 2020, Curdione Ameliorates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis by Repressing TGF- β -Induced Fibroblast to Myofibroblast Differentiation, *Respiratory Research*, 21(1): 1–10.

Liu, Q., Gao, Y., and Ci, X., 2019, Role of Nrf2 and Its Activators in Respiratory Diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

Liu, T., Santos, F.G.D.L., and Phan, S.H., 2017, The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis. In *Fibrosis: Methods and Protocols*, ed. Rittie, L. New York, NY.: Humana Press, 27–42.

Liu, Y.L., Chen, B.Y., Nie, J., Zhao, G.H., Zhuo, J.Y., Yuan, J., Li, Y.C., Wang, L.L., and Chen, Z.W., 2020, Polydatin Prevents Bleomycin - Induced Pulmonary Fibrosis by Inhibiting the TGF- β /Smad/ERK Signaling Pathway, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(5): 1–13.

Lomas, N.J., Watts, K.L., Akram, K.M., Forsyth, N.R., and Spiteri, M.A., 2012, Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Immunohistochemical Analysis Provides Fresh Insights into Lung Tissue Remodelling with Implications for Novel Prognostic Markers, *International journal of clinical and experimental pathology*, 5(1): 58–71.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lushchak, V.I.**, 2014, Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Its Classification, *Chemico-Biological Interactions*, 224: 164–175.
- Maharaj, S., Shimbori, C., and Kolb, M.**, 2013, Fibrocytes in Pulmonary Fibrosis: A Brief Synopsis, *European Respiratory Review*, 22(130): 552–557.
- Maher, T.M.**, 2012, Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Pathobiology of Novel Approaches to Treatment, *Clinics in Chest Medicine*, 33(1): 69–83.
- Maher, T.M., Aar, E.M. Van Der, Steen, O. Van De, Allamassey, L., Desrivot, J., Dupont, S., Fagard, L., Ford, P., Fieuw, A., and Wuyst, W.**, 2018, Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of GLPG1690, a Novel Autotaxin Inhibitor, to Treat Idiopathic Pulmonary Fibrosis (FLORA): A Phase 2a Randomised Placebo-Controlled Trial, *The Lancet Respiratory Medicine*, 6(8): 627–635.
- Man, W., Ming, D., Fang, D., Chao, L., and Jing, C.**, 2014, Dimethyl Sulfoxide Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Injury in Cardiomyocytes via Heme Oxygenase-1, *Journal of cellular biochemistry*, 115(6): 1159–1165.
- Margaritopoulos, G.A., Vasarmidi, E., Jacob, J., Wells, A.U., and Antoniou, K.M.**, 2015, Smoking and Interstitial Lung Diseases, *European Respiratory Review*, 24(137): 428–435.
- Martinez, F.J., Collard, H.R., Pardo, A., Raghu, G., Richeldi, L., Selman, M., Swigris, J.J., Taniguchi, H., and Wells, A.U.**, 2017, Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Nature Reviews Disease Primers*, 3(17074): 1–19.
- Mcdonough, J.E., Martens, D.S., Tanabe, N., Ahangari, F., Verleden, S.E., Maes, K., Verleden, G.M., Kaminski, N., Hogg, J.C., Nawrot, T.S., Wuyts, W.A., and Vanaudenaerde, B.M.**, 2018, A Role for Telomere Length and Chromosomal Damage in Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Respiratory Research*, 19(132): 1–8.
- Meltzer, E.B. and Noble, P.W.**, 2008, Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Orphanet journal of rare diseases*, 3(8).
- Meo, S. Di, Reed, T.T., Venditti, P., and Victor, V.M.**, 2016, Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Mercer, R.R., Russell, M.L., and Crapo, J.D.**, 1994, Alveolar Septal Structure in

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Different Species, *Journal of Applied Physiology*, 77(3): 1060–1066.

Meyerholz, D.K., Suarez, C.J., Dintzis, S.M., and Frevert, C.W., 2018, Respiratory System. In *Comparative Anatomy and Histology*, Elsevier Inc., 147–162.

Mi, S., Li, Z., Yang, H.Z., Liu, H., Wang, J.P., Ma, Y.G., Wang, X.X., Liu, H.Z., Sun, W., and Hu, Z.W., 2011, Blocking IL-17A Promotes the Resolution of Pulmonary Inflammation and Fibrosis Via TGF- β 1-Dependent and -Independent Mechanisms, *The Journal of Immunology*, 187(6): 3003–3014.

Mikamo, M., Kitagawa, K., Sakai, S., Uchida, C., Ohhata, T., Nishimoto, K., Niida, H., Suzuki, S., Nakayama, K.I., Inui, N., Suda, T., and Kitagawa, M., 2018, Inhibiting Skp2 E3 Ligase Suppresses Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis, *International journal of molecular sciences*, 19(2): 474.

Milton, P.L., Dickinson, H., Jenkin, G., and Lim, R., 2012, Assessment of Respiratory Physiology of C57BL/6 Mice Following Bleomycin Administration Using Barometric Plethysmography, *Respiration*, 83(3): 253–266.

Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., and Kolb, M., 2008a, The Bleomycin Animal Model: A Useful Tool to Investigate Treatment Options for Idiopathic Pulmonary Fibrosis ?, 40: 362–382.

Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., Kolb, M., 2008b, The Bleomycin Animal Model: A Useful Tool to Investigate Treatment Options for Idiopathic Pulmonary Fibrosis?, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(3): 362–382.

Molina-Molina, M., Agusti, A., Crestani, B., Schwartz, D.A., Königshoff, M., Chambers, R.C., Maher, T.M., Faner, R., Mora, A.L., Rojas, M., Antoniou, K.M., and Sellares, J., 2017, Towards a Global Initiative for Fibrosis Treatment (GIFT), *ERJ open research*, 3(4): 1–7.

Molyneaux, P.L. and Maher, T.M., 2013, The Role of Infection in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *European Respiratory Review*, 22(129): 376–381.

Moore, B.B., Lawson, W.E., Oury, T.D., Sisson, T.H., Raghavendran, K., and Hogaboam, C.M., 2013, Animal Models of Fibrotic Lung Disease, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 49(2): 167–179.

Moore, B.B. and Hogaboam, C.M., 2008, Murine Models of Pulmonary Fibrosis,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 294(2): L152–L160.

Moore, Persaud, T.V.N., and Torchia, M.G., 2016, *The Developing Human Developing Human-Clinically Oriented Embryology*, 10th ed. Philadelphia: Elsevier.

Mora, A.L., Rojas, M., Pardo, A., and Selman, M., 2017, Emerging Therapies for Idiopathic Pulmonary Fibrosis, a Progressive Age-Related Disease, *Nature Publishing Group*, 16(11): 755–772.

Mouratis, M.A. and Aidinis, V., 2011, Modeling Pulmonary Fibrosis with Bleomycin, *Current opinion in pulmonary medicine*, 17(5): 355–361.

Musellim, B., Okumus, G., Uzaslan, E., Akgün, M., Cetinkaya, E., Turan, O., Akkoclu, A., Hazar, A., Kokturk, N., Calisir, H.C., and Group, T.I.L.D., 2014, Epidemiology and Distribution of Interstitial Lung Diseases in Turkey, *The clinical respiratory journal*, 8(1): 55–62.

Naikawadi, R.P., Disayabutr, S., Mallavia, B., Donne, M.L., Green, G., La, J.L., Rock, J.R., Looney, M.R., and Wolters, P.J., 2016, Telomere Dysfunction in Alveolar Epithelial Cells Causes Lung Remodeling and Fibrosis, *JCI insight*, 1(14): 1–11.

O'Reilly, P.J., Ding, Q., Akthar, S., Cai, G., Genschmer, K.R., Patel, D.F., Jackson, P.L., Viera, L., Roda, M., Locy, M.L., Bernstein, E.A., Lloyd, C.M., Bernstein, K.E., Snelgrove, R.J., and Blalock, J.E., 2017, Angiotensin-Converting Enzyme Defines Matrikine-Regulated Inflammation and Fibrosis, *JCI insight*, 2(22).

Odajima, N., Betsuyaku, T., Nagai, K., Moriyama, C., Wang, D.H., Takigawa, T., Ogino, K., and Nishimura, M., 2010, The Role of Catalase in Pulmonary Fibrosis, *Respiratory Research*, 11(1): 183.

Oh, C.K., Murray, L.A., and Molfino, N.A., 2012, Smoking and Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Pulmonary medicine*, 2012: 1–13.

Oku, H., Shimizu, T., Kawabata, T., Nagira, M., Hikita, I., Ueyama, A., Matsushima, S., Torii, M., and Arimura, A., 2008, Anti Fibrotic Action of Pirfenidone and Prednisolone: Different Effects on Pulmonary Cytokines and Growth Factors in Bleomycin-Induced Murine Pulmonary Fibrosis, *European Journal of Pharmacology*, 590(1–3): 400–408.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olson, A.L., Gifford, A.H., Inase, N., Fernández Pérez, E.R., and Suda, T.,** 2018, The Epidemiology of Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Interstitial Lung Diseases at Risk of a Progressive-Fibrosing Phenotype, *European Respiratory Review*, 27(150): 1–10.
- Otoupalova, E., Smith, S., Cheng, G., and Thannickal, V.J.,** 2020, Oxidative Stress in Pulmonary Fibrosis, *Comprehensive Physiology*, 10: 509–547.
- Özibilim, G., Ören, N., and Özdemir, T.,** 2003, Akciğer Tüberkülozunda Ekstraselüler Matriks Proteinlerinin Granülom Yapılanmasındaki Rolü, *Türkiye Ekopatoloji Dergisi*, 9(3–4): 57–62.
- Pan, Y., Fu, H., Kong, Q., Xiao, Y., Shou, Q., Chen, H., Ke, Y., and Chen, M.,** 2014, Prevention of Pulmonary Fibrosis with Salvianolic Acid A by Inducing Fibroblast Cell Cycle Arrest and Promoting Apoptosis, *Journal of Ethnopharmacology*, 155(3): 1589–1596.
- Pleasant, R. and Tighe, R.M.,** 2019, Management of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Annals of Pharmacotherapy*, 53(12): 1238–1248.
- Povedano, J.M., Martinez, P., Flores, J.M., Mulero, F., and Blasco, M.A.,** 2015, Mice with Pulmonary Fibrosis Driven by Telomere Dysfunction, *Cell Reports*, 12(2): 286–299.
- Povedano, J.M., Martinez, P., Serrano, R., Agueda, T., Gomez-Lopez, G., Bobadilla, M., Flores, J.M., Bosch, F., and Blasco, M.A.,** 2018, Therapeutic Effects of Telomerase in Mice with Pulmonary Fibrosis Induced by Damage to the Lungs and Short Telomeres, *Elife*, 7: e31299.
- Qazi, M.A. and Molvi, K.I.,** 2018, Free Radicals and Their Management, *American Journal of Pharmacy And Health Research*, 6(4): 1–10.
- Qi, W., Ding, D., and Salvi, R.J.,** 2008, Cytotoxic Effects of Dimethyl Sulphoxide (DMSO) on Cochlear Organotypic Cultures, *Hearing research*, 236(1–2): 52–60.
- Quinlan, T., Spivack, S., and Mossman, B.T.,** 1994, Regulation of Antioxidant Enzymes in Lung after Oxidant Injury, *Environmental health perspectives*, 102: 79–87.
- Raghu, G. and Richeldi, L.,** 2017, Current Approaches to the Management of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Respiratory Medicine*, 129: 24–30.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Richeldi, L., Collard, H.R., and Jones, M.G.**, 2017, Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *The Lancet*, 389(10082): 1941–1952.
- Ruscitti, F., Ravanetti, F., Essers, J., Ridwan, Y., Belenkov, S., Vos, W., Ferreira, F., KleinJan, A., Van Heijningen, P., Van Holsbeke, C., Cacchioli, A., Villetti, G., and Stellari, F.F.**, 2017, Longitudinal Assessment of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis by Micro-CT Correlates with Histological Evaluation in Mice, *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 12(1): 1–10.
- Sadler, T.W.**, 2019, Langman’s Medical Embryology, 14th ed. Hong Kong: Wolters Kluwer.
- Sadowska-Bartosz, I., Paczka, A., Molon, M., and Bartosz, G.**, 2013, Dimethyl Sulfoxide Induces Oxidative Stress in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*, *FEMS yeast research*, 13(8): 820–830.
- Salton, F., Volpe, M.C., and Confalonieri, M.**, 2019, Epithelial–Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Medicina*, 55(83): 1–8.
- Santos-Silva, M.A., Pires, K.M.P., Trajano, E.T.L., Martins, V., Nesi, R.T., Benjamin, C.F., Caetano, M.S., Sternberg, C., Machado, M.N., Zin, W.A., Valenca, S.S., and Porto, L.C.**, 2012, Redox Imbalance and Pulmonary Function in Bleomycin-Induced Fibrosis in C57BL/6, DBA/2, and BALB/c Mice, *Toxicologic Pathology*, 40: 731–741.
- Sauleda, J., Nunez, B., Sala, E., and Soriano, J.B.**, 2018, Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epidemiology, Natural History, Phenotypes, *Medical Sciences*, 6(4): 110.
- Sauler, M., Bazan, I.S., and Lee, P.J.**, 2019, Cell Death in the Lung: The Apoptosis–Necroptosis Axis, *Annual review of physiology*, 81: 375–402.
- Scarpato, R., Castagna, S., Aliotta, R., Azzarà, A., Ghetti, F., Filomeni, E., Giovannini, C., Pirillo, C., Testi, S., Lombardi, S., and Tomei, A.**, 2013, Kinetics of Nuclear Phosphorylation (γ -H2AX) in Human Lymphocytes Treated in Vitro with UVB , Bleomycin and Mitomycin C, *Mutagenesis*, 28(4): 465–473.
- Scholzen, T. and Gerdes, J.**, 2000, The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown, *Journal of Cellular Physiology*, 182(3): 311–322.
- Scotton, C.J., Krupiczkoj, M.A., Königshoff, M., Mercer, P.F., Lee, Y.C.G.,**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaminski, N., Morser, J., Post, J.M., Maher, T.M., Nicholson, A.G., Moffatt, J.D., Laurent, G.J., Derian, C.K., Eickelberg, O., and Chambers, R.C.,** 2009, Increased Local Expression of Coagulation Factor X Contributes to the Fibrotic Response in Human and Murine Lung Injury, *The Journal of clinical investigation*, 119(9): 2550–2563.
- Scotton, C.J. and Chambers, R.C.,** 2010, Bleomycin Revisited: Towards a More Representative Model of IPF?, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 299(4): 439–441.
- Serrano-Mollar, A., Nacher, M., Gay-Jordi, G., Closa, D., Xaubet, A., and Bulbena, O.,** 2007, Intratracheal Transplantation of Alveolar Type II Cells Reverses Bleomycin-Induced Lung Fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(12): 1261–1268.
- Sevimli-Gür, C., Onbaşlar, İ., Atilla, P., Genç, R., Çakar, N., Deliloğlu-Gürhan, İ., and Bedir, E.,** 2011, In Vitro Growth Stimulatory and in Vivo Wound Healing Studies on Cycloartane-Type Saponins of Astragalus Genus, *Journal of Ethnopharmacology journal*, 134: 844–850.
- Sgalla, G., Iovene, B., Calvello, M., Ori, M., Varone, F., and Richeldi, L.,** 2018, Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Pathogenesis and Management, *Respiratory Research*, 19(32): 1–18.
- Shariati, S., Kalantar, H., Pashmforoosh, M., Mansouri, E., and Khodayar, M.J.,** 2019, Epicatechin Protective Effects on Bleomycin-Induced Pulmonary Oxidative Stress and Fibrosis in Mice, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 114: 108776.
- Shi, Y., Dong, M., Zhou, Y., Li, W., Gao, Y., Han, L., Chen, M., Lin, H., Zuo, W., and Jin, F.,** 2019, Distal Airway Stem Cells Ameliorate Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice, *Stem cell research & therapy*, 10(1): 1–11.
- Silva, D.R., Gazzana, M.B., Knorst, M.M., and Menna Barreto, S.S.,** 2008, Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Emphysema in Smokers, *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 34(10): 779–786.
- Silva, M.D.F., Pruccoli, L., Morroni, F., Sita, G., Seghetti, F., Jr, C.V., and Tarozzi, A.,** 2018, The Keap1/Nrf2-ARE Pathway as a Pharmacological Target for Chalcones, *Molecules*, 23(7): 1803.
- Sırmalı, Ş.A.,** 2015, “Genel Embriyoloji”, https://www.academia.edu/21472131/Genel_Embriyoloji (Erişim Tarihi:

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

04/01/2020).

- Smith, M., Dalurzo, M., Panse, P., Parish, J., and Leslie, K.,** 2013, Usual Interstitial Pneumonia-Pattern Fibrosis in Surgical Lung Biopsies. Clinical, Radiological and Histopathological Clues to Aetiology, *Journal of Clinical Pathology*, 66(10): 896–903.
- Smith, R.E., Tran, K., Smith, C.C., Mcdonald, M., Shejwalkar, P., and Hara, K.,** 2016, The Role of the Nrf2/ARE Antioxidant System in Preventing Cardiovascular Diseases, *Diseases*, 4(4): 34.
- Snetselaar, R., van Batenburg, A.A., van Oosterhout, M.F.M., Kazemier, K.M., Roothaan, S.M., Peeters, T., van der Vis, J.J., Goldschmeding, R., Grutters, J.C., and van Moorsel, C.H.M.,** 2017, Short Telomere Length in IPF Lung Associates with Fibrotic Lesions and Predicts Survival, *PloS one*, 12(12): e0189467.
- Spagnolo, P., Tonelli, R., Cocconcelli, E., Stefani, A., and Richeldi, L.,** 2012, Idiopathic Pulmonary Fibrosis : Diagnostic Pitfalls and Therapeutic Challenges, *Multidisciplinary respiratory medicine*, 7(42): 1–10.
- Spagnolo, P., Sverzellati, N., Rossi, G., Cavazza, A., Tzouvelekis, A., Crestani, B., and Vancheri, C.,** 2015, Annals of Medicine Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Update, *Annals of Medicine*, 47(1): 15–27.
- Spagnolo, P., Molyneaux, P.L., Bernardinello, N., Cocconcelli, E., Biondini, D., Fracasso, F., Tine, M., Sietta, M., Maher, T.M., and Balestro, E.,** 2019, The Role of the Lung's Microbiome in the Pathogenesis and Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22): 5618.
- Stevens, L.E., Arnal-estapé, A., and Nguyen, D.X.,** 2018, Pre-Conditioning the Airways of Mice with Bleomycin Increases the Efficiency of Orthotopic Lung Cancer Cell Engraftment, *Journal of visualized experiments : JoVE*, (136): e56650.
- Sueblinvong, V., Neujahr, D.C., Mills, S.T., Roser-Page, S., Ritzenthaler, J.D., Guidot, D., Rojas, M., and Roman, J.,** 2012, Predisposition for Disrepair in the Aged Lung, *The American journal of the medical sciences*, 344(1): 41–51.
- Suzuki, A. and Kondoh, Y.,** 2017, The Clinical Impact of Major Comorbidities on Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Respiratory Investigation*, 55(2): 94–103.
- Swamy, S.M., Rajasekaran, N.S., and Thannickal, V.J.,** 2016, Nuclear Factor–

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Erythroid-2–Related Factor 2 in Aging and Lung Fibrosis, *American Journal of Pathology*, 186(7): 1712–1723.

Swaney, J.S., Chapman, C., Correa, L.D., Stebbins, K.J., Bunday, R.A., Prodanovich, P.C., Fagan, P., Baccei, C.S., Santini, A.M., Hutchinson, J.H., Seiders, T.J., Parr, T.A., Prasit, P., Evans, J.F., and Lorrain, D.S., 2010, A Novel, Orally Active LPA1 Receptor Antagonist Inhibits Lung Fibrosis in the Mouse Bleomycin Model, *British Journal of Pharmacology*, 160: 1699–1713.

Szabo, N.J., 2014, Dietary Safety of Cycloastragenol from Astragalus Spp.: Subchronic Toxicity and Genotoxicity Studies, *Food and chemical toxicology*, 64: 322–334.

Tang, H., Gao, L., Mao, J., He, H., and Liu, J., 2016, Salidroside Protects against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis: Activation of Nrf2-Antioxidant Signaling , and Inhibition of NFκ B and TGF-β 1/Smad-2/-3 Pathways, *Cell Stress and Chaperones*, 21: 239–249.

Tashiro, J., Rubio, G.A., Limper, A.H., Williams, K., Elliot, S.J., Ninou, I., Aidinis, V., Tzouveleakis, A., and Glassberg, M.K., 2017, Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Frontiers in Medicine*, 4(118): 1–11.

Taskar, V.S. and Coultas, D.B., 2006, Is Idiopathic Pulmonary Fibrosis an Environmental Disease?, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4): 293–298.

Thannickal, V.J. and Horowitz, J.C., 2006, Evolving Concepts of Apoptosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4): 350–356.

The Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, 2012, Prednisone, Azathioprine, and N-Acetylcysteine for Pulmonary Fibrosis, *New England Journal of Medicine*, 366(21): 1968–1977.

Thomas, M., Yang, L., and Hornsby, P.J., 2000, Formation of Functional Tissue from Transplanted Adrenocortical Cells Expressing Telomerase Reverse Transcriptase, *Nature Biotechnology*, 18: 39–42.

Trajano, L.A.S.N., Trajano, E.T.L., Lanzetti, M., Mendonça, M.S.A., Guilherme, R.F., Figueiredo, R.T., Benjamim, C.F., Valenca, S.S., Costa, A.M.A., and Porto, L.C., 2016, Elastase Modifies Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice, *Acta Histochemica*, 118(3): 203–212.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Trethewey, S.P. and Walters, G.I.**, 2018, The Role of Occupational and Environmental Exposures in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Narrative Literature Review, *Medicina*, 54(6): 108.
- Upagupta, C., Shimbori, C., Alsilmi, R., and Kolb, M.**, 2018, Matrix Abnormalities in Pulmonary Fibrosis, *European Respiratory Review*, 27(148): 180033.
- Uyanıkgil, Y., Kuruş, M., and Erbil, G.**, 2018, Bir Bakışta Histoloji, 1st ed. İstanbul: İstanbul Kitabevi.
- Valko, M., Morris, H., and Cronin, M.**, 2005, Metals, Toxicity and Oxidative Stress, *Current Medicinal Chemistry*, 12: 1161–1208.
- Vandivort, T.C., An, D., and Parks, W.C.**, 2016, An Improved Method for Rapid Intubation of the Trachea in Mice, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (108): e53771.
- Victorelli, S. and Passos, J.F.**, 2017, Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not, *EBioMedicine*, 21: 14–20.
- Vuorinen, K., Ohlmeier, S., Leppäranta, O., Salmenkivi, K., Myllärniemi, M., and Kinnula, V.L.**, 2008, Peroxiredoxin II Expression and Its Association With Oxidative Stress and Cell Proliferation in Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(10): 951–959.
- Wan, Y., Tian, G., Guo, H., Kang, Y., Yao, Z., Li, X., Liu, Q., and Lin, D.**, 2013, Endostatin, an Angiogenesis Inhibitor, Ameliorates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats, *Respiratory Research*, 14(1): 56.
- Wang, J., Wu, M.L., Cao, S.P., Cai, H., Zhao, Z.M., and Song, Y.H.**, 2018, Cycloastragenol Ameliorates Experimental Heart Damage in Rats by Promoting Myocardial Autophagy via Inhibition of AKT1-RPS6KB1 Signaling, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107: 1074–1081.
- Weiss, R.A. and Weiss, M.A.**, 2014, Evaluation of a Novel Anti-Aging Topical Formulation Containing Cycloastragenol, Growth Factors, Peptides, and Antioxidants, *Journal of Drugs in Dermatology*, 13(9): 1135–1139.
- Wilson, M.S. and Wynn, T.A.**, 2009, Pulmonary Fibrosis: Pathogenesis, Etiology and Regulation, *Mucosal immunology*, 2(2): 103–121.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wolters, P.J., Collard, H.R., and Jones, K.D.**, 2014, Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9: 157–179.
- Wuyts, W.A., Agostini, C., Antoniou, K.M., Bouros, D., Chambers, R.C., Cottin, V., Egan, J.J., Lambrecht, B.N., Lories, R., Parfrey, H., Prasse, A., Robalo-cordeiro, C., Verbeken, E., Verschakelen, J.A., Wells, A.U., and Verleden, G.M.**, 2013, The Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis: A Moving Target, *European Respiratory Journal*, 41(5): 1207–1218.
- Wynn, T.A.**, 2004, FIBROTIC DISEASE AND THE TH1/TH2 PARADIGM, *Nature Reviews Immunology*, 4(8): 583–594.
- Wynn, T.A.**, 2009, Cellular and Molecular Mechanisms of Fibrosis, *The Journal of Pathology*, 214(2): 199–210.
- Xiao, J., Meng, X., Huang, X.R., Chung, A.C.K., Feng, Y., Hui, D.S.C., Yu, C., Sung, J.J.Y., and Lan, H.Y.**, 2012, MiR-29 Inhibits Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice, *Molecular Therapy*, 20(6): 1251–1260.
- Xie, N., Tan, Z., Banerjee, S., Cui, H., Ge, J., Liu, R.M., Bernard, K., Thannickal, V.J., and Liu, G.**, 2015, Glycolytic Reprogramming in Myofibroblast Differentiation and Lung Fibrosis, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 192(12): 1462–1474.
- Xu, J., Gonzalez, E.T., Iyer, S.S., Mac, V., Mora, A.L., Sutliff, R.L., Reed, A., Brigham, K.L., Kelly, P., and Rojas, M.**, 2009, Use of Senescence-Accelerated Mouse Model in Bleomycin-Induced Lung Injury Suggests That Bone Marrow-Derived Cells Can Alter the Outcome of Lung Injury in Aged Mice, *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 64(7): 731–739.
- Yan, B., Ma, Z., Shi, S., Hu, Y., Ma, T., Rong, G., and Yang, J.**, 2017, Sulforaphane Prevents Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice by Inhibiting Oxidative Stress via Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor-2 Activation, *Molecular Medicine Reports*, 15: 4005–4014.
- Yao, H., Wei, S., Xiang, Y., Wu, Z., Liu, W., Wang, B., Li, X., Xu, H., Zhao, J., and Gao, Y.**, 2019, Kangfuxin Oral Liquid Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis via the TGF-B1/Smad Pathway, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- Yildirim, Z., Kotuk, M., Erdogan, H., Iraz, M., Yagmurca, M., Kuku, I., and**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fadillioglu, E.**, 2006, Preventive Effect of Melatonin on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats, *Journal of Pineal Research*, 40: 27–33.
- Yu, Y., Zhou, L., Yang, Y., and Liu, Y.**, 2018, Cycloastragenol: An Exciting Novel Candidate for Age-Associated Diseases (Review), *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16: 2175–2182.
- Yürüker, A.**, 1989, *Primula Veris Subsp. Macrocalyx (Bunge) Lüdi Saponinleri Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar*, Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi.
- Zaafan, M.A., Haridy, A.R., and Abdelhamid, A.M.**, 2019, Amitriptyline Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis: Modulation of the Expression of NF κ B, INOS, and Nrf2, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(3): 279–286.
- Zaman, T. and Lee, J.S.**, 2018, Risk Factors for the Development of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Review, *Current Pulmonology Reports*, 7(4): 118–125.
- Zhang, Wang, Y., Qu, D., Yu, J., and Yang, J.**, 2019, The Possible Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Considering MUC5B, *BioMed Research International*, 2019: 1–12.
- Zhang, Z., Yu, X., Fang, X., Liang, A., Yu, Z., Gu, P., Zeng, Y., He, J., Zhu, H., Li, S., Fan, D., Han, F., Zhang, L., and Yi, X.**, 2015, Preventive Effects of Vitamin D Treatment on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis, *Scientific reports*, 5: 1–10.
- Zhang, Z., Qu, J., Zheng, C., Zhang, P., Zhou, W., Cui, W., Mo, X., Li, L., Xu, L., and Gao, J.**, 2018, Nrf2 Antioxidant Pathway Suppresses Numb-Mediated Epithelial–mesenchymal Transition during Pulmonary Fibrosis, *Cell Death and Disease*, 9(2): 83.
- Zhao, H., Li, C., Li, L., Liu, J., Gao, Y., Mu, K.U.N., Chen, D., Lu, A., Ren, Y., and Li, Z.**, 2020, Baicalin Alleviates Bleomycin - Induced Pulmonary Fibrosis and Fibroblast Proliferation in Rats via the PI3K/AKT Signaling Pathway, *Molecular Medicine Reports*, 21(6): 2321–2334.
- Zhao, Y., Li, Q., Zhao, W., Li, J., Sun, Y., Liu, K., Liu, B., and Zhang, N.**, 2015, Astragaloside IV and Cycloastragenol Are Equally Effective in Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress-Associated TXNIP/NLRP3 Inflammasome Activation in the Endothelium, *Journal of Ethnopharmacology*, 169: 210–218

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhao, Y., Lan, X., Wang, Y., Xu, X., Lu, S., Li, X., Zhang, B., Shi, G., Gu, X., Du, C., and Wang, H., 2018, Human Endometrial Regenerative Cells Attenuate Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice, *Stem Cells International*, 2018.

Zhou, W., Mo, X., Cui, W., Zhang, Z., Li, D., Li, L., Xu, L., Yao, H., and Gao, J., 2016, Nrf2 Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition by Suppressing Snail Expression during Pulmonary Fibrosis, *Scientific Reports*, 6: 1–10.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimine beni kabul eden çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Aylin Şendemir'e, yüksek lisans çalışma konumun belirlenmesinde destek olan, değerli vaktini esirgemeyerek her fırsatta yardımcı olan çok kıymetli hocam Prof. Dr. Erdal Bedir'e, tez çalışmamın her aşamasında ilgi, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen çok kıymetli eş danışmanım Prof. Dr. Yiğit Uyanıkgil'e, biyokimya analizlerinde bir an olsun yalnız bırakmayan, emekleri için minnettar olduğum çok kıymetli Prof. Dr. Dilek Taşkiran Hocam'a, sağlamış olduğu destek ve laboratuvar imkanları için çok kıymetli Prof. Dr. Petek Ballar Kırmızıbayrak hocama, vermiş olduğu destekler için Doç. Dr. Emel Öykü Çetin Uyanıkgil hocama ve istatistiksel analizlerdeki yardımları için çok kıymetli Doç. Dr. Timur Köse hocama en içten duygularıyla teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca başım her sıkıştığında yardımına koşan çok kıymetli arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Canberk Tomruk, Uzm. Biyo. Cansın Şirin ve Burak Çakar'a, çok değerli yardımları ve en önemlisi bana sağladığı motivasyon için kardeşi gibi hissettiren sevgili Araş. Gör. Sinem Yılmaz'a, ayırmış olduğu kıymetli vakti ve destekleri için Uzm. Biyo. Derya Tanrıöver'e, histoloji bilgi ve tecrübelerini paylaşan laboratuvar teknisyeni Erdiç Yılmaz'a, tezimde kullandığım molekülün üretimini sağlayan Araş. Gör. Melis Küçüksolak'a, tez dönemim boyunca vermiş olduğu moral ve destek için sevgili arkadaşım Pınar Güner'e çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi emekleriyle beni bu günlere getiren canım anneme, babama ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim biricik ağabeyime minnettarım.

Tez çalışmamın gerçekleşmesini sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu'na teşekkürü borç bilirim (Proje No: TOA-2019-20914).

29/01/2021

Büşra DAYIOĞLU

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Büşra Dayıoğlu

Eğitim

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Mühendislik Fakültesi/Biyomühendislik	Ege Üniversitesi	2017
Y. Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyomühendislik	Ege Üniversitesi	2021

Staj:

Dokuz Eylül Üniversitesi- İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (İBG-İZMİR),
Terapötik Biyomühendislik Laboratuvarı, 2016

Yer Alınan Projeler

TÜBİTAK 215M888 “Demir oksit (Fe_3O_4) Nanopartikül ve Grafen Katkılı Kendiliğinden Dizilen Peptid Doku Mühendisliği Ürünlerinin *in vitro* ve *in vivo* Parkinson Hastalığı Modellerinde Nörorejeneratif Etkisinin İncelenmesi” (2017-2018).

TÜBİTAK 116Z207 “Kanser Kök Hücre İzolasyonu için Nanobiyoteknolojik Bir Yaklaşım; Afinite Temelli Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi” (2018-2019).

Okseef (Lise Projesi) “Jelleştirilmiş İpek Serisin'i İle Sinir Hücreleri Arasında Köprü Kurarak Felç Tedavisi” (2019).

TÜBİTAK 118S349 “Biyoreaktörde Elde Edilmiş ve Omentum İmplantasyonu ile Damarlandırılmış Hibrit Doku Mühendisliği Ürünlerinde Kordon Kökenli Mezenkimal

Kök Hücrelerin Uzun Boşluklu Özofageal Defektlerin Rejenerasyonuna Etkisinin İncelenmesi” (2018-2020).

Çok Disiplinli Öncelikli Alan Araştırma Projesi (ÖNAP-BAP) TOA-2019-20914: “Farede Bleomisin ile Oluşturulan Deneysel Akciğer Fibrozis Modeline Karşı Sikloastragenol Molekülünün 3,4-lakto Türevinin (3,4-lakto Sikloastragenol) Protektif Etkisinin İncelenmesi” (2019-2021).

