T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ALOE VERA L. BURM. F. JELİNİN VE NANOTEKNOLOJİK FORMÜLASYONLARININAKCİĞER HASARINDA *İN VİTRO* VE *İN VİVO* ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

RABİA SARE YANIKOĞLU

DANIŞMAN
PROF.DR. TUĞBA YILMAZ ÖZDEN

İKİNCİ DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ BEYZA SERVET GÖNCÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2024

İTHAF

Güzel aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktoramı tabir-i caizse ikiye bölen Covid-19 salgını, çok sayıda zorluk ve belirsizliklere rağmen bitirilen, yaptığım seçimim hakkını her bir noktada vermeye çalıştığım bu tezin bitiş çizgisine ulaşmasında emeği olan kişilere minnetlerimi sunmak isterim.

İlk olarak tezimin oluşturulmasında emeği olan, her daim değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteğini esirgemeyen bu yolculuğa beraber başladığım sayın Prof. Dr. Nuriye AKEV'e ve emekliliği sonrasında danışmanlığımı devralan, sürecin tamamlanmasında değerli desteğini her daim hissettiren, özenle yardımları için sayın Prof.Dr. Tuğba YILMAZ ÖZDEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde, emek dolu tecrübelerinin eşlik ettiği zamansız desteği, hayat ve bilim hakkındaki değerli fikir alışverişi, laboratuvarda disiplinle saat misali işleyen deney planlamasını öğrendiğim eş danışmanım sayın Dr.Öğr. Üyesi Beyza Servet GÖNCÜ'ye minnetlerimi sunarım.

Eczacılığa girdiğim 2010 yılından itibaren hayatımında değerli desteğini esirgemeyen, akademik yolculuğumdaki en büyük destekcim olan, çıkmazlarıma aydınlık fikirlerini katan sayın Prof.Dr. Evrim TEKKELİ'ye minnetlerimi sunarım. Tez sürecimin başından beri desteklediği bilimsel çalışma ortamı ve yardıma ihtiyaç olan noktada tereddütsüz yardımcı olan değerli tez izleme jüri üyesi Prof.Dr. Aydan DAĞ'a minnetlerimi sunarım.

Doktora eğitim sürecinde üzerimde emeği olan tez izleme jüri üyesi Prof. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI olmak üzere tüm anabilim dalında bulunan hocalarıma, eğitimim sırasında beraber çalışma imkanı bulduğum Dr. Öğr. Üyesi Gözde HASBAL ÇELİKOK ve Arş. Gör. Gülsüm ALTIPARMAK ÜLBEGİ'ye destekleyici yaklaşımları için teşekkür ederim. Tez projemizde çalıştığımız ön formülasyonu hazırlayan, her noktada danışabildiğim, süreçte her daim yardımcı olan Prof .Dr. Ayca YILDIZ PEKÖZ ve Arş. Gör Dr. Özlem AKBAL DAĞISTAN'a çok teşekkür ederim. Çalışmamızda bulunan histopatolojik çalışmalarda her daim gösterdikleri değerleri destek ve yardımları için Prof. Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi E. Rümeysa HEKİMOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Sürecin en başından beri tezin oluşturulmasında dahil olan her bir noktada danıştığım, laboratuvarda başlangıç noktalarında her bir karede durarak özenle öğrettiği bilgileri ve hayatın stresli anlarındaki destekleri için değerli Arş.Gör.Dr. Sezen ATASOY'a minnetlerimi sunarım. Öğrenciliğimden itibaren her konuda yol göstericiliği, farklı bakış açısı sunması ve çözümleyici fikirleri yaklaşımı ile her zaman yanımda olan değerli Dr.Öğr. Üyesi Dilek ÖZTÜRK CİVELEK'e minnetlerimi sunarım.

Tez sürecindeki zorlukları ve iş hayatını birlikte göğüslediğim desteklerini bir an esirgemeyen ve keyifle geçen deneysel süreçler yaşadığım değerli arkadaşlarım Dr.Öğr Üyesi Ayşenur GÜNAYDIN AKYILDIZ, Arş. Gör. Dr. Gülbahar Özge ALİM TORAMAN, Arş. Gör. Dr. Fatma GÖÇ ve Arş.Gör. Zehra ŞEKER' e ve öğrenci dönemimde asistan hocalarım olan ve sonrasında beraber çalışmanın güzelliğini yaşadığım Dr. Burcu BÜTÜN ve Dr.Öğr Üyesi Demet DİNCEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatıma değerler katan Beyza MUSUL, Canan ÖZTÜRK, Dilara ÖZTÜRK ŞEN, Gülnur DANDİN, Özlem KAYMAK ÇELİK, Seda KORKMAZ ERGİN, Sinem YILMAZ EREN, Sümeyra KÜÇÜK GENÇ'e ve bana teyzeliği hissettiren değerli Meryem'e teşekkür ederim.

Benimle her gün yaşadıklarıma ortak olan, kelimelerimin her bir harfinde ve iyi yapılan her şeyde emeği olan güzel anneme ve babama sonsuz minneti bir borç bilirim.

Bu tez çalışması, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36463

İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER V
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİİ
ABSTRACT ..... Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 14
2. GENEL BİLGİLER 17
2.1. Aloe vera 17
2.1.1. Tarihçesi 17
2.1.2. Botanik Özellikleri 18
2.1.3. Kimyasal Bileşimi 20
2.1.4. *A.vera*'nın Farmakolojik Etkileri 22
2.1.5. *Aloe vera* Jelinin Reolojik Özellikleri 26
2.1.6. *A.vera* Jelinin Teknolojik Formülasyonları 26
2.2. Astım 27
2.2.1. Astımın Tanımı ve Tarihçesi 27
2.2.2. Astımın Epidemiyolojisi 28
2.2.3. Risk Faktörleri 29
2.2.4. Astım Patofizyolojisi 30
2.2.5. Alerjik Astım 31
2.2.6. Alerjik Astımda Etkili Hücreler 33
2.2.7. Alerjik Astımda Prostaglandin D2 (PGD2) Yolağı 34
2.2.8. Eozinofilik İnflamasyon 35
2.2.9. Alerjik Astımda Hayvan Modelleri 37
3. GEREÇ VE YÖNTEM 39
3.1. Gereçler 39
3.1.1. Kullanılan Cihazlar 39

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Ticari Kitler....40
3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri....41
3.2. Yöntemler....42
3.2.1. *In vitro* Deneyler....42
3.2.1.1. *A.vera* Jeli (AJ) Elde Edilmesi....42
3.2.1.2. *A. vera* Jelinden Ön Formülasyonunun Elde Edilmesi (PG-A)....42
3.2.1.3. Hücre Kültürü Deneyleri....43
3.2.1.4. Hücre Canlılık Tayini....44
3.2.1.5. Rölatif mRNA Ekspresyon Deneyleri....45
3.2.1.6. Ko-kültür Deneyleri....49
3.2.1.7. ELISA Deneyleri....51
3.2.2. *In vivo* Deneyler....53
3.2.2.1. Hayvanların Temin Edilmesi ve Takibi....53
3.2.2.2. Akut Astım Modelinin Oluşturulması....53
3.2.2.3. *A.vera* Formülasyonunun Uygulanması....57
3.2.2.4. Farelerin Sonlandırılması ve kan, akciğer örneklerinin toplanması....57
3.2.2.5. Rölatif mRNA Ekspresyon Deneyleri....61
3.2.2.6. ELISA testleri....63
4. BULGULAR....65
4.1. *In vitro* deneyler....65
4.1.1. Hücre Canlılık Deneyi Sonuçları....65
4.1.2. GZ-PZR Deney Sonuçları....68
4.2. *In vivo* Deney Sonuçları....78
4.2.1. Hayvanların Ağırlıkları ve Yem Tüketim Miktarları....78
4.2.2. Hemogram Sonuçları:....81
4.2.3. BALF Örneklerinde mRNA Ekspresyon Seviyeleri....85
4.2.4. Akciğer Dokularının Histoloji Sonuçları....90
5. TARTIŞMA....94
KAYNAKLAR....114
ETİK KURUL KARARI....130
İNTİHAL RAPORU....131

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: *Aloe vera* ‘da bulunan bileşikler……..…21

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları……...39

Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve markaları……..40

Tablo 3-3: Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve markaları……..41

Tablo 3-4: 2X RT Master Karışım İçeriği…….....47

Tablo 3-5: GZ-PZR için kullanılan sitokinlere özgü primer dizileri…….....48

Tablo 3-6: GZ-PZR deneyi için hazırlanan karışımın içeriği…….....48

Tablo 3-7: GZ-PZR deneyinde uygulanan termal protokol……....49

Tablo 3-8: Akut astım modeli oluşturulan gruplar…….….53

Tablo 3-9: GZ-PZR için kullanılan sitokinlere özgü primer dizileri…….…..62

Tablo 3-10: GZ-PZR deneyi için hazırlanan karışımın içeriği…….…...62

Tablo 3-11: GZ-PZR deneyi için uygulanan termal protokol…….....63

Table 4-1: Elde edilen IC50 Değerleri……....68

Tablo 4-2: GZ-PZR deneyinde çalışılan gruplar…….....68-69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: *Aloe vera* (L). Burm.f 18
Şekil 2-2: *A. vera* yaprağının kısımları..... 19
Şekil 2-3: *Aloe vera* yaprak enine kesiti.....20
Şekil 2-4: *A. vera*'nın başlıca bileşiklerinin kimyasal formülleri.....22
Şekil 2-5: *Aloe vera*'nın farmakolojik etkileri.....24
Şekil 2-6: Dünya çapında astım prevalansı.....28
Şekil 2-7: Sağlıklı ve astımlı hava yolu.....31
Şekil 2-8: Astımda Tip2 hava yolu inflamasyonunun altında yatan patobiyolojik mekanizmalar.....32
Şekil 3-1: Ko-kültür deneyinde çalışılan besiyeri adaptasyonu.....50
Şekil 3-2: Ko-kültür deney şeması.....51
Şekil 3-3: BALB/c farelerde akut astım modeli geliştirilmesi.....54
Şekil 3-4: BALB/c farelere intraperitonal yolla OVA/alum uygulanması.....56
Şekil 3-5: BALB/c farelere intranazal yolla OVA uygulanması.....57
Şekil 3-6: BALB/c fareden BALF örneğinin alınma aşaması.....59
Şekil 3-7: Işık mikroskobunda 40X eozinofil hücresi görüntüsü.....60
Şekil 4.1: A549 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan PG-A maruziyetinin iki farklı zaman diliminde (24 ve 48 saat) canlılık yüzdelerindeki değişim.....65
Şekil 4-2: HSAEC hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan PG-A maruziyetinin iki farklı zaman diliminde (24 ve 48 saat) canlılık yüzdelerindeki değişim.....66
Şekil 4-3: A549 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan AJ maruziyetinin iki farklı zaman diliminde (24 ve 48 saat) canlılık yüzdelerindeki değişim.....67
Şekil 4-4: HSAEC hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan AJ maruziyetinin iki farklı zaman diliminde (24 ve 48 saat) canlılık yüzdelerindeki değişim.....67
Şekil 4-5: A549 hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda TNFα mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri.....70
Şekil 4-6: HSAEC hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda TNFα mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri.....70
Şekil 4-7: A549 hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda IL5 mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri.....71
Şekil 4-8: HSAEC hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda IL5 mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri.....72
Şekil 4-9: A549 hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda IL6 mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri.....73
Şekil 4-10: HSAEC hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda IL6 mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri.....73
Şekil 4-11: : A549 hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda IFNγ mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri.....74
Şekil 4-12: : HSAEC hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamalarıyapılan/yapılmayan gruplarda IFNγ mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri……75

Şekil 4-13: Ko-kültürü yapılan HSAEC ve 3 saat ve 6 saat LPS maruziyeti gerçekleştirilen THP-1 hücrelerine, AJ ve PG-A uygulamaları sonucunda elde edilen hu-TNFα ELISA sonuçları..... 76
Şekil 4-14: Ko-kültürü yapılan A549 ve 3 saat ve 6 saat LPS maruziyetigerçekleştirilen THP-1 hücrelerine, AJ ve PG-A uygulamaları sonucunda elde edilen hu-TNFα ELISA sonuçları.....76
Şekil 4-15: Ko-kültürü yapılan A549 ve 3 saat ve 6 saat LPS maruziyeti gerçekleştirilen THP-1 hücrelerine, AJ ve PG-A uygulamaları sonucunda elde edilen hu-IFNγ ELISA sonuçları.....77
Şekil 4-16: Ko-kültürü yapılan HSAEC ve 3 saat ve 6 saat LPS maruziyeti gerçekleştirilen THP-1 hücrelerine, AJ ve PG-A uygulamaları sonucunda elde edilen hu-IFNγ ELISA sonuçları.....78
Şekil 4-17: Akut astım modeli gerçekleştirilen sham ve tedavi gruplarında bulanan uygulama aşamalarındaki fare ağırlıkları değişimi.....79
Şekil 4-18: Akut astım modeli gerçekleştirilen sham (A) ve tedavi (B) gruplarında bulanan uygulama aşamalarındaki yem tüketim miktarları değişimi.....80
Şekil 4-19: Akut astım modelinde çalışılan sham, 48 saat, 96 saat ve 144saat tedavi gruplarının model uygulamasındaki her bir aşamada elde edilen kırmızı kan hücresi (RBC) (A) ve beyaz kan hücresi (WBC) (B) değerleri.....81
Şekil 4-20: Akut astım modelinde çalışılan sham, 48 saat, 96 saat ve 144saat tedavi gruplarının model uygulamasındaki her bir aşamada elde edilen monosit sayısı (MONO) (C) ve monosit yüzdesi(MONO%) (D) değerleri.....83
Şekil 4-21: Akut astım modelinde çalışılan sham, 48 saat, 96 saat ve 144saat tedavi gruplarının model uygulamasındaki her bir aşamada elde lenfosit sayısı (LYM) değerleri.....84
Şekil 4-22: Akut astım modeli uygulanmış BALB/c farelerden alınan BALF örneklerinin TNFα (A), IL5 (B) , IL1β, (C), IL6 (D) mRNA ekspresyon seviyeleri.....85
Şekil 4-23: Akut astım modeli uygulanan BALB/c farelerden alınan serum örneklerinde ELISA deneyleri sonucunda elde edilen OVA-IgE (A) ve TNFα (B) seviyeleri 88
Şekil 4-24: Akut astım modeli uygulanan BALB/c farelerden alınan serum örneklerinde ELISA deneyleri sonucunda elde edilen IL6 seviyeleri.....89
Şekil 4-25:Akut astım modeli uygulanan BALB/c farelerden alınan serum örneklerinde ELISA deneyleri sonucunda elde edilen PGD2 seviyeleri.....90
Şekil 4-26:Sağlıklı kontrol grubuna ait akciğer kesitleri (A: HE X10; B: HEX20). Pozitif kontrol grubuna ait akciğer kesitleri.....91
Şekil 4-27: Tedavi grubuna ait akciğer kesitleri.....93

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A549:	Akciğer Adenokarsinom
AHR:	Hava Yolu Aşırı Duyarlılığı
AMPK:	Amp-Aktive Edici Protein Kinaz
BALF:	Bronkoalveolar Lavaj Sıvısı
ºC:	Santigrat
CCL2:	Kemokin Ligand C2
CD4:	Farklılaşma Kümesi
cDNA:	Tamamlayıcı DNA
COX:	Siklooksijenaz
ELISA :	Enzym Linked Immunosorbent Assay
GM-CSF:	Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
IFNg:	İnterferon Gama
IgE:	İmmünoglobulin E
IL:	İnterlökin
ILC:	Doğuştan Gelen Lenfoid Hücreler
i.n.:	İntranazal
i.p.:	İntraperitonal
JAK1:	Janus Kinaz 1
LPS:	Lipopolisakkarit
LT:	Lökotrien
LYM:	Lenfosit
MAPK:	Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz

µg:	Mikrogram
mL:	Miligram
MONO:	Monosit
MTT:	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
Nfkb:	Nükleer Faktör Kappa B
OVA:	Ovalbumin
PBS:	Fosfat Tampon Salin Çözeltisi
PCL:	Polikaprolakton
PG:	Propilen Glikol
PLGA:	(Poli(Laktik- Ko-Glikolik Asit)
RBC:	Kırmızı Kan Hücresi
GZ-PZR:	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
STAT	Sinyal Dönüştürücü Ve Transkripsiyon 1 Aktivatörü
RNA	Ribonükleik Asit
TGF:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
Th	T Yardımcı Hücre
TLR4	Toll Benzeri Reseptör
TNFa	Tümör Nekroz Faktörü
TSLP:	Timik Stromal Lenfopoietin
VEGFA	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-A
WBC	Beyaz Kan Hücresi

ÖZET

Yanıkoğlu, S.R. (2023). *Aloe vera* L. Burm. f. Jelinin ve Nanoteknolojik Formülasyonlarının Akciğer Hasarında *in vitro* ve *in vivo* Etkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Tarih boyunca mucize bitki olarak bilinen ve halk tarafından kullanılan *A.vera'nın* birçok terapötik etkisi olduğu gösterilmiştir. Terapötik etkinlerin kaynağı *A.vera*'nın içeriğinde bulunan antrakinonlar, glikoproteinler, polisakkaritler, vitaminler ve enzimlerin dahil olduğu birçok fitoterapötik bileşikten ileri gelmektedir. Alerjik kökene sahip hastalıkların karmaşık biyokimyasal mekanizması tam olarak çözülmemiş olup güncel tedavi yöntemleri hastalığı sadece baskılamakta başarılı olabilmektedir. *A.vera*'nın alerjik inflamasyona karşı etkisini araştırmak amacıyla, *A.vera* jeli (AJ) ile ön formülasyon (PG-A) oluşturulmuştur. Çalışmamızın ilk kısmında PG-A'nın ve AJ'nin lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen A549 ve HSAEC hücrelerinde değişen sitokin ekspresyon seviyelerine olan etkisi çalışılmıştır. PG-A'nın pro-inflamatuvar sitokinlerden TNFα, IL6 ve Th2 sitokinlerinden olan IL5 mRNA ekspresyon seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. İkinci kısımda *in vitro* inflamasyon çevresini daha fazla mimik edebilmek adına LPS ile indüklenen THP-1 hücreleri ile A549 ve HSAEC hücre serileri ile ko-kültür deneyi gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda gen ekspresyon sonuçlarına pozitif korele olarak pro-inflamatuvar sitokin seviyeleri PG-A uygulanan gruplarda azalmıştır. .*In vivo* kısımda, BALB/c fareler sağlıklı kontrol, sham ve üç ayrı zaman diliminde PG-A tedavisi uygulanmış olan tedavi grupları (48, 96, 144 saat) olarak sınıflandırılmıştır. Hayvanlara 21 günlük alerjenle indüklenen hava yolu inflamasyon modeli uygulanmış, belirli günlerde hayvan ve yem ağırlık takipleri yapılmış ve hemogram ve ELISA deneyleri için kan alımları gerçekleştirilmiştir. Hayvan ağırlıklarının ve yem ağırlıklarının birbirini destekleyici sonuç verdiği görülmüştür. Model uygulanan grupla azalan hayvan ağırlıkları tedavi grupları ile stabil duruma gelmiştir. Hemogram sonuçlarında değerlendirilen parametreler, sham grubunda alerjenle indüklenen hava yolu inflamasyon modelinin oluşumunu desteklemekte ve tedavi gruplarında ise PG-A uygulamasıyla inflamasyonu baskılayıcı etkiler görülmüştür. Serum örneklerinde ELISA deneyi gerçekleştirilen, en önemli hava yolu inflamasyonu biyobelirteçlerinden olan OVA'ya özgü IgE seviyelerinin model uygulanan aşamalarda arttığı, tedavi gruplarında ise PG-A uygulamasının süresine bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Hayvanların sonlandırılma aşamasında alınan bronkoalveolar lavaj sıvısı (BALF) örneklerinde incelenen TNFα, IL6, IL1β ve IL5 sitokinlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri de PG-A uygulanan tedavi gruplarında model uygulaması yapılan gruplardaki eskpresyon seviyelerine kıyasla azaldığı gösterilmiştir. İrdelenen verilere dayalı olarak PG-A ön formülasyonun alerjik hava yolu inflamasyonuna katkı sağlayacak bir öneme sahip olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alerji, Aloe vera, anti-inflamatuvar, astım, lipopolisakkarit, ovalbumin

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36463

ABSTRACT

Yanıkoğlu, S.R. (2023). *In vitro* and *in vivo* Assessment of the Effects of *Aloe vera* L. Burm. f. Gel and Nanotechnological Formulations on Lung Injury. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Biochemistry. PhD Thesis. Istanbul.

A.vera, known as a miracle plant throughout history and used by the public, has been shown to have many therapeutic effects. The source of these therapeutic effects comes from many phytotherapeutic compounds including anthraquinones, glycoproteins, polysaccharides, vitamins and enzymes. The complex biochemical mechanisms of diseases of allergic origin are not fully understood and current treatment methods are only successful in suppressing the disease. In order to investigate the effect of *A.vera* against allergic inflammation, a pre-formulation was made with *A.vera* gel. In the first part of our study, the effect of the pre-formulation (PG-A) and *A.vera* gel (AJ) on the altered cytokine expression levels in lipopolysaccharide (LPS)-induced A549 and HSAEC cell lines were studied. It was shown that PG-A decreased the mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines TNFα, IL6 and Th2 cytokines IL5. We performed a co-culture experiment in the second part, using LPS-induced THP-1 cells together with A549 and HSAEC cell lines, to further mimic the *in vitro* inflammation environment. As a result of the experiment, pro-inflammatory cytokine levels decreased in PG-A-treated groups in positive correlation with gene expression results. Based on the results of the in vitro experiments, we performed *in vivo* experiments at the selected concentration. BALB/c mice were categorized as healthy control, sham and three different times PG-A treatment groups (48, 96, 144 hours). Animals were subjected to a 21-day allergen-induced airway inflammation model and animal and feed weights were monitored on certain days and blood was collected for hemogram and ELISA assays. It was observed that animal weights and feed weights were supportive of each other. Animal weights, which decreased with the sham model group were stabilized in the treatment groups. The parameters evaluated in the hemogram results supported the formation of allergen-induced airway inflammation model and suppressive effects were observed with PG-A application in the treatment groups. The levels of OVA-specific IgE, which is one of the most important biomarkers of airway inflammation, were shown to increase in the stages of the model application and to decrease in the treatment groups depending on the duration of PG-A application. TNFa, IL6, IL1b and IL5 mRNA expression levels in BALF samples taken at the termination stage of the animals were also shown to decrease in the PG-A treatment groups compared to the expression levels in the model groups. Based on the data analyzed, PG-A pre-formulation derived from *A.vera* seems to have an importance to alleviate to allergic airway inflammation.

Keywords: Allergy, Aloe vera, anti-inflammatory, asthma, lipopolysaccharide, ovalbumin

This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit.

Project No: 36463

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Xanrhorrhoeaceae familyasına dahil olan Aloe cinsinin dünya çapında 360'tan fazla türü bulunmaktadır. *Aloe vera* (*A.vera* (L.) Burm.f.)'nın tıbbi kullanımı antik çağlara kadar uzanmaktadır ve çeşitli kaynaklarda bu bitkinin yaraları iyileştirme, yanıklar, kabızlık, uykusuzluk, mide rahatsızlıkları, hemoroid, saç dökülmesi, güneş yanığı, diş eti hastalıkları ve baş ağrısı gibi çeşitli rahatsızlıklar üzerinde olumlu etkileri olduğu belirtilmektedir (Lee 2006). Düzensiz yağış alan topraklara adapte olabilmek adına yapraklarında su deposu dokusuna sahip olan kserofit bir bitki olan *A.vera,* yaprakları ve jel yapısı antronlar, karbohidratlar, proteinler, glikoproteinler, aminoasitler, organik asitler, saponinler, glukomannanlar, enzimler, lipitler, vitaminler gibi yaklaşık 75 bileşik bulundurmaktadır (Akev ve ark. 2015). Bu biyoaktif bileşiklerin farmakolojik etkileri çalışmalar ile ortaya koyulmuştur. *A.vera* bitkisinin anti-inflamatuvar (Vazquez ve ark. 1996), yara iyileştirici (Heggers ve ark. 1995), antioksidan (Ozsoy ve ark. 2009), antikanser (Erdem Kuruca ve ark. 2020), kardiyo-koruyucu, antidiyabetik (Ozsoy ve ark. 2008), antimikrobiyal (Añibarro-Ortega ve ark. 2019) ve immunomodülatör (Imanishi 1993) etkileri olduğu gösterilmiştir. Bir başka çalışmada *A.vera* jelinin kronik periodontitisli diyabetik hastalarda iyileşmeyi teşvik ettiği, ameliyat sonrası komplikasyonları azalttığı ve cilt yaralarının iyileşme sürecini hızlandırdığı belirtilmiştir (Fallahi ve ark. 2016). Ek olarak *A.vera*'nın kanser hücrelerinin proliferayonunu azalttığı, hücre migrasyonunu baskıladığı, tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2017; Chen ve ark. 2018). Bu geniş farmakolojik etkilerinin yanında *A.vera*'nın anti-inflamatuvar etkisi de birçok çalışma ile gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada *A.vera*'nın içeriğine bulunan aloin etken maddesinin NF-κB yolağını baskıladığı belirtilmiştir (Pengjam ve ark. 2016). Başka bir çalışmada aloin bileşiğinin RAW264.7 hücre serisinde JAK1, STAT1 ve STAT3 yolaklarını inhibe ettiği ortaya koyulmuştur (Ma Yunfei ve ark. 2018). *A.vera* bitkisinin birçok kısmı ile oluşturulan formülasyonlarınının da çeşitli terapötik etkileri araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada, PCL/ *A.vera* ile oluşuturulan formülasyonun fibroblast hücreleirnin f-aktin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Suganya ve ark. 2014). PLGA / *A.vera* bileşiminden meydana getirilen nanofibröz membranın

BALB/c-3T3 hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı belirtilmiştir (Garcia-Orue ve ark. 2017).

GINA (Global Initiative for Asthma) 2023 raporundaki tanımlamaya göre astım, kronik hava yolu inflamasyonu ile karakterize hırıltı, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve öksürük gibi solunum semptomlarına sahip bir hastalıktır. Astım, dünya genelinde %1-29 oranında bir nüfusu etkileyen bir hastalıktır. Astım çoğunlukla doğrudan veya dolaylı uyaranlara karşı gelişen aşırı hava yolu duyarlılığı ve hava yolu inflamasyonu ile ilişkilidir (GINA 2023 p. 22). Dünya genelinde 300 milyon kişiyi etkileyen astım hastalığının 2025 yılına kadar 100 milyon kişiyi düşünülmektedir (The Global Asthma Report 2018). Astım Th2 tip bağışıklık yanıtı sonucunda oluşan hava yolu inflamasyonu ile tetiklenmektedir (Holgate ve ark. 2015). Hastalığın oluşumunda iç ve dış ortam alerjenlerin etkileri olup, bu alerjenler astımın risk faktörleri içersinde yer almaktadır (Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi 2020). Sigara, azot dioksit, ozon, uçucu organik bileşikler, egzoz gibi etmenler astım hastalığın şiddetlenmesinde rol oynamaktadır (Holgate ve ark. 2015).

Astımda hava yolu lümeninin daralması sonucu meydana gelen hava yolu tıkanıklığı hastalığıın spesifik özelliği olarak tanımlanmaktadır. Astımın patofizyolojik örüntüleri bronş aşırı duyarlılığı (BHR), hava yolu düz kasının inhale uyaranlara yanıt olarak kasılması ve akut hava yolu daralması olarak belirtilmektedir. Hava yolunda meydana gelen inflamasyon eozinofiller, nötrofiller, lenfositler, makrofajlar ve mast hücreleri tarafından yönetilmektedir (Lambrecth ve ark. 2019). Astım hava yollarında bulunan T hücrelerinin kritik görevi, inflamatuvar hücreleri kontrol etmektir. Etkili alerjen sinyaller sonucunda T hücrelerinin Th2 hücrelerine farklılaşmasıyla sonuçlanan etkileşimler meydana getirmektedir. Th2 hücreleri pro-alerjik sitokinler olarak adlandırılan IL3, IL4, IL5, IL9, IL13 salgılayarak astımın karakteristik bileşenlerinden olan IgE, mast hücresi ve eozinofil yanıtlarına yol açmaktadır (Holgate ve ark. 2015). Alerjenle indüklenen hava yolunun inflamasyonu ile karakterize olan alerjik astımda hava yolu aşırı duyarlılığı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu meydana gelmektedir (Lötvall ve ark. 2011). İnflamasyona eşlik eden bazı Th2 sitokinlerinden olan IL4, IL5 ve IL13; izotip değişimi indüklenen B hücrelerinin IgE üretimini sağlamaktadır

(Bontinck ve ark. 2019; Çelebi Sözener ve ark. 2020). Alerjik inflamasyonda rol oynayan bir başka immün hücre olan eozinofiller inflamasyonun bir başka fazı olan mast hücrelerinden histamin, LTB4, TNFα, IL8, IL13, CCL2 salınımına yol açmaktadır. Günümüzde alerjik astımın tedavisinde kullanılan ilaç gruplarının etkinliği sadece semptomları hafifletmeye yeterli gelmektedir. İlaçların uzun vadede kullanımında etkinlikleri azalmakta ve hastalığı kontrol etmek zorlaşmaktadır (Bonfield ve ark. 2010). Bu nedenle astım hastalığının tedavi alternatiflerinde daha az yan etkilere sahip bitkilerin etken maddelerine yönenilmiştir.

İçeriğindeki güçlü biyoaktif bileşenlere sahip olan *A.vera*'nın alerjik inflamasyonda etkisinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan birisinde, ovalbumin (OVA) indükleyici besin alerjisi modeli uygulanan farelerin *A.vera* jelini içeren formülasyonun uygulanmasının ardından OVA'ya özgü IgE ve Th2 sitokin seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (Lee ve ark. 2018). Başka bir çalışmada astımı hafifleten yolaklardan olan Nrf2/HO-1 yolağının, OVA ile indüklenmiş astım modeli oluşturulmuş farelerde aloin tedavisinin ardından aktive olduğu bildirilmiştir (Wu ve ark. 2023). Buradan hareketle çalışmamızda *A.vera* ve propilen glikol (PG) ile oluşturulmuş PG-A ön formülasyonunun anti-inflamatuvar, anti-alerjik etkilerinin çalışılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda alerjenle indüklenen hava yolu modelin hem *in vitro* hem de *in vivo* modeller oluşturulmuştur. Bu modeller üzerinde PG-A'nın etkinliği, belirlenen biyobelirteçler olan sitokinler üzerinden kantitatif olarak ölçülmesiyle belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aloe vera

2.1.1. Tarihçesi

Önceleri Liliaceae ve Aloacea familyalarına ait olarak bilinen Aloe cinsi, günümüzde Asphodeloideae ait familyasına ait olan Xanrhorrhoeaceae'ya dahil edilmiştir. Dünya çapında 360'tan fazla türe sahiptir. Halk tarafında ilaç olarak kullanılan türleri; Curacao Aloe (*Aloe barbadensis* veya *Aloe vera*), Cape Aloe (*Aloe ferox*) ve Socotra Aloe (*Aloe perryi*). *Aloe vera*'nın halk tarafından ilaç statüsünde kullanılmasına dair kayıtlar antik çağlara uzanmaktadır. İncil'de ve eski Mısır belgeleri Aloe'den bahsedilmektedir. Nefertiti (M.Ö.1353) ve Kleopatra (M.Ö. 69-30)'nın güzellikleri için Aloe'yi kullandıkları söylenmektedir. Aloe'nin kullanımına ait en eski belge M.Ö. 2200'e tarihlenen Sümer kil tabletleridir. 1862'de Mısır üzerine çalışmalar yapan Alman George Ebers, bir papirüste Aloe'nin tıbbi değeri hakkında bir yazıya rastlamıştır. Ebers Papirüsü olarak bilinen ve M.Ö. 1552'ye tarihlenen bu belgede, Aloe'nin yara iyi edici, iritasyon ve enflamasyonda kullanılması tavsiye edilen 12 adet reçete bulunmaktadır (Mukherjee ve ark. 2014).

Diğer eski kayıtlardan biri, Mısır tapınağında bulunan ve Aloe'nin ölümsüzlüğün kutsal bitkisi olarak atfedildiği M.Ö. 4000'lere tarihlenmiş olan bir gravürdür. Antik kayıtlara göre Aristo tarafından askerlerin yaralarını iyileştirilmesi adına Kral İskender Afrika'nın doğu kıyısında bulunan Sokotra Adası fethedilmeye ikna edilmiştir.

Aloe'nin MS 1. yy'da Dioscorides tarafından yazılmış olan The Greek Herbal eserinde yaraların iyileştirilmesi, yanıklar, kabızlık, uykusuzluk, mide rahatsızlıkları, hemoroid, saç dökülmesi, güneş yanığı, diş eti hastalıkları ve baş ağrısı üzerinde farmakolojik etkileri hakkında bilgilere rastlanmaktadır (Lee 2006 p.7).

2.1.2. Botanik Özellikleri

Önceleri Liliaceae ve Aloaceae familyalarına ait olarak bilinen Aloe cinsi, günümüzde Asphodeloideae (Xanthorrhoeaceae) familyasına dahil edilmiştir. Dünya çapında 360'tan fazla türe sahiptir.

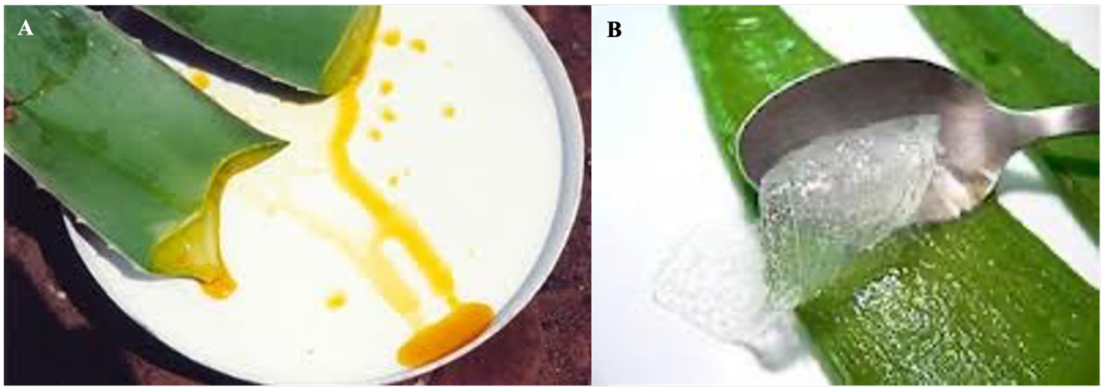


Şekil 2.1: *Aloe vera* (L). Burm.f bitkisi.

Aloe vera (L). Burm. f. (*Aloe barbadensis* Miller), Türkçe "Sarısabır", tropikal bölgelerde yetişen sükülent bir kserofittir (Şekil 2.1), bu bölgeler arasında başlıca Kuzey ve Güney Afrika, Madagaskar, Kanarya Adaları, Arap Yarımadası ve Akdeniz bölgesi sayılabilir (Akaberi ve ark., 2016). Aloe, ayrıca Meksika ve Hindistan için de endemiktir. Amerika Birleşik Devletleri, Güney Texas (Rio Grande), Florida ve Güney Kaliforniya'da endüstriyel amaçlarla *A. vera*'nın büyük tarlalar halinde kültürü yapılmaktadır.

Aloe'nin adı Grekçe "aloi"den geldiği, bu terimin de İbranice"allal" veya aynı kelimenin Arapçası olan ve acı madde anlamına gelen "alloeh" ten türediği düşünülmektedir (Park ve Lee 2006). "vera" sıfatı ise Latince "gerçek" anlamına gelir ve ilk olarak Linnaeus tarafından bitki için kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda bitki, başka bir botanikçi Philip Miller tarafından *Aloe barbadensis* olarak tanımlanmıştır. Ancak birkaç gün önceki bir yayında Burman (oğul) tarafından yapılan tanım da öncelik açısından kabul edildiğinden bitki *Aloe vera* Burm.f. olarak tescil edilmiştir (Upton, 2012). Ancak *A. vera* ve *A. barbadensis* isimlerinin her ikisi de halen kullanılmaktadır.

A. vera'nın yapraklarının farmakolojik bakımdan aktif bileşikler içeren üç kısmı vardır. Yapraklar bitkinin gövdesinden kesildiği zaman akan koyu kahverengi usare, eksüda veya lateks olarak adlandırılır (Şekil 2.2. A), ve antrakinonları içerir. Yaprak ortasından uzunlamasına kesildiği zaman içinde bulunan müsilajlı sarımsı beyaz saydam kısım ise jel olarak adlandırılır (Şekil 2.2. B) ve polisakkaritleri içerir. Yaprakların yeşil renkli kabuk kısmı da antrakinon glikozitlerini içerir (Choche et al., 2014; Pressman et al., 2019). Usare (lateks) ve jel ayrı ayrı kullanıldığı gibi, tüm yaprak eksteresi olarak da kullanılabilmektedir.

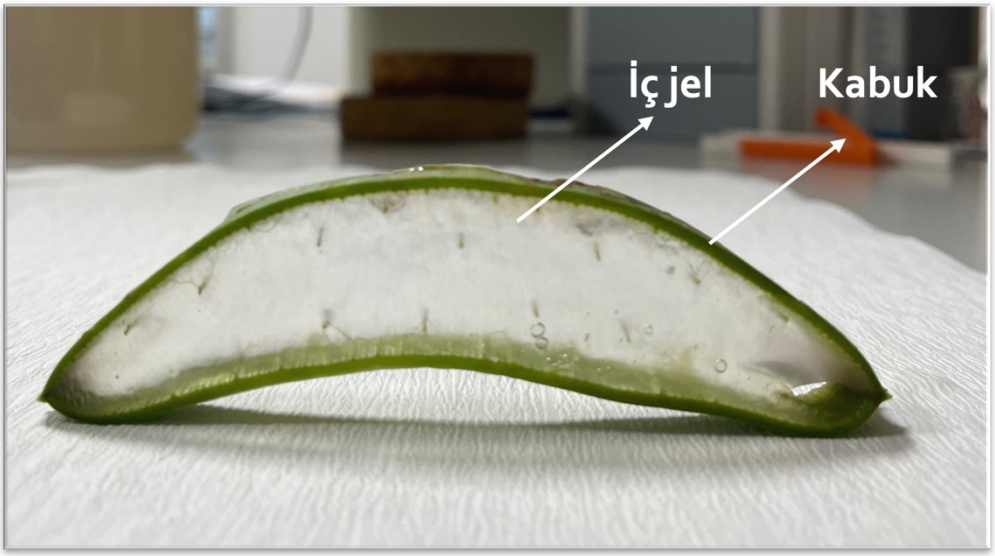


Şekil 2-2: *A. vera* yaprağının kısımları. A: *A. vera* usaresi (lateks). B: *A. vera* jeli

Halk tarafından ilaç olarak kullanılan türleri; Curacao Aloe (*Aloe barbadensis* veya *Aloe vera*), Cape Aloe (*Aloe ferox*) ve Socotra Aloe (*Aloe perryi*)'dir.

2.1.3. Kimyasal Bileşimi

Aloe vera (L.)Burm.f. (*Aloe barbadensis* Miller), düşük veya düzensiz yağış alan topraklarda yaşama uyum sağlamak adına yapraklarında su deposu dokusu geliştirmiş çok yıllık bir kserofittir. İçeriğinde bulunan aktif bileşenler 3 adet katmanına dağılmaktadır (Şekil 2-3). Yaprağının en iç bölgesi, suyun viskoz bir müsilaj şeklinde barındığı büyük ince duvarlı parankima hücrelerinden oluşan berrak, yumuşak, nemli ve kaygan bir dokuya sahiptir (Lee 2006 p.10).Yaprağın kabuk olan koruyucu dış katmanları hidroksiantrasen, hidroksiantron,aloe-emodin antron, antrakinon ve glikozitlerden aloein A ve B türevlerini içermektedir. Yaprağın orta katmanında antrakinonlar ve glikozitler içeren acı sarı bir lateks bulunmaktadır. Musilaj özelliğine sahip olan ve bitkinin tedavi amaçlı en yaygın kullanılan kısmı kısmı (Ni ve ark. 2004) olan yaprak jelinin en iç katmanı içeriğinde glukomannanlar (acemannan), amino asitler, lipidler, steroller ve vitaminler,enzimler, organik bileşikler (emodin, aloin, barbaloin) ile birlikte %99 oranında su bulunmaktadır (Sahu ve ark.2013; Akev ve ark. 2015).



Şekil 2-3: *Aloe vera* yaprak enine kesiti.

A.vera içeriğinde bulunan aktif bileşenler iki ana türe ayrılmaktadır; besleyici ve besleyici olmayana bileşenler. Besleyici bileşenler arasında karbohidratlar, vitaminler, enzimler, mineraller, protein ve aminoasitleri içermektedir. Besleyici olmayan bileşenler fenolik bileşenler, organik bileşenler ve diğer bileşikleri kapsamaktadır (Darzi ve ark. 2021) (Tablo 2-1).

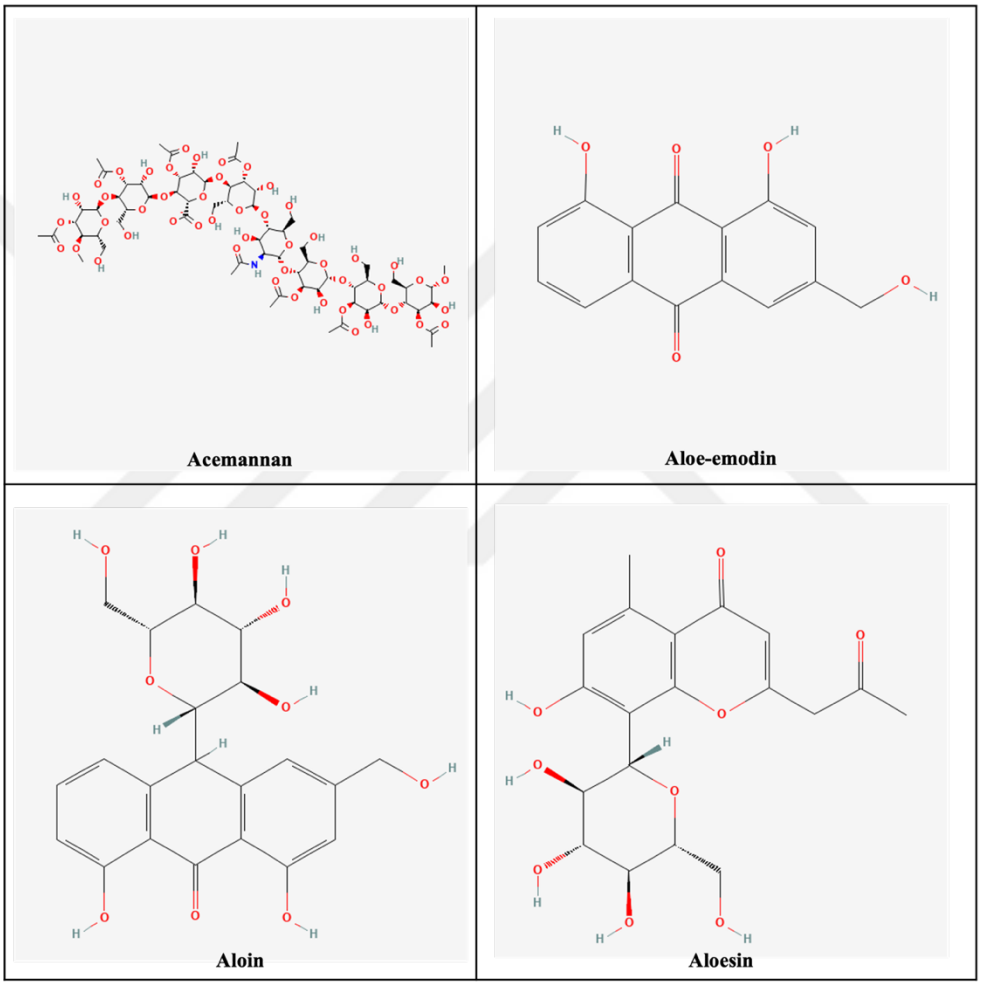
Tablo 2-1: *Aloe vera*'da bulunan bileşikler

Bileşik Genel Ad	Çeşitleri	Etkileri
Amino asit	Beslenme için gerekli 20 aminoasit	Beslenme için gerekli 7 esansiyel amino asit
Antrakinon	Aloin (A ve B), aloe emodin, barbaloin, antranol, emodin, resistanol vs.	Laksatif, antibakteriyel
Enzim	Amilaz, karboksipeptidaz, katalaz, peroksidaz, selülaz, lipaz, siklooksijenaz, bradikininaz vs.	Sindirime yardımcı, serbest radikallerin nötralizasyonu, topikal anti-inflamatuvar etki
Hormon	Oksin, giberellin	Yara iyileştirici, anti-inflamatuvar etki
Mineral	Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, K, Na, Zn	Besinsel katkı
Vitamin	A, C, E, B, kolin, B12, folik asit	Besinsel katkı
Karbohidrat	Monosakkarit, mukopolisakkarit (glukomannan, acemannan, polimannoz)	Anti-inflamatuvar, immünostimülan)
Sterol	B-sitosterol, lupeol, kolesterol, kampesterol	Anti-inflamatuvar, antiseptik
Lektin	Aloktin I ve II	İmmünostimülan
Saponin		Antiseptik
Lignin		İçeriğinde bulunduğu topikal preparatların diğer bileşenlerin deriye penetrasyonunu arttırır.

.

A. vera'nın başlıca bileşiklerinin kimyasal formülleri Şekil 2-4.'te gösterilmiştir.

Şekil 2-4: *A. vera*'nın başlıca bileşiklerinin kimyasal formülleri



2.1.4. *A.vera*'nın Farmakolojik Etkileri

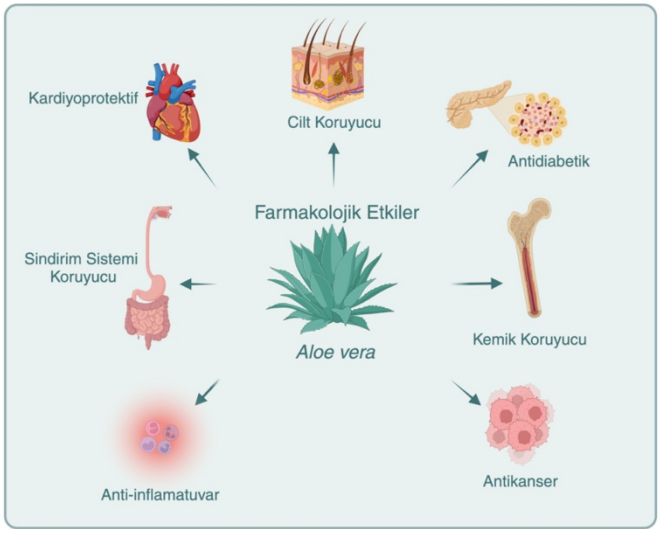
A. vera'nın içerdiği çeşitli bileşenler ve bunların tek başına ve ekstrelerdeki sinerjik etkileri üzerinde sayısız araştırma yapılmıştır. Son yıllara kadar yapılan tüm araştırmalar çeşitli derlemelerde toplanmıştır (Radha ve Laxmipriya 2015; Sánchez-Machado ve ark., 2017) (Şekil 2-5).

Literatürde *A.vera*'nın içeriğinde bulunan biyoaktif bileşenlerin birden fazla etkiye sahip olduğu ortaya koyulan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile gösterilmiştir (Rahmanve ark. 2017). Kronik periodontite sahip diyabet hastalara *A.vera* jeli ile uygulanan tedavi sonucunda iyileşmenin plasebo jele kıyasla anlamlı derecede fazla olduğu ortaya koyulmuştur (Pradeep ve ark. 2015). 20 sağlıklı yetişkin ile yapılmış olan randomize çift kör araştırmada *A.vera* içeren gargara kullanımının cerrahi işlem sonrası ortaya çıkan postoperatif komplikasyonlar olan şişlik ve ağrıyı önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Fallahi ve ark. 2016).

Park ve ark.'larının alkol kaynaklı meydana gelen akut gastrit fare modeli oluşturulmuş BALB/c farelerde, *A.vera* jelinin matriks metalloproteinaz-9 aktivitesinin artmasını sağlayarak koruyucu etkiye sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Park ve ark. 2017).

Aloe'lerin eskiden beri bilinen etkileri yanık ve yara iyi edici etkileridir. Bu etkiler jel kısmındaki polisakkaritlere atfedilmiştir (Chitra ve ark. 1998). Bu etkilerine dayanarak *A. vera* jeli çeşitli kozmetik preparatlara yumuşatıcı olarak ilave edilmektedir. Son yıllarda *A. vera*'nın cilt üzerine etkilerinin mekanizmasını aydınlatan çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. *A.vera*'nın içeriğindeki aktif bileşenlerin cilt üzerindeki etkilerine dair yapılan bir çalışmada, *A. vera* jelinin keratinositlerin göçünü ve çoğalmasını kolaylaştırarak yara iyileşmesi sırasında meydana gelen re-epitalizasyon sürecini hızlandırdığı gösterilmiştir. Çalışmada re-epitalizasyon sürecinde rol oynayan β1, α6, β4 integrin ve E-kaderin'inin hücre yüzeyi ekspresyonlarında artış olduğu gözlemlenmiştir (Moriyama ve ark. 2016).

Leng ve ark'larının yaptığı diğer bir çalışmada ise Aloe polisakkaritin (20/ 40/ 80 μg/mL 24 saatlik uygulama) (insan keratinosit hücre serisi) HaCaT hücre serisi üzerinde, TNFα ve psoriasis patogenezinde rol oynayan IL8 ve IL12 protein ekspresyonlarınınınhibisyonundaetkili olduğu belirtilmiştir. (Leng ve ark. 2018).



Şekil 2-5: *Aloe vera*'nın farmakolojik etkileri

Cilt üzerindeki etkinin *in vivo* olarak araştırıldığı bir araştırmada 10 gün boyunca günde 2 kere uygulanan *A. vera* jelinin kalça/sakrum/topuk bölgelerinde meydana gelen basınç ülseri gelişimini önlediği ifade edilmiştir (Hekmatpou ve ark. 2018).

A.vera'nın antikanser etkilerini araştırmak üzere yapılan çalışmalar sitotoksik ve antitümör aktiviteyi değerlendirme esasına dayanmaktadır. *A.vera*'dan elde edilen ham ekstrelerin MCF-7 ve HeLa hücre hatları üzerinde apoptoz indüksiyonu ve efektör genlerin ekspresyonu sonucunda hücre canlılık seviyesinde azalma görülmüştür (Hussain ve ark. 2015). Gerçekleştirilen başka bir çalışmada, *A.vera* ekstresinin COX-2, VEGF ve prostaglandin E2 üretimini inhibe ettiği ortaya koyulmuştur (Shirali ve ark. 2017). Zhang ve ark'larının aloesin etken maddesi ile yaptıkları çalışmada, ovaryum kanseri oluşturulmuş *in vitro* ve *in vivo* modellerde tümör büyümesini azalttığı, insan ovaryum kanser hücre serisinde (SKOV3) doza bağlı apoptozda artışa yol açtığı, metastaz biyomarkerlarının seviyelerinin azaldığı ve MAPK, ERK, JNK ve p38 fosforilasyon seviyelerinde doza bağlı düşüşün gözlendiği belirtilmiştir (Zhang LQ ve ark. 2017). İnsan umbilikal ven endotel hücre serisinde (HUVEC) yapılan bir çalışmada aloe-emodinin hücre migrasyonu ve invasyonunu baskıladığı, hücre

proliferasyonu ve göçünde önemli rol oynayan f-aktin yapısını inhibe ettiği gösterilmiştir (Chen ve ark. 2018). En önemli kronik hastalıklardan olan diyabetes mellitus (DM) üzerinde *A.vera*'nın etkisinin araştırıldığı bir araştırmada korneal alkali yanık hasarı oluşturulmuş hayvan modelinde *A.vera* topikal uygulanması sonucunda korneal yeniden epitalizasyon oluştuğu gözlenmiştir (Atiba ve ark. 2015).

Miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon modeli oluşturulmuş Sprague-Dawley sıçanlarında bir aloin türü olan barbaloin etken maddesi ile uygulanan tedavi sonucunda AMPK yolağını aktive ederek kardiyo-koruyucu bir etki sağladığını göstermişlerdir (Zhang P ve ark. 2017). *A.vera*'nın etkili olduğu gösterilmiş bir diğer çalışmada hiperlipidemi sıçan modeli oluşturulmuştur. Metabolik yaklaşımla değerlendirilen bu çalışma, *A.vera*'nın hiperlipidemiye neden olan yolaklara etki ederek lipid seviyelerinin normal referans aralıklarına getirdiğini ortaya koymuştur. Bu sonuç *A.vera*'nın hiperlipidemi tedavisi için umut veri bir aday olabileceğini göstermektedir (Ji ve ark. 2018).

Birçok farmakolojik etkiye sahip olduğu gösterilmiş olan *A.vera*'nın anti-inflamatuvar etkisi de birçok yolak üzerinde çalışılmıştır. Pengjam ve ark'larının gerçekleştirdikleri araştırmada, aloin etken maddesinin NF-κB yolağını baskılayarak osteoporoz ve osteopeni bozukluklarında faydalı olabileceği sonucuna varmışlardır (Pengjam ve ark. 2016).

A.vera'nın içeriğinde bulunan aloin etken maddesinin mürin makrofaj hücre serisinde (RAW264.7), lipopolisakkarit (LPS) ile arttırılmış iNOS ekspresyonunu transkripsiyonel ve protein seviyesinde doza bağlı olarak azalttığı belirtilmiştir. Ek olarak aloinin, JAK1, STAT1 ve STAT3 fosforilasyonunu inhibe ettiği ortaya koyulmuştur (Ma ve ark. 2018).

Na ve ark'ları, sağlıklı gönüllülerden alınan IL1β içeriği yüksek olan tükürük örneklerinde oral epitel hücrelerinin IL8 sekresyonunu uyardığını belirtilmiş olup, aloin maruziyeti uygulanmış olan oral epitel hücreleri IL1β ile uyarıldığında doza bağlı IL8 sekresyonunda azalma olduğunu göstermiştir (Na ve ark. 2016).

2.1.5. *Aloe vera* Jelinin Reolojik Özellikleri

A.vera jeli polimerik zincir ağına benzer davranışlar sergileyen bir yapıya sahiptir. Sıcaklık arttıkça elastik modül artışı gözlenmiştir. Viskotizenin, kayma hızı arttırıldıkça azaldığı belirtilmiştir.Jelin viskoz bir yapıya sahip olması formülasyon oluşturulmasında kritik bir parametre görevi görmektedir. Gerçekleştirilen bir çalışmada, *A.vera*jelinin varolan viskositesinin yanında formülasyon oluşturulacak diğer maddelerin oranının önemli olduğu aksi takdirde viskozite probleminin oluşturulan formülasyonun kullanımında olumsuz sonuçlar doğurabileceği vurgulanmıştır (Khan ve ark. 2013).

2.1.6. *A.vera* Jelinin Teknolojik Formülasyonları

İçeriğindeki biyoaktif bileşenleri nedeniyle, bitkinin toprak üstü kısımlarının farmakolojik etkilerinin çalışılmasının yanında bitkinin belirlenen kısımları üzerinden farmasötik teknolojide ve doku mühendisliğinde kullanılabilecek formülasyonlar yapılmıştır. Çalışmalarda *A.vera* polikaprolakton (PCL), kolajen, kitosan, poli(vinil alkol) (PVA) gibi diğer biyomoleküllerle birlikte çalışılmıştır.

A.vera doku mühendisiliği uygulamaları için kapsamlı bir şekilde çalışılan bir polimer kaynağıdır. *A.vera*'nın antioksidan, hücre proliferasyonuna ve rejenerasyonuna olan etkisi (Heggers ve ark. 1993) araştırmalarda tercih edilmesini sağlamıştır. Carter ve ark'larının PCL ile *A.vera*'nın 70/30 oranında elde edilen nanofibröz membranın, fare embriyonik fibroblast hücre serisinde (3T3) hücre proliferasyonunu teşvik ettiğini göstermişlerdir (Carter ve ark. 2016). PCL / *A.vera* ile oluşturulan kafes yapısının fare fibroblast hücrelerinin F-aktin ekspresyonunu ve kolajen salgılanmasını arttığı da gözlemlenmiştir (Suganya ve ark 2014).

Sridhar ve ark'ları, %5 kurkumin ve %1 *A.vera* içeren kompozit PCL nanoliflerinin insan akciğer adenokarsinom (A549) ve insan meme adenokarsinom (MCF-7) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin %1 cis-platin yüklü PCL nanoliflerine kıyasla %15 daha fazla olduğunu belirlemiştir (Sridhar ve ark. 2014).

Nanoteknolojik formülasyon tiplerinden olan nanofiberler ile ilgili yapılan bir araştırmada *A.vera* özü içeren PLGA (poli(laktik- ko-glikolik asit) nanofibröz membranın BALB/c-3T3 fibroblast hücrelerinde proliferasyonunu arttırdığı, *in vivo* Tip 2 diyabet fare modelinde (db/db) ise yara kapanmasını ve re-epitelizasyonunu hızlandırdığı ortaya koyulmuştur (Garcia-Orue ve ark. 2017).

2.2. Astım

2.2.1. Astımın Tanımı ve Tarihçesi

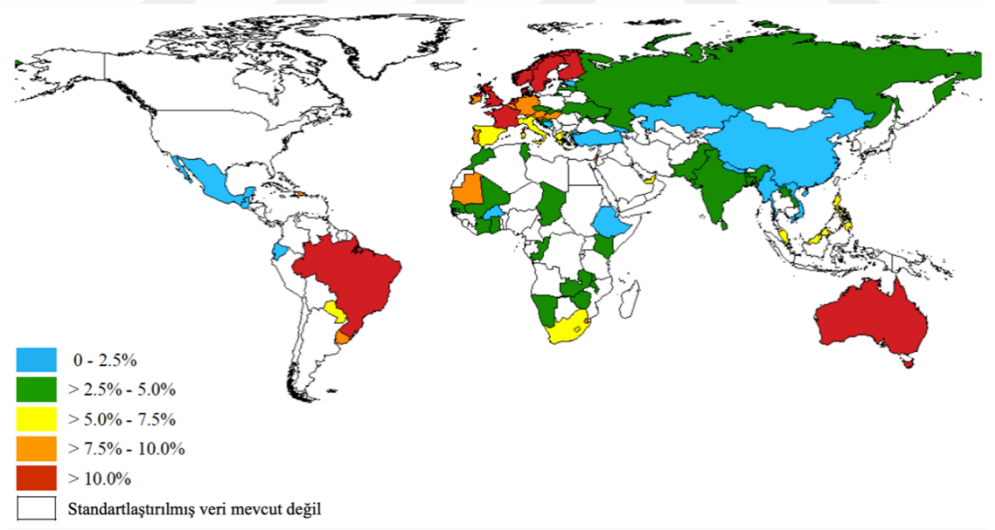
14. Yüzyılda eski Latince "*asma*", Yunanca'da nefes darlığına karşılık olan "*asthma*" sözcüklerinden türemiş olan ve nefes almakta zorluk ve göğüs darlığı ile karakterize bir patolojik durumdur (Netuvelli ve ark. 2007). Henry Hyder Salter "Astım ve Tedavisi üzerine" başlıklı çalışmasında astımı "ataklar arasında sağlıklı solunum ataklarına sahip, paroksismal dispne" olarak tanımlamıştır. Teobromin içeriği yüksek bir içecek olan sade kahveyi astım spazmları için bir tedavi seçeneği olarak tanımlamıştır. Dr. Salter'ın bu öngörüsünün temelinde kendisinin de astım hasta olması bulunmaktadır (Sakula 1985). Paul Erlich'in kitabında astım ve bronşitte hava yollarının ve astımlı balgamın hücresel görünümüne dair doğru çizimler yer almaktadır. Bu yaklaşımlarla anlaşılmaktadır ki; 19. yüzyılın sonlarına doğru hekimler astımın kendine özgü patofizyolojisi, klinik sonuçları ve tedavi gereksinimleri olduğu görüşünü benimsemişlerdir (Holgate 2010).

Astım için Küresel Girişim (GINA) 2023 raporundaki tanımlamaya göre astım, genellikle kronik hava yolu inflamasyonu ile karakterize olan hırıltı, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve öksürük gibi zamanla ve yoğunlukla değişen solunum semptomlarına ve değişken ekspiratuar hava akımı kısıtlamasına sahip heterojen bir hastalıktır. Astım, farklı ülkelerde nüfuslarının %1-29'unu kapsayan bir orana sahiptir. Karakterize olduğu nefes darlığı, göğüste sıkışma, öksürük semptomları ve değişken ekspiratuvar hava akımı sınırlaması zamanla ve yoğunluk değişkenlik göstermektedir. Değişkenlikler egzersiz, alerjen veya tahriş edici maddelerle maruziyet, hava değişimi veya viral/bakteriyel solunum yolu enfeksiyonları gibi faktörlerle tetiklenmektedir. İlaç tedavisi ile veya kendiliğinden semptomlar düzelebilir. Astım çoğunlukla

doğrudan veya dolaylı uyaranlara karşı gelişen aşırı hava yolu duyarlılığı ve kronik hava yolu inflamasyonu ile ilişkilidir. Bu durum semptomlar olmadığında ve akciğer fonksiyonu normal olduğunda da devam etmektedir. Hastalar yaşamlarını tehdit edebilecek olan epizodik astım alevlenmelerini yaşayabilirler. Astım ölümlerinin çoğu düşük ve orta gelirli ülkelerle meydana gelmektedir (GINA 2023).

2.2.2. Astımın Epidemiyolojisi

Astım kişinin yaşam kalitesi üzerinde önemli etkiye sahip, en yaygın görülen bulaşıcı olmayan hastalıklardan biridir. Astım prevalansı, şiddeti ve mortalitesi coğrafi olarak büyük farklılık göstermektedir. Astım prevalansı yüksek gelirli ülkelerde daha yüksek bir seyir halindeyken astıma bağlı ölümlerin çoğu düşük-orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir.



Şekil 2-6: Dünya çapında astım prevalansı (To ve ark. 2012).

Yetişkinlerde doktor tanılı astımın küresel prevalansı %4.3 olarak belirlenmiştir. 70 katılımcı ülkenin klinik astım prevalansı değerlendirildiğinde, %1.0 ile %21.5 arasında değişen küresel varyasyon bulunmaktadır (Şekil 2-6). Klinik astım prevalansının en yüksek olduğu beş ülke Avustralya (%21.5), İsveç (%20.5), Birleşik Krallık (18.2), Hollanda (%15.2) ve Brezilya (%13) olduğu görülmüştür. Türkiye'nin klinik astım prevalansı %2.11 olarak hesaplanmıştır (To ve ark. 2012). Ülkemize bu

konuda yapılmış en kapsamlı çalışma Türk Toraks Derneğince gerçekleştirilen çok merkezli 14 ayrı şehirden 25.843 kişinin katıldığı çok merkezli PARFAIT (Prevalance and Risk Factors of Allergies in Turkey) araştırmasında, astım prevalansının ülke genelinde kadınlarda %9.0 erkeklerde ise %7.1 olduğu bildirilmiştir (Kurt ve ark. 2009).

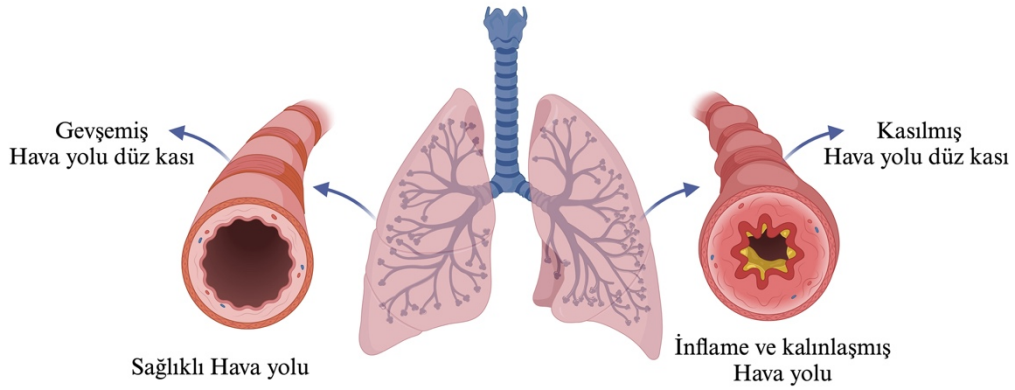
2.2.3. Risk Faktörleri

Astımın risk faktörleri bireysel faktörler (genetik, obezite, cinsiyet) ve çevresel faktörler olarak iki grupta değerlendirilmektedir. Astımın çocuklardaki başlangıcındaki önemli bir tetikleyici, viral enfeksiyonlarda, sinsityal virüs (RSV) ile solunum yolu enfeksiyonlarına yanıt olarak ortaya çıkan hırıltılı solunumdur. Hava yollarında meydana gelen T2 tip bağışıklık yanıtı ikinci tetikleyici olarak bilinmektedir. Çocukluk çağındaki obezitenin metabolik, hormonal ve düşük dereceli inflamatuvar yolaklarının kombinasyonuna yol açarak astım riskini arttırdığı belirtilmektedir (Holgate ve ark. 2015). 25 yıl önce öne sürülen hijyen hipotezi solunum yolu enfeksiyonları ile alerjik hastalıkların önlenmesi üzerine oluşturulmuştur. Bu durum erken çocukluk döneminde ya da büyük çocuklarla temas yoluyla enfekte olan anneden doğum öncesi dönemde bağışıklık edinilmesi esasına dayanmaktadır (Strachan 1989). İç ortam alerjenlerinden ev akarları, fare, hamamböceği, evcil hayvanlar, küf mantarları ve dış ortam alerjenlerinden polen ve küf mantarları astımın risk faktörlerinden oldukları gösterilmiştir (Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi 2020). Kentleşme ve nüfus artışıyla birlikte artan iç ve dış ortam hava kirliliği, özellikle gelişmekte olan ülkelerde astımın şiddetlenmesine katkıda bulunmaktadır. Astım ile ilişkilendirilen kirleticiler azot dioksit, ozon, uçucu organik bileşikler ve egzoz kirleticiler olarak gösterilebilir. Tütün dumanında bulunan organik bileşik ve nitrojen dioksit karışımına kalınan maruziyet astım gelişimi için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Hamilelik sırasında anne ve babanın sigara içmesi bile ikinci nesilde astım riskini arttırdığı belirtilmiş olması, astımın oluşum nedenlerinde intrauterin epigenetik mekanizmalarına dikkat çekmektedir (Holgate ve ark. 2015).

2.2.4. Astım Patofizyolojisi

Astımın spesifik özelliği, hava yolu lümen çapının daralması sonucu hava yolu tıkanıklığıdır. Hava yolu duvarında plazma ekstravazasyonu ve oluşan ödem ile birlikte eozinofiller, nötrofiller, lenfositler, makrofajlar ve mast hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerinin eşlik ettiği kronik inflamasyon, hava yolunun tıkanıklığına yol açan ana nedenlerden biridir (Şekil 2-7). Astımın fizyolojik özellikleri arasında; bronş aşırı duyarlılığı (BHR), hava yolu düz kasının inhale uyaranlara yanıt olarak kasılması ve akut hava yolu daralması yer almaktadır (Lambrecht ve ark. 2019).

Hava yolu inflamasyonu temelinde T yardımcı 2 (Th2) lenfosit yanıtlarına cevap olarak görev alan eozinofillerin yanında mast hücreleri, bazofiller, nötrofiller, monositler, makrofajlar rol almaktadır. T hücrelerinin astımlı hava yollarındaki esas görevi, inflamatuvar hücre profilini kontrol etmektir. Klasik alerjik tip astımda Th2 $CD4^+$ lenfosit aktivitesi baskın olurken nötrofilik astımda Th1 hücreleri ve Th17 hücreleri görev almaktadır. Kısacası bir dizi T hücresinin her biri farklı astım tiplerinde rol almaktadır. Etkili alerjen sinyali sonucunda T hücrelerinin Th2 hücrelerine farklılaşmasıyla sonuçlanan etkileşimler meydana gelmektedir. Th2 hücreleri pro-alerjik sitokinler olarak adlandırılan IL3, IL4, IL5, IL9, IL13 ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) salgılayarak astımın karakteristik bileşenlerinden olan IgE, mast hücresi ve eozinofil yanıtlarına yol açmaktadır. Alerjene özgü Th2 hücrelerinin azınlığı IgM'den IgE'ye immünglobülin değişimini başlatmak için B hücre folikülüne göç ederken kalanlar Th2 tipi inflamatuvar yanıt ve buna bağlı pro-alerjik sitokinlerin salgılanması için hava yolu mukozasına yerleşmektedirler. Hava yollarının alerjene maruz kalması sonucunda IgE'ye bağlı histamin, prostaglandin D2 (PGD2) ve daha sonra lökotrien C4(LTC4) salınımını kapsayan mast hücreleri kaynaklı bronkokonstriksiyon ile sonuçlanmaktadır (Holgate ve ark.2015).



Şekil 2-7: Sağlıklı ve astımlı hava yolu.

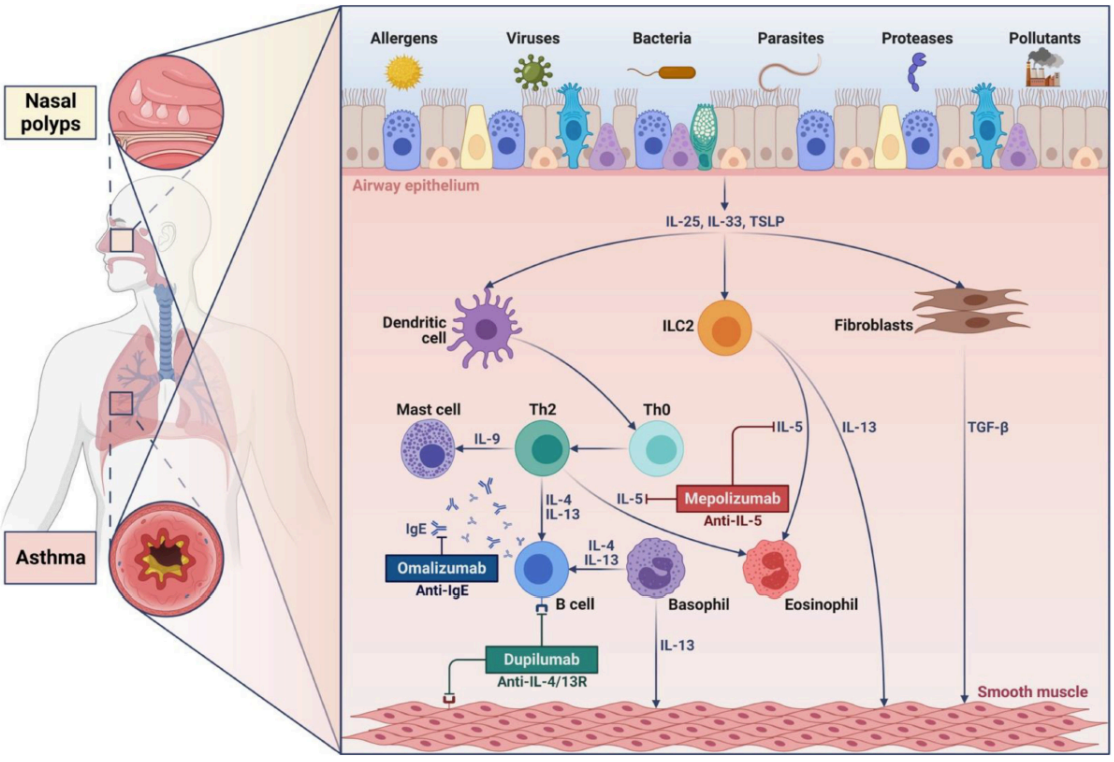
2.2.5. Alerjik Astım

Alerjik astım, duyarlı bireylerde hava kaynaklı alerjenlere karşı uygun olmayan bağışıklık yanıtının neden olduğu kronik bir akciğer hastalığıdır. Alerjik astımda polen, ev tozu, inhalasyon ajanları ve havayı kirleten maddeler gibi alerjenlerin solunması başlatıcı rol oynamaktadır. Bu yolla indüklenen hava yolu aşırı duyarlılık gösterebilmekte ve sonucunda aşırı mukus salgısı, inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi çeşitli yanıtlarla karakterize edilmektedir (Lötvall ve ark. 2011).

Antijen sunan hücreler tarafından yakalanan alerjenler, hava yollarına inflamatuvar hücre infiltrasyonunu indükleyen Th2 hücrelerinin aktivasyonuna neden olur (Lambrecht ve Hammad 2015; Hirose ve ark. 2017). İnflamatuvar hücrelerin hava yolunda aşırı toplanması, çeşitli inflamatuvar mediatörlerin salınması yoluyla alerjik astımın sürdürülmesi ve ilerleyen aşamalarda yer alan hava yolu aşırı duyarlılığını sürekli hale getirebilir (Fonseca ve ark.2019; Gour ve ark. 2018). Th2 aracılı sitokinlerin alerjik akciğer inflamasyonunun patogenezini düzenlenmesinde aldıkları roller bilinmektedir. Alerjik reaksiyon sırasında Th2 hücreleri akciğerlere göç eder ve interlökin IL4, IL5 ve IL13 salgılar. IL4 ve IL13; aşırı mukus üretimini, bronkokonstriksiyonu ve IgE üretimine yol açan B hücrelerinin izotip değişimini

indükler (Çelebi Sözener ve ark. 2020; Bontinck ve ark. 2020). IL5, eozinofil aktivasyonu, toplanması ve eoziofillerin devamlılığı açısından önemli bir aracı olma görevine sahiptir (Miller ve Peden 2014; Wong ve ark. 2018) (Şekil 2-8).

Yardımcı T hücresi (Th) hücresi farklılaşması sırasında, antijen sunan hücrelerin türü, ortak uyarıcı faktörler ve sitokinler gibi çeşitli faktörler, saf Th hücrelerinin Th hücre alt gruplarına polarizasyonunu düzenler (Yang veark.2015). Bununla birlikte, ortamdaki sitokin seviyelerinin CD4+ T hücre farklılaşmasının tetikleyicisi olduğu bildirilmiştir. IL4, farklılaşma sürecini Th2 fenotipine yönlendirir (Beamer ve ark. 2013; ve Saulyte ve ark. 2014). Makrofajlar, dendritik hücreler ve B hücreleri gibi antijen sunan hücreler dahil olmak üzere, çok çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen bir sitokin olan IL6, Th2 farklılaşmasını destekler (Su ve ark. 2023). IL6, CD4+ T hücrelerinde ilk IL4 üretimini indükler, böylece saf CD4 T hücrelerini efektör Th2 hücrelerine polarize eder. IL6, reaktif oksijen türleri dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından aktive edilen NF-κB yolu aktivasyonuyla salınır (Rincon ve ark. 1997; Zhao ve ark. 2008; ve Zhang ve ark. 2023).



Şekil 2-8: Astımda Tip2 hava yolu inflamasyonunun altında yatan patobiyolojik mekanizmalar (Pelaia ve ark. 2023).

2.2.6. Alerjik Astımda Etkili Hücreler

Alerjik inflamasyonda efektör CD4+ T hücreleri Th1 ve Th2 hücre alt kümelere ayrılmaktadır. Her iki alt kümenin hastalıktaki rollerine dair çok sayıda araştırma yapılmıştır. Astım hastaların hava yollarında Th2 hücrelerinin sayısındaki artış ,astımı Th2 hücresi kaynaklı bir hastalık olarak değerlendirilmesine yol açmıştır. (Bentley ve ark. 1992; Robinson ve ark. 1992). İnsanlarla ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda Th2 hücrelerinin IL4, IL5 ve IL13 gibi sitokinlerin üretimi ile hastalığın patofizyolojik özelliklerini başlatabildiği ve ilerlemesine neden olabildiğine dair veriler elde edilmiştir. (Will-Karp 1999; Cohn ve ark. 2004). Alerjik duyarlılıkta ve IgE üretiminde IL4, eozinofil sağ kalımı için IL5 ve akciğerlerde havayolu aşırı duyarlılığı(AHR) gelişimi ve yeniden doku şekillenmesinde ise IL13 önemli rol oynamaktadır.

Farelerde yapılan bir araştırmada T ve B hücrelerinin yokluğunda farelerde Th2 tipi hastalığın geliştiği gösterilmiştir. Th2 hücrelerinin yokluğunda bu durumun meydana gelmesi, alerjik immün yanıtların "doğuştan yardımcı" hücreler olarak adlandırılan doğuştan gelen lenfoid hücrelerin rolünün olabileceği yaklaşımını ortaya koymuştur (Paul ve Zou 2010). Alerjenlere maruz kalnıması sonucunda aktive Th2 hücreleri hava yollarına akarak Th2 tip sitokinlerin seviylerinde artışa ve eozinofillerin toplanmasına yol açmaktadır (Larche ve ark. 2003). Th1 hücrelerinin Th2 hücrelerinin gelişiminin engellenmesinde doğrudan bir role sahip olabilmeleri, astımda inhibitör bir aday olarak düşünülmesini sağlamıştır. Bu görüşü destekleyen bir çalışmada farelerde Th1 hücre ana trankripsiyon faktörü T-bet'in silinmesi sonucunda AHR ve IL13 'e bağlı eozinofil gelişimi görülmüştür(Finotto ve ark. 2002). Buna karşın yapılan bir çalışmada TH1 tipi sitokin olan interferon-g (IFNγ) astımlı hastaların hava yollarına uygulanmış, hastanın semptomlarında herhangi bir iyileşme gözlemlenmemiştir (Boguniewicz ve ark. 1995). TH2 hücrelerinin astımda önemli bir rol oynamasının yanında Th2 hücreleri dışındaki mekanizmaların da astımın farklı alt tiplerinde patoloji adına önemli olabileceğini düşündürmektedir (Lloyd ve Hessel 2010).Lenf düğümlerinde Th2 hücreleri üretildikten sonra, bir kısmı plazma

hücrelerine ve antikor üreten hücreler olan B hücreleri ile etkileşime gireceklerdir. IL4 ve IL13 sitokinlerinin etkisi altında B hücreleri IgE üretirler (Hammad 2021).

Eozinofiller, astımla, antijen maruziyeti sonucunda oluşşan hava yolu inflamasyonu ve BHR' nin nin hayvan modelleri ile ilşikilendirilen bir efektör hücredir (Holgate ve Davies 2009). IL5'in yönlendirmesi ile eozinofillerin kemik iliğinden terminal farklılaşması ve mobilizasyonu meydana gelmektedir. Eozinofiller IFNγ, IL2, IL4, IL5, IL10, IL13 ve TNFα gibi sitokinler ile CCL22 ve CCl17 gibi Th2 hücre kemokinlerin üretilmesine görev almaktadırlar (Akuthota ve ark. 2008). Hava yolunun yeniden şekillenmesinde ve spesifik hasta grubundaki astım alevlenmelerinde eozinofillerin rol aldığını gösteren insan ve fare deneyi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sensitizasyon ve provokasyon oluşturulmuş farelerde bronkoalveolar lavaj (BAL) yoluyla toplanan hava yolu eozinofillerin bellek T hücrelerinin aktivasyonunu ve çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir (Shi ve ark. 2000). Yapılan birçok klinik araştırmada pulmoner eozinofiller ile astımın arasında bağlantı olduğu ortaya koyulmuştur. Atopik astımlı hastalarda alerjen zorlanmasından sonra eozinofiller akciğere toplanmaktadır. Astımlı hastalardan alınan balgam, BAL ve mukozal biyopsilerde aktive eozinofiller bulunmuş olup periferik kan ve BAL eozinofil seviyesinin hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Bousquet ve ark. 2000).

2.2.7. Alerjik Astımda Prostaglandin D2 (PGD2) Yolağı

Pro-inflamatuvar bir aracı olan PGD2, siklooksijenaz-2 (COX-2) yolağı içerisinde araşidonik asitten türetilmektedir. PGD2 inflamasyon varlığında ilk olarak mast hücreleri olmak üzere aktive olmuş bağışıklık sisteminde görevli hücreler tarafından sekrete edilmektedir. Th2 hücreleri, mast hücreleri ve eozinofillerin membran yüzeylerinde PGD2'yi uyaran reseptörlere sahip oldukları bildirilmiştir (Athari 2019). PGD2'nin varlığı Th2 hücrelerinin ve eozinofillerin inflamatuvar bölgelere göçünü ve pro-inflamatuvar yolakları tetiklemektedir. Uyarılan Th2 hücreleri IL4, IL5 ve IL13 sitokin ekspresyonlarını arttırmaktadır. Bir diğer uyarılan hücre olan eozinofillerin göçü tetiklenmekte ve degranülasyon aşaması başlamaktadır

(Xue ve ark. 2005). İnflamasyon bölgesinde bulunan Th2 hücreleri ve eozinofiller alerjik hava yolu inflamasyonun oluşumunda, hava yolu yeniden yapılanmasında rol almaktadırlar.

2.2.8. Eozinofilik İnflamasyon

Eozinofil: Eozinofil hücreleri, kanda lökositlerin %5'inden azını temsil eden kemik iliği kaynaklı lökositlerdir. Periferik kan eozinofil sayısının μL başına 450 hücreden fazla olması eozinofili olarak tanımlanır. Eozinofili alerji, ilaç reaskiyonları,parazit enfeksiyonları, metabolik bozulukluklar, gibi birçok hastalıklar ilişkilendirilmektedir. Aktive olmuş eozinofiller birden çok mekanzma vasıtası ile kan dolaşımından dokulara alınır. Eozinofiller; sitokinler, kemokinler, sitotoksik granül proteinleri dahil olmak üzere önceden meydana gelen ve yeni sentezlenmiş moleküllerin salınmasına yol açarak bölgesel inflamasyon yolakların tetiklenmesinde rol oynarlar. Uzun zamandır eozinofilden zengin inflamasyon sebepleri parazit enfeksiyonları ve alerjik inflamasyon olarak gösterilmektedir. Astım modellerinde ve klinik çalışmalarda, hava yolu inflamasyonu, hava yolu hiperreaktivesi, yüksek mukus sekresyonu, hava yolu yeniden şekillenmesi gibi birçok astım ve alerji patogenezinde rol oynayan faktörlerin temelinde eozinofillerin önemli bir rol oynadığı görülmüştür (Haldar ve ark. 2009; Castro ve ark. 2011).

Eozinofilik alerjik inflamasyon, 3 farklı evre ile tanımlanabilir. Hava yolunun bir alerjen ile ilk maruziyeti, duyarlılaşma aşamasında ya hava yolu ile ya da epitel bariyerinden geçişinin ardından alt mukozada dendiritik hücreler tarafından alınır. Ardından antijenler naif T hücrelerine IgE üretmek ve B hücrelerini aktive etmek üzere sunulur. Salgılanan IgE submukozal dokuda bulunan mast hücrelerinin yüzeyinde olan Fcε reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma ile bağışıklık sistemi hazırlanır. Alerjenle ikinci kere karşılaşıldığında, yüzeye bağlı IgE çapraz bağlanma gerçekleştirerek mast hücrelerinin aktivasyonuna sebep olur. Aktivasyonun devamında, inflamatuvar aracılar ortaya çıkarlar ve inflamasyonun ikinci fazı olan erken faz reaskiyonlarının yayılımı başlatılır. Mast hücrelerinden histamin, LTB4, TNFα, IL8, IL13, CCL2 ve VEGFA salınması vasküler endotelyal gerçirgenliğinin artmasına yol açarak

granülositlerin dolaşımdan dokuya alınmasını sağlar. TNFα, IL13 ve histamin hava yolu epitelinde bulunan goblet (kadeh) hücrelerine etki ederek mukus üretiminin oluşmasına neden olur.

İnflamasyon bölgesine göç eden eozinofiller, inflamatuvar yanıtın üçüncü aşaması olan geç faz reaksiyonunun başladığını gösterir. Bu yanıt alerjene maruziyetin ardından 6-9 saat sonra ortaya çıkmaktadır. Mast hücreleri tarafından salınan GM-GSF, IL5 ve IL13 sitokinleri, eozinofile infiltrasyonunun uzamasına sebep olarak eozinofilik hava inflamasyonunun başlamasında ve devam etmesinde önemli bir rol oynamaktadır.Ortaya çıkan eozinofilik degranülasyonu, goblet hücrelerinde artan mukus üretimi ve IL13 sitokininin salgılanması ile meydana gelen hava yolu bronkokonstriksiyonu; hava yolu hasarına, goblet hücrelerinde hiperplaziye ve hava yolunun yeni yapılanmasına neden olur (Felton ve ark. 2014).Sürekli alerjene maruz kalınması hücre bileşimlerinde değişikliğe ve doku yeniden şekillenmesi etkileriyle kronik inflamasyona yol açar. Eozinofillerin ve teşvik edilen mast hücrelerinin üretimi sonucu toplanan nötrofillerin submukozada sürekli bulunmaları pro-inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine, inflamatuvar rezolüsyonunun oluşamamasına ve tekrarlayan doku hasarı ve inflamasyon döngüsüne sebep olmaktadır.

Eozinofillerin baskın olduğu alerjik inflamasyonda görülen karakteristik özellikle hava yolu hiperreaktivetisine yol açan bronşiyal inflamasyon, hava yollarında mukus tıkanması, epitel bazal membran kalınlaşması, epitel hücre kaybı, inflamatuvar hücre infiltrasyonu olarak sıralanabilir (Beasley ve ark. 1989). Eozinofilden yoksun fareler (PHIL) ile yapılan çalışmalarda, eozinofillerin hava yolunda aşırı duyarlılığa, mukus birikimine ve düz kas hipertrofisi oluşumunda görev aldıkları belirtilmiştir (Lee ve ark. 2004; Humble ve ark. 2004). Buna ek olarak, OVA ile tedavi edilen PHIL farelerinde mukus seviyesinde anlamlı artış olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, hem eozinofillere bağımlı hem de bağımsız hava yolu hasar mekanizmalarının aktivasyonuna dikkat çekmektedir (Lee ve ark. 2004).

2.2.9. Alerjik Astımda Hayvan Modelleri

İnsan alerjik astımı, hava yolu inflamasyonu, AHR ve geri dönüşümlü hava yolları tıkanıklığı ile karakterize edilen hava yollarının kronik inflamasyon bozukluğu olarak tanımlanmaktadır (GINA 2023). Hava yollarında meydana gelen kronik inflamasyon ve bunun sonucunda oluşan değişikliklerin astım semptomlarını oluşumunda rol adıkları düşünülmektedir. Hava yollarında meydana gelen inflamasyonun aktında yatan biyokimyasal ve hücresel süreçler tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu süreçler üzerinde çalışmak ve terapötik yeni hedefler belirlemek adına en iyi yaklaşım hayvan modelleri ile ilerlemek olmuştur. Hayvan modelleri tamamiyle insan astımını yansıtmasa da, hastalığın mekanizmasının ve aşamalarının araştırılmasında önemli bir kaynak görevi görmektedir. Astım yapısı gereği karmaşık ve çok faktörlü bir hastalık olduğundan, tek bir hayvan modeli üzerinde geliştirilmesi mümkün olmamaktadır. Fakat hastalığın belirli özelliklerini modellenmektedir ve alerjenlere karşı alınına spesifik yanıt üzerine çalışılmaktadır. Bu çalışmalar astım hakkındaki mevcut bilgilerimizin kaynağını oluşturmaktadır.

Akut astım ve hava yolu inflamasyon modeli oluşturulan fare modelleri sensitizasyon ve provokasyon aşamalarından oluşmaktadır. Belirlenen modellerden elde edilen sonuçlar model uygulanan farenin suşu, alerjen ve sensitizasyon ve provokasyon aşamalarının süresine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Zosky ve Sly 2007). Sensitizasyon ve provokasyon aşamalarında çoğunlukla tercih edilen fare türü BALB/c fareleri olmaktadır.Diğer fare türlerine kıyasla BALB/c farelerinin iyi bir Th2 yönlü immünolojik yanıt geliştirebilmeleri yaygın olarak tercih edilmelerini sağlamaktadır (Kumar ve ark. 2008). Modellerde sensitizasyon aşamasında bir adjuvan kullanıması gerekmektedir. Çoğunlukla tercih edilen antijen alüminyum hidroksit (Alum) olmaktadır. Alum uygulaması ile Th2 yönlü immün yanıtın oluşması teşvik edilmektedir. OVA'nın insan astımında doğal bir alerjen olmaması fare modellerine tercih edilmesini engelleyen bir faktör değildir. OVA, provokasyon aşamasında kontrollü dozda uygulanabilen tanımlanmış bir antijendir. OVA provokasyonu ile oluşan immün cevap üzerinde eozinofillerin astımdaki etkileri araştırılmıştır (Mattes ve ark. 2002). OVA ile gerçekleştirilen sensitizasyon sonucunda

hafif hava yolu inflamasyonu ve AHR gelişimi gözlemlenmiştir (Nials ve Uddin 2008). Akut astım modellerinde provokasyon aşaması sonrasında, astımda görülen birçok örüntü; yüksek IgE seviyesi, hava yolu inflamasyonu, goblet hücre hiperplazi ve AHR meydana gelmektedir. Akut modellerin kısa süreli devam etmesi sebebiyle hava yolu kronik inflamasyonu ve hava yolu yeniden yapılanması gibi astım örüntülerinin çoğu meydana gelmemektedir. Ayrıca temel örüntülerin birçoğu kısa bir süre sonra çözülmektedir (Mcmillan ve Lloyd 2004). Bu kısıtlanmaya rağmen akut alerjen provokasyon modellerinde hastalık süreçleri, akciğerde immün sistemde rol oynayan immün hücrelerin biyokimyasal mekanizmalarını ve inflamasyon sürecinin nasıl düzenlendiğini araştırmak için başarıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmalardan astımın Th2 yönlü bir hastalık olduğuna dair veriler, alerjik yaıtta T hücrelerinin rolü, eozinofillerin AHR'de aldıkları roller ve alerjik inflamasyonda dahil oldukları rollere dair kanıtlar elde edilmiştir (Nials ve Uddin 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3-1'de markalarıyla birlikte belirtilmiştir.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

Cihazlar	Markası
Scanvac CoolsafeLiyofilizatör	Labogene, Danimarka
Mini santrifüj,6K	Isolab Laborgerate,Çin
Kemilüminesans Görüntüleme Sistemi	Biorad Chemidoc, ABD
Kompakt Dijital Çalkalayıcı	Thermo Scientific, ABD
Hassas tartı	Shimadzu,Japonya
Hassas Tartı	Ohaus, New Jersey, ABD
Otoklav	Hirayama HV-50L, Japonya
Soğutmalı Santrifüj	MPW 260R, Polonya
Santrifüj	Nüve NF1200, Ankara
Modüler Kompakt Reometre	MCR 102, Anton Paar, Avusturya
No-Frost Buzdolabı	Siemens, Almanya)
-80℃ Dondurucu	Esco Lexicon II, Singapur
İnverter Mikroskop	Carl Zeiss,Çin
İnkübatör	Memmert, Almanya
Biyogüvenlik Kabini	Safefast Premium 218,
Sıcak Su Banyosu	Julaba,Pura
-196º C Azot Tankı	Arpege 70
Santrifüj	Beckman/Coulter,
PZR Cihazı	CFX System, Biorad, ABD
Termal Döngüleyici T100	Biorad, ABD
PowerPac Eleftroforez Güç Kaynağı	Biorad, ABD
Blender	Waring, ABD

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Ticari Kitler

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 3-2'de markalarıyla birlikte belirtilmiştir.

Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve markaları

Kimyasal Malzemeler	Markası
DMEM/F12	Gibco
RPMI 1640	Gibco
Penisilin/ Streptomisin	Gibco
Hava yolu Epitel Hücre Besiyeri	ATCC
Bronchial Epithelial Cell Growth Kit	ATCC
Penisilin-Streptomisin- Amfoterisin B Çözeltisi	ATCC
Tripsin Nötralizasyon Çözeltisi	ATCC
Tripsin EDTA (Primer Hücreler için)	ATCC
Primer Küçük Hava Yolu Epitel Hücresi	ATCC
Prostaglandin D2 ELISA Kit	Cayman Chemical
Anti Ovalbumın IgE (Fare) ELISA Kit	Cayman Chemical
Lipopolisakkarid (LPS)	Fisher Chemical
Fötal sığır serumu (FBS)	PanBiotech
PBS	PanBiotech
DMSO	Sigma Aldrich
BSA	Merck
NaCl	Merck
CaCl	Merck
Etanol	Merck
IL5 İnsan ELISA Kit	Thermo Fisher
IgE İnsan ELISA Kit	Thermo Fisher
TNFα İnsan ELISA Kit	Cayman
RNA Isolation Kit	Zymo
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits	Applied Biosystems

SensiFAST SYBR Kit	BioLine
Alum	Fisher Scientific
Tavuk Yumurtası Beyazından Albumin	Merck

3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler Tablo 3-3'de markalarıyla birlikte belirtilmiştir.

Tablo 3-3: Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve markaları

Sarf Malzemeler	Markası
15 ve 50 mL'lik Falcon tüp	Capp
25 ve 75 cm^2'lik Flask	SantaCruz
2 mL'lik kriyotüpler	Corning
Otomatik mikropipetler	Finnpipette
96'lı mikroplaka	Corning
12'li mikroplaka	Corning
1,5 mL'lik mikrosantrfüj tüp	Capp
2,0 mL'lik mikrosantrfüj tüp	İsolab
5 ve 10 mL'lik serolojik pipet uçları	Capp
0,2 mL'lik PZR tüp	İsolab
PCR plağı- 96 kuyulu - 0,2 mL	İsolab
Nunc 96 Kuyulu Plak	Thermo Fisher
Serolojik pipetler 5 mL / 10 mL	İsolab
Pipet ucu - şeffaf - 200 µL	Capp
Parafilm - 50 x 75 mm	Sigma Aldrich
Pozitif Şarjlı Lam	Orlab
Lam	Orlab
Bistüri ucu	Beybi
Mikrotom bıçağı	Fisher Scientific
Hızlı dekalsifikasyon solüsyonu, 1000 mL	Merck

3.2. Yöntemler

3.2.1. *In vitro* Deneyler

3.2.1.1. *A.vera* Jeli (AJ) Elde Edilmesi

Çalışmamızda kullanılan *A. vera* bitki numunesi İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (ISTE)'nda 65118 numarası ile kayıtlıdır ve İstanbul Üniversitesi Alfred Heilbronn Botanik Bahçesi serasında kültürü yapılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan 5 adet *A.vera* yaprağı distile su ile yıkandıktan sonra ayrı ayrı tartıldı. Yaprakların ağırlıkları sırasıyla 157,88 g, 147,10 g, 201,89 g, 158,01 g ve 201,81 g olarak tartıldı. Antrokinonları ayırmak amacıyla kesilen yaprak kısımları aşağıda kalacak şekilde beherde 1 gece bekletildi. Beherde 1 gece bekletilen yapraklardan akan kısım distile su ile çözülerek 15 mL'lik Falcon tüpe aktarıldı ve deney yapılacağı güne kadar +4ºC'de buzdolabında saklandı. Bu işlemin ardından, yapraklar bir bıçak yardımıyla ortadan bölünerek, jel bir kaşık yardımıyla alındı. Jelin ağırlığı 539,17 g olarak tartıldı.

Jel, Waring Blender'da 2-3 dk boyunca 10 sn aralıklarla 1. seviyede homojenize edildi. Ardından jel filtreden geçirildi. Işıktan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile kaplanarak +4ºC derecede 1 gece muhafaza edildi.

3.2.1.2. *A. vera* Jelinden Ön Formülasyonunun Elde Edilmesi (PG-A)

Ön formülasyonun oluşturulabilmesi için ilk olarak *A.vera* jeli 4 gün boyunca 171 hPa'da -97 ºC'lik şartlar altında liyofilize edildi. Daha sonra liyofilize *A. vera* jelinin %20'lik (v/v) propilen glikol-PBS karışımında çözünmesi ile ön formülasyon (%0.2, w/v) elde edildi. Propilen glikol ile PBS oranı jelin viskozite ve osmolarite parametrelerine bağlı olarak belirlendi.

Reometre cihazında *A. vera* jelinin vizkozitesi 200 mPa.s olarak ölçülmüştür. Vizkozitenin uygulamaya uygun hale getirilmesi amacıyla %0,2 (w/v) oranında liyofilize *A. vera* jeli ve %20 (v/v) oranında propilen glikol çözeltisinin PBS içerisinde çözünmesiyle ön formülasyon oluşturulmuştur. Ön formülasyonun viskozite ölçümü 5mPa.s olarak elde edilmiştir.

3.2.1.3. Hücre Kültürü Deneyleri

Çalışmanın *in vitro* deneyleri kapsamında 3 farklı hücre serisi kullanılarak ko-kültür metodları uygulanmıştır. Üç farklı hücre serileri; A549 (insan adenokarsinoma alveolar basal epitel hücreleri, CCL-185, ATCC), HSAEC Sağlıklı primer küçük havayolu hücreleri olan primer hücre serisi, PCS-301-010,ATCC), THP-1 (insan lösemi monosit hücresi, TIB-202,ATCC) kullanılmıştır.

A549 hücre serisi, pasajlanması ve saklanması: A549 hücre serinin büyütülmesi için DMEM- F12 son konsantrasyonları %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin ve 100 µg/mL primosin olacak şekilde hazırlandı.

Hücrelerin gelişimi her gün invert mikroskop ile kontrol edildi. Hücrelerin yoğunluğu %80'in üzerine çıktığı zaman pasajlama yapıldı. Pasajlama işlemi için hücreler inkübatörden çıkarıldıktan sonra üstlerindeki besiyeri serolojik pipet yardımıyla çekilerek atıldı ve flaskın yüzeyi 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine % 0,25 tripsin / % 0,03 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu eklenerek inkübatör içerisinde 5 dk bekletildi. Hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskop yardımıyla kontrol edildi. İnkübasyon sonrası tripsinin etkisini inhibe etmek için, eklenmiş tripsin/EDTA solüsyonun iki katı kadar FBS'li besiyeri yüzen hücrelerin üzerine eklenerek 15 mL'lik tüplere alındıktan sonra 150 x g'de 5-7 dk santrifüj edildi. Planlanan deneyler için hesaplanan hücre sayısı ile deneylere devam edildi. Geriye kalan hücreler kriyo tüplerde besiyeri ve besiyerinin %10 (v/v) oranında kriyoprotektan olarak kullanılan DMSO eklendi. Kriyo tüpler dondurma kaplarında önce -80ºC'de 24 saat bekletildikten sonra -196ºC' ye sahip azot tankına transfer edilir.

HSAEC hücre serisi, pasajlanması ve saklanması:HSAEC hücre serisine özgü olan Havayolu Epitel Hücre Bazal Besiyeri Bronşiyal Epitelyal Hücre Büyütme Kitinin içerisinde bulunan büyüme faktörlerinin besiyerinde final konsantrasyonları HSA 500 µg/mL, Linoleik Asit 0.6 µM, Lesitin 0.6 µg/mL,6 mM L-glutamin,% 0,4 Extract P, Epinefrin 1.0µM, Transferrin 5 µg/mL, T3 10 nM, Hidrokortizon 1 µg/mL, rh EGF 5 ng/mL, rh Insülin 5 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. Laminar hava akışlı kabin içerisinde 25 cm^2'lik flasklara besiyerinden 5'er mL eklendi ve hücreler, mikropipet yardımıyla flasklara aktarıldı. Hücrelerin gelişimi her gün mikroskop ile gözlemlenerek besi ortamları yenilendi. Hücreler kültür kabının %80'ini kapladıklarında pasajlanarak kültürün devamı sağlandı. Hücreler pasajlanırken flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı,

hücreler PBS ile yıkandı ve yapışan hücreleri kaldırmak için HSAEC hücreleri için özel alınmış olan Tripsin/EDTA solüsyonu eklendi. Flask inkübatörde 7 dakika bekletildikten sonra hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları mikroskopta kontrol edildi ve tripsinin etkisini nötralize etmek için üzerilerine Tripsin Nötralizasyon Solüsyonu eklendi. Santrifüj tüpüne aktarılarak 150 x g 'de 5 dk santrifüj edildi. Planlanan deneyler için hesaplanan hücre sayısı ile deneylere devam edildi. Geriye kalan hücreler kriyo tüplerde besiyeri ve besiyerinin %5 (v/v) oranında kriyoprotektan olarak kullanılan DMSO eklenir. Kriyo tüpler dondurma kaplarında önce -80 ºC'de 24 saat bekletildikten sonra -196 ºC' ye sahip azot tankına transfer edildi.

THP-1 hücre serisi, pasajlanması ve saklanması: Herhangi bir yüzeye gereksinim duymadan besi ortamınsa askıda çoğabilen süspanse hücrelerden olan THP-1 hücre serisinin büyütülmesi için RPMI-1640 besiyerine, son konsantrasyonları %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin olacak şekilde eklendi. Hücrelerin gelişimi her gün invert mikroskop ile kontrol edildi. Hücrelerin yoğunluğu mL'de $8x10^5$ hücre sayısına ulaştığında pasajlama yapıldı. Pasajlama işlemi için hücreler inkübatörden çıkarıldıktan sonra üstlerindeki besiyeri serolojik pipet yardımıyla çekilerek atıldı ve flaskın yüzeyi 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine % 0,25 tripsin / % 0,03 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu eklenerek inkübatör içerisinde 5 dk bekletildi. Hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskop yardımıyla kontrol edildi. İnkübasyon sonrası tripsinin etkisini inhibe etmek için, eklenmiş tripsin/EDTA solüsyonun iki katı kadar FBS'li besiyeri yüzen hücrelerin üzerine eklenerek 15 mL'lik tüplere alındıktan sonra 125 x g'de 5-7 dk santrifüj edildi. Planlanan deneyler için hesaplanan hücre sayısı ile deneylere devam edildi. Geriye kalan hücreler kriyo tüplerde besiyeri ve besiyerinin %10 (v/v) oranında kriyoprotektan olarak kullanılan DMSO eklendi. Kriyo tüpler dondurma kaplarında önce -80 ºC'de 24 saat bekletildikten sonra -196 ºC' ye sahip azot tankına transfer edildi.

3.2.1.4. Hücre Canlılık Tayini

AJ ve PG-A hücre canlılığınına olan etkisinin belirlenmesi için MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi kullanıldı. MTT testi için Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide tozu (Sigma-Aldrich) 5 mg/mL olacak şekilde PBS içinde çözülüp, 0.22 µm PES şırınga filtresinde geçirildi ve kullanılana kadar -20°C'de bekletildi. Belirlenen konsantrasyonlarda AJ, PG-A ve kontrol grupları için üçlü tekrar olacak şekilde 24, 48 saatlik deney grupları oluşturuldu. Testin uygulamasından bir gün önce

HSAEC ve A549 hücre serilerine ait hücrelerin 96 kuyulu plakaya kuyu başına 100 µL antibiyotiksiz besiyerinde $1x10^4$ hücre olacak şekilde ekimi yapıldı. Hücreler inkübatörde bir gün inkübe edildikten sonra mikroskopta kontrolleri yapıldı. Kontrol grubuna ise sadece besiyeri eklendi. 37°C'de %5 CO_2'li inkübatörde 24. ve 48. saatlerde inkübasyon sürelerini tamamlayan hücre hatları inkübatörden alınarak mikropskopta kontrol edildi. Plakaların her bir kuyucuğunun üzerinde önceden hazırlanan MTT reaktifinden 20 µL ilave edildi. Işıktan korunanarak inkübatörde 4 saat bekletildikten sonra kuyucukların üzerleri boşaltıldı ve her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklendi. Plakalar oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra absorbans değerleri mikroplaka okuyucuda 540 nm'de ölçüldü.Ölçüm sonrası canlılık yüzdesi hesaplamasında ;

% Canlılık={100 × (Maruziyete uğrayan hücrenin absorbansı ortalaması-kör ortalama) / (Kontrol hücre absorbansı ortalaması-kör ortalama}formülü kullanıldı.

IC_{50} Hesaplanması:

Çalışma sonucunda elde edilen verilerle IC_{50} değeri çevrimiçi bir araç olan MLA-"Quest Graph™ IC_{50} Calculator" (AAT Bioquest, Inc., https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator (erişim tarihi 5 Temmuz 2021)) kullanılarak hesaplanmıştır. IC50 hesaplamada kullanılan formül;

IC_{50} Denklemi

$$Y = Min + \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^{Hill\ coefficient}}$$

Denklem 3.1: IC50 Hesaplama Denklemi

3.2.1.5. Rölatif mRNA Ekspresyon Deneyleri

Total RNA izolasyonu: Hücre hatlarından RNA izolasyonu için Quick-RNA Miniprep kiti (Zymo Research) kullanıldı. RNA'ların eldesi için aşağıdaki protokol izlendi;

1) Hücre kültürü flaskının yüzeyine yapışık halde bulunan hücreler tripsin/EDTA kullanılarak kaldırıldı ve hücre pelleti santrifüj ile çöktürüldükten sonra süpernatant atılarak hücreler 1XPBS ile yıkandı.

2) Hücre pelletinin üzerine 300 µL RNA Lysis Buffer eklendikten sonra vorteks yapıldı ve lizat 10000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

3) Süpernatant kitin içeriğinde yer alan Spin-Away Filter kolonuna alındı ve 10000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

4) Kolondan süzülen kısmın üzerine 300 µL %99 etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Elde edilen karışım kitin içeriğinde yer alan Zymo-Spin IIICG kolonuna alındı ve 10000 x g'de 30 sn santrifüj edildi.

5) Kolon 400 µL RNA Wash Buffer ile yıkandıktan sonra DNaz I muamelesi için üzerine 80 µL DNaz I reaksiyon karışımı eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.

6) İnkübasyon sonrası kolonun üzerine 400 µL RNA Prep Buffer eklendi ve 10000 x g'de 30 sn santrifüj yapıldı. Ardından süzülen kısım atıldı. Daha sonra sırasıyla 700 µL ve 400 µL RNA Wash Buffer kolonun üzerine eklendi ve 10000 x g'de 30 sn santrifüj yapıldıktan sonra süzülen kısım atıldı.

7) Son olarak kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve matriksinin üzerine 30 µL DNase/RNase-free su eklenildikten sonra 10000 x g'de 30 sn santrifüj yapıldı.

Elde edilen RNA'ların spektrofotometrede saflıkları ve konsantrasyonları mikroplak okuyucu spektrofotometre cihazında ölçüldü. A230/A260 oranı 1,8-2,1 aralığında olan RNA örnekleri temiz kabul edildi. Bir sonraki deneye kadar RNA'lar -80 ºC'de muhafaza edildi.

cDNA sentezi: cDNA Synthesis Kit (SensiFAST cDNA Synthesis Kit) kullanılarak, önerilen protokole göre gerçekleştirildi. -20°C'de muhafaza edilen kitin içeriğindeki solüsyonlar buz üzerinde eritildi ve Tablo 3-4'de belirtilen miktarlar örnek başına hesaplanarak 2X RT master karışım hazırlandı. Buz üzerinde bekletilen master karışım vortekslendikten sonra 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 10 µL dağıtıldı. cDNA sentezi yapılacak her bir örneğin başlangıç RNA miktarı 100 ng olacak şekilde kuyulara eklendi ve toplam hacim 20 µL olarak ayarlandı. Son olarak plağın üstü yapıştırma filmi ile kapatıldı ve cihaza yerleştirilene kadar buz üzerine bekletildi. Cihaz programının adımları sırasıyla; 25°C 10 dk, 42°C 15 dk, 85°C 5 dk ve 4°C ∞ olacak şekilde ayarlandı.

Sentezi biten örnekler Sonrasında, GZ-kPZR işlemi için -20°C'lik dondurucuda muhafaza edilecektir.

Tablo 3-4: 2X RT Master Karışım İçeriği

Malzeme	**Hacim**
10X RT Tamponu	2 µL
25X dNTP Karışımı	0,8 µL
10X RT Random Primerler	2 µL
Ters Transkriptaz	1 µL
dH_20	4,2 µL
Son Hacim	**10 µL**

Gerçek Zamanli Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-kPZR):
GZ-PZR deneyine başlanmasından önce primerlerin erime sıcaklığı belirlenmiştir.

Primerlerin Erime Sıcaklığının Belirlenmesi: Özgül primerler Primer3 v4.1.0 programı (http://primer3.ut.ee/) kullanılarak tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin erime sıcaklıkları (Tm) gradient PZR yapılarak belirlenmiştir. Liyofilize olarak sentezi yaptırılan primerler (Sentromer DNA Teknolojileri, Türkiye) 100 µM ana stok olacak şekilde distile su (dH2O) ile sulandırıldı, hazırlanan stoklar kullanıma kadar -20°C'de saklandı (Tablo 3-5). Çalışma stoğu forward ve reverse primerlerin dH2O ile 1:10 oranında sulandırılması ile hazırlandı. Primerlerin erime sıcaklığın (Tm) belirlenmesi için her bir primere konvansiyonel PZR işlemi uygulandı. GZ-PZR karışımı, her bir örnek için 18µl olacak şekilde aktarılacak ve 2µl cDNA örnekleri eklendi. Termal döngü, 95°C'de 2dk 1 döngü ön denatürasyonun ardından toplam 40 döngülük 95°C 5sn denatürasyon, 54 – 62 °C arasında 8 farklı sıcaklık denenerek 10sn bağlanma ve 72°C'de 20 sn sentez ile tamamlandı. Çalışılan sıcaklıklar 62°C, 61.4°C, 60.4 °C, 58.9 °C, 57.1°C, 55.5°C, 54.6°C, 54.0°C dereceleri arasında uygulanmıştır. Sentez bittikten sonra %2'lik agaroz jel döküldü ve her kuyudaki örnek yükleme tamponu ile beraber yürütüldü. Optimal sıcaklık 61°C olarak belirlenmiştir.

Tablo 3-5: GZ-PZR için kullanılan sitokinlere özgü primer dizileri

GEN ADI	PRİMER DİZİLERİ
IFNγ	F 5'- TCGGTAACTGAZTTGAATGTCCA- 3'
	R 5'- TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC- 3'
IL1β	F 5'-AAGCTGAGGAAGATGCTG-3'
	R 5'-ATCTACACTCTCCAGCTG-3'
IL6	F 5'-TCTCCACAAGCGCCTTCG- 3'
	R 5'- CTCAGGGCTGAGATGCCG- 3'
TNFα	F 5'-CCTGCCCCAATCCCTTTATT-3'
	R 5'-CCCTAAGCCCCCAATTCTCT-3'

GZ-PZR gerçekleştirilmesi için son reaksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı (Tablo 3-6). Karışım ve cDNA örnekleri 96 kuyulu PZR plağına dağıtıldıktan sonra cihaza termal protokol verileri işlendi (Tablo 3-7) ve üç adımlı GZ-PZR ile floresan okuma gerçekleştirildi.

Tablo 3-6: GZ-PZR deneyi için hazırlanan karışımın içeriği

MALZEME	HACİM	SON KONSANTRASYON
2X SensiFAST SYBR No-Rox Mix	10 µL	1 x
10 µM forward primer	0,8 µL	400 nM
10 µM reverse primer	0,8 µL	400 nM
dH2O	6,4 µL	-
cDNA	2 µL	-
Son hacim	**20 µL**	-

PZR için uygulanan termal protokol;

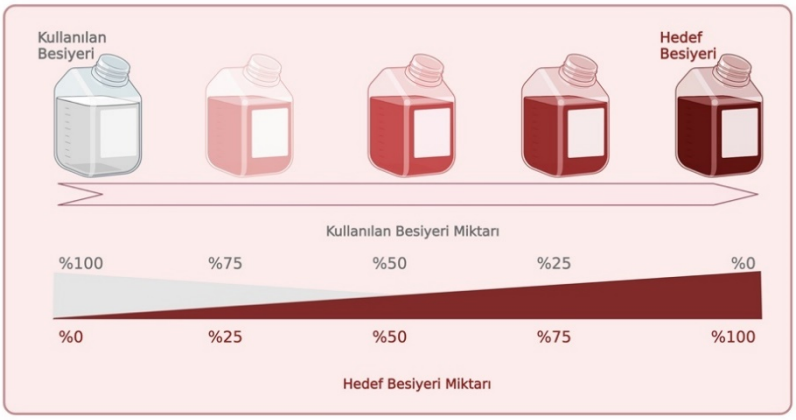
Tablo 3-7: GZ-PZR deneyinde uygulanan termal protokol

DÖNGÜ	SICAKLIK	SÜRE	İŞLEM
1	95 ºC	2 dk	Polimeraz Aktivasyonu
	95 ºC	5 sn	Denatürasyon
40	60-65 ºC	10 sn	Primer Bağlanması
	72 ºC	5-20 sn	Uzama

Primerin bağlandığı floresan artış görülen örneklerden elde edilen grafiklerdeki *cycle of threshold* (Ct) verileri kullanılarak değerlendirildi. Referans gen olarak ACTB kullanılmıştır. mRNA ekspresyon değerlerinin belirlenmesi için yapılan GZ-PZR deneylerinde kullanılacak her örnek ikili olarak çalışıldı. Elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. Genlerin artış, azalış oranları$2^{-\Delta\Delta Ct}$yöntemi kullanılarak hesaplandı (Livak ve Schmittgen 2001). İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak belirlenmiştir. İstatiksel analizler GraphPad Prism 9.0 arayüzü ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.6. Ko-kültür Deneyleri

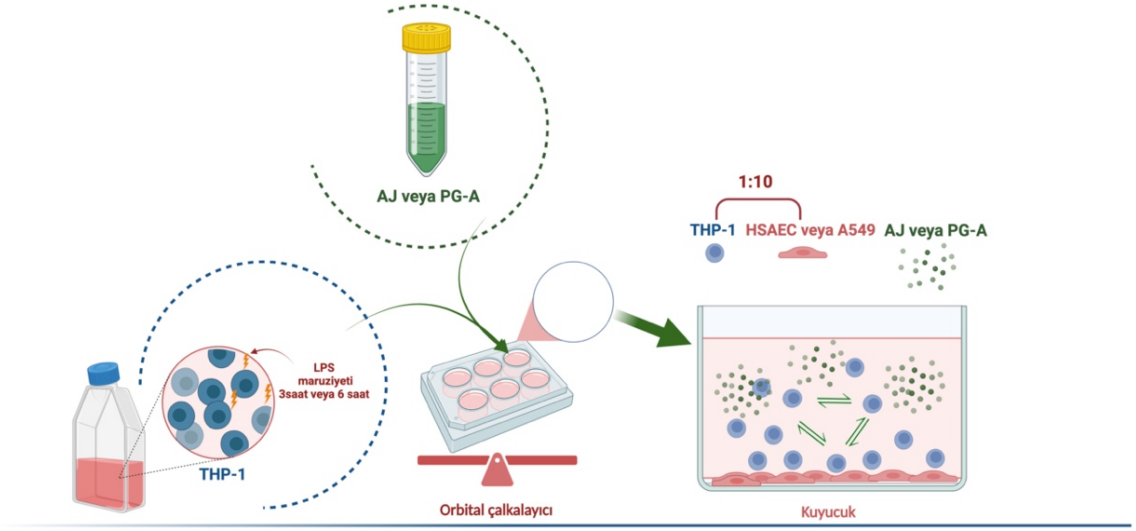
Ko-kültür deneyine özel kullanılacak olan THP-1 hücre serisinin büyütülmesi için kullanılan RPMI-1640 besiyeri, son konsantrasyonları %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin olacak şekilde hazırlandı. Deneyde öncelikle A549 ve HSAEC hücre hatlarının DMEM-F12 besiyerine adaptasyonu çalışıldı. 1. hafta boyunca 2-3 günde bir besiyeri değiştirildi. 2. haftada her 3 günde bir hücre serisinin besiyerine adaptasyonu ve mikroskopta büyüme durumlarına ve morfolojik değişimleri takip edilerek %25 oranında hedef besiyerinin miktarının arttırma işlemi yapıldı (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Ko-kültür deneyinde çalışılan besiyeri adaptasyonu.
(Şekil Biorender.com ile oluşturulmuştur)

Hücrelerin adaptasyonu tamamlandığında A549 hücresi ve HSAEC hücreleri 3.2.1.3'de belirtilen hücrelerin pasajlanması ve saklanmasını içeren aşamalar uygulandı. Hücreler 2 adet 48 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa 1ml' ye 100.000 hücre denk gelecek şekilde ekim yapıldı. 24 saat sonra THP-1 hücrelerine 3 saatlik ve 6 saatlik 1µg/ mL konsantrasyonunda LPS maruziyeti uygulandı. Her bir maruziyet süresinin bitişinde THP-1 hücreleri 1800 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı. Sonrasında her bir kuyucuğa literatürde belirtildiği (Keuper ve ark. 2011) gibi A549/ HSAEC hücreleri ile THP-1 hücreleri arasında 1:10 oranında olacak şekilde ekim yapıldı.

Uygulama için AJ 7,8µg /mL, AJ 3,9 µg /mL, PG-A 7,8µg /mL ve PG-A 3,9 µg /mL maddeleri plaklara belirtilen konsantrasyonlarda eklendi. Grandel ve ark'larının yaptığı çalışmada direkt-direkt hücre etkileşimi olmadığı LPS maruziyetine sahip ko-kültür modelinde sitokinlerin tespit edilemediğini belirtmişlerdir (Grandel ve ark. 2009). Referans araştırmadan hareketle ko-kültür yapılan plakaları 24 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde 30 rpm hızda adherent hücreler ile süpernanant direkt temas kurması sağlandı (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: Ko-kültür deney şeması. (Şekil Biorender.com ile oluşturulmuştur.)

Süre bitiminde süpernanantlar sonrasında yapılacak olan ELISA deneyi için kullanılmak üzere -20ºC'ye kaldırılmıştır. Ayrıca kültür plaklarındaki adherent hücre serileri olan A549 ve HSAEC hücreleri total RNA izolasyonu için tripsinizasyon uygulaması ile toplandı (Grandel ve ark. 2009; Keuper ve ark. 2011).

3.2.1.7. ELISA Deneyleri

Ko-kültürü deneyi bitiminde elde edilen süpernantantlardan ELISA deneyleri gerçekleştirildi. ELISA mevcut antijen veya antikor niktarının özgül olarak belirlenmesi üzerine dayanan bir yöntemdir. ELISA yönteminde hedef antijenin immün sistem tarafından üretilen antikorlar tarafından yüksek özgüllükte tanınması temeline dayanmaktadır.

İnsan TNFα ve IFNγ Ölçümü:

İnsan TNFα ve IFNγ ELISA testleri, insan serumu, plazması, tamponlanmış çözeltiler veya hücre kültürü ortamındaki insanTNFα ve IFNγseviyesini tespit etmek ve ölçmek için tasarlanmıştır.İlgili protokol;

- Hücre süpernatantları -20ºC'den alınarak 1:10 oranında uygun tampon ile dilüe edildi. Kit protokolüne bağlı olarak standartlar hazırlandı.

- 16 mL Yıkama Tamponunu (25X) 384 mL deiyonize veya distile su ile dilüe edilerek 1X Yıkama Tamponu elde edildi.

- Çalışılan sitokine ait liyofilize halde olan standardı, standart seyreltme tamponu ile 1000 pg/mL konsantrasyonda olacak şekilde çözüldü.

- Sıralanmış 7 tüpün her birine 300 µL standart seyreltici tampon eklenerek: 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 ve 0 pg/mL seri konsantrasyonlarda standartlar elde edildi.

- Streptavidin-HRP 100X çözeltisinden 10µL'si bir tüpe alınarak Streptavidin-HRP seyreltici ile 1mL'ye tamamlandı.

- Kuyucuklara 100 µL standart, tampon veya numune eklendi.

- Plaka kaplama filmi ile örtülerek oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

- Süre bitiminde kuyucuklardaki çözelti iyice aspire edilerek 1X yıkama tamponuyla 4 kez yıkandı.

- Kuyucuklara 100 µL biyotin konjugat çözeltisi eklendi.

- Plaka kaplama filmi ile örtülerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

- Süre bitiminde kuyucuklardaki çözelti iyice aspire edilerek 1X yıkama tamponuyla 4 kez yıkandı.

- Kuyucuklara 100 µL 1X Streptavidin-HRP çözeltisi eklendi.

- Plaka kaplama filmi ile örtülerek ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

- Süre bitiminde kuyucuklardaki çözelti iyice aspire edilerek ve 1X yıkama tamponuyla 4 kez yıkandı.

- Kuyucuklara 100 µL stabilize kromojen eklendi. Substrat çözeltisinin mavi renge dönüşümü gözlendi. Oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

- Kuyucuklara 100 µL durdurma solüsyonu eklenerek, kuyucukların mavi renkten sarı renge dönüşümü gözlemlendi.

- Plakaların absorbansı 2 saat içinde mikroplaka okuyucuda 450 nm'de ölçüldü. Standart örneklere göre grafik eğrisi oluşturularak, her bir örnekteki sitokin miktarı denkleme göre belirlendi.

3.2.2. *In vivo* Deneyler

In vivo aşamaları için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onam onayı alınmıştır (06.12.2019 tarihli 2019/265 sayılı karar).

3.2.2.1. Hayvanların Temin Edilmesi ve Takibi

Deneylerde çalışılan 28 adet 6-8 haftalık BALB/c türü fareler, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma merkezi tarafından temin edildi. Tüm farelere 23ºC kontrollü sıcaklık ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık siklusu uygulandı. Farelere yem ve su kısıtlaması yapılmaksızın yemleri periyodik tartım takibi yapılarak verildi. Takip süreleri boyunca model oluşturulması, tedavilerin uygulanması gibi tüm süreçler boyunca ileri çalışmalar için kan örneklerinden serum elde edildi. Deney grubu ketamin/ksilazin anestezik maddelerinin 1:1 oranında karışımı her bir fareye intraperitonal yol ile uygulandı. Fareler anestezi altındayken kalplerinden insülin enjektörü ile kan alınarak yaşamları sonlandırıldı. Toplanan kan örnekleri hemogram ölçümü için K2EDTA içeren mor kapaklı 0,5 mL'lik pediatrik tüplere alındı. ELISA deneyleri için Li/Heparin içeren yeşil kapaklı 0,5 mL'lik pediatrik tüplere alınan kan örnekleri 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen kan serumları -20ºC' de muhafaza edildi.

3.2.2.2. Akut Astım Modelinin Oluşturulması

Çalışmaya dahil edilen 3 grupta toplam 28 adet hayvan ile deneyler gerçekleştirilmiştir (Tablo 3-8).

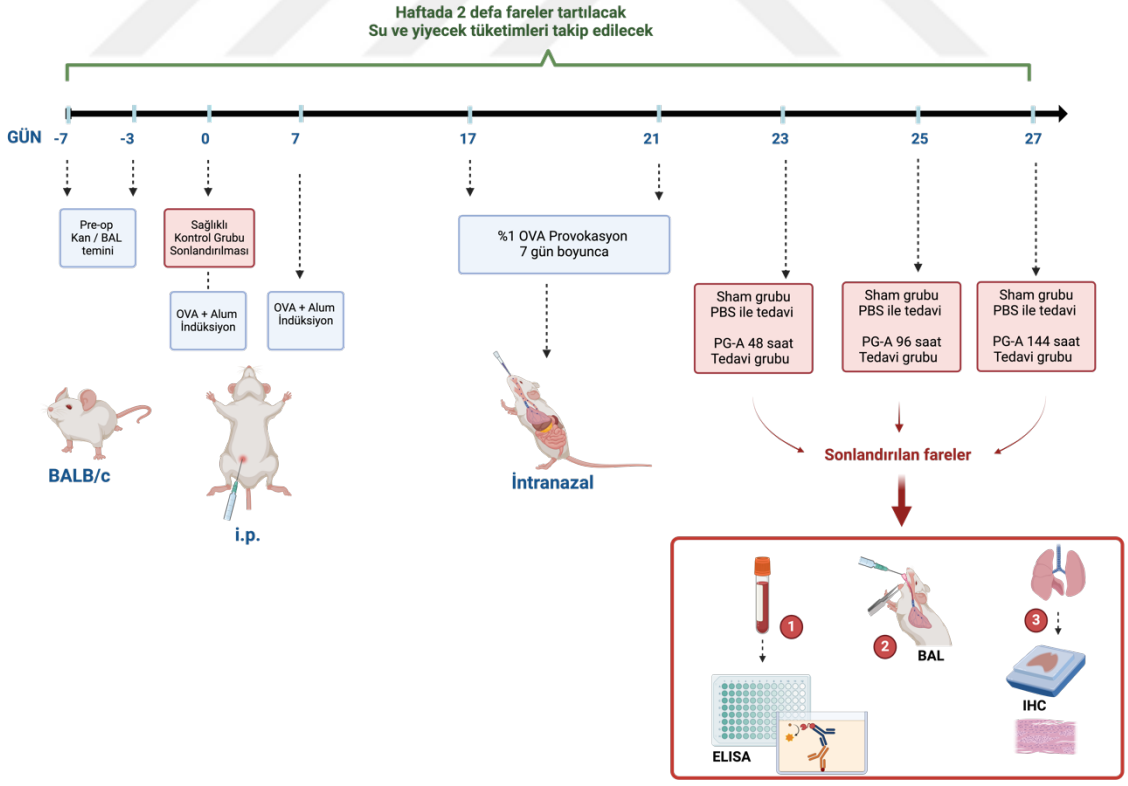
Tablo 3-8: Akut astım modeli oluşturulan gruplar

Grup Adı	**Hayvan Sayısı**	**Muamele**
Sağlıklı Kontrol Grubu	4	Hiçbir uygulama yapılmamış grup
Pozitif Kontrol (Sham) Grubu	6	Sadece akut astım modeli oluşturulan ve 1X PBS ile tedavi uygulanan grup
PG-A 48 saat Tedavi Grubu	6	Akut astım modeli oluşturulan ve 2 gün süresince PG-A ile tedavi uygulanan grup
PG-A 96 saat Tedavi Grubu	6	Akut astım modeli oluşturulan ve 4 gün süresince PG-A ile tedavi uygulanan grup

PG-A 144 saat Tedavi Grubu	6	Akut astım modeli oluşturulan ve 6 gün süresince PG-A ile tedavi uygulanan grup

6-8 haftalık BALB/c farelere duyarlılaştırma (sensitizasyon) ve provokasyon olarak iki aşama içeren 21 günlük akut astım modeli uygulanmıştır (Şekil 3-3). Yapılan çalışmalarda akut astım modellerinde ev tozu akarı ve hamamböceği özleri gibi klinik öneme sahip olabilecek alerjenler olduğu ortaya koyulmuştur (Lukacs ve ark. 2002; Ulrich ve ark. 2008). Ovalbumin (OVA) ile oluşturulan astım modelleri klinik astımın birçok özelliğinin çalışılabilmesine imkan verir. Bu sayede astım ile ilgili yeni strajeleri ve terapötik hedefler üzerine çalışılabilmektedir. $Al(OH)_3$(Alum) gibi adjuvanların bağışıklık sisteminde akut astım modeli için gerekli olan Th2 fenotipinin gelişimini teşvik ettiği gösterilmiştir (Brewer ve ark. 1999).

Uyguladığımız akut astım modelinde Alum ve OVA ile gerçekleştirilen sensitizasyon ve provokasyon aşamaları sayesinde bronkoalveolar lavaj işleminde yüksek inflamatuvar yanıta sahip hücreler elde edilmektedir (Daubeuf ve Frossard 2012).



Şekil 3-3: BALB/c farelerde akut astım modeli geliştirilmesi. (Şekil Biorender.com ile oluşturulmuştur)

Ovalbumin ve Alum çözeltilerinin hazırlanması:

-200 mg ovalbumin tartılarak 50 mL'lik Falcon tüpünde 50 mL soğuk steril salin içerisinde çözüldü. Bu sayede 4 mg/mL konsantrasyona sahip ovalbumin çözeltisi elde edildi.

-Çözeltinin 20 mL'sini 1 mL'lik alikotları halinde 1,5 mL'lik mikrotüplere dağıtıldı. Alikotlar 80ºC'de muhafaza edildi.

-Çözeltinin diğer 20 mL'si ½ oranında seyreltilerek (2 mg/mL) 1mL'lik alikotlar halinde dağıtıldı. Alikotlar -80ºC'de muhafaza edildi.

-Kalan 4 mg/mL çözeltiden 4 mL alınarak soğuk steril salin içerisinde 1:10 oranında dilüe edildi. 1mL'lik alikotlar halinde mikrotüplere dağıtıldı. Alikotlar -80ºC'de muhafaza edildi.

-Alum 5 mL'lik steril tüplerde 80 mg eklenerek 40 mg/mL olarak alikotlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

OVA ve Alum ile sensitizasyon aşaması:

-İşleme başlamadan önce alikotları hazırlanmış olan OVA ve Alum çözeltileri oda sıcaklığına getirildi.

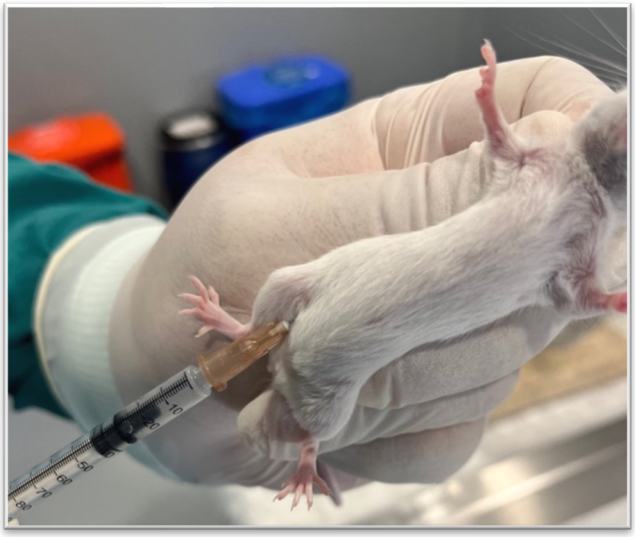
-1 mL steril salin içerisinde dilüe edilmiş ovalbumin üzerine 1 adet alikot Alum eklendi ve 4 mL'ye salin ile tamamlandı.

-OVA'nın Alum üzerine adsorbe olabilmesi için 4ºC'de 4 saat boyunca rotator mikserde karıştırıldı (Alum tam çözünmeyeceğinden karışım süspansiyon olarak kalmaktadır).

- Uygulama için fareler sırt derisinden tutularak başı yukarıda, arka bacakları aşağıda kalacak pozisyona getirilerek kuyruğu parmaklar arasında kalacak şekilde tutuldu.

-OVA-Alum süspansiyonu 1mL hacminde 25G'lik şırınga ile intraperitonal (i.p.) enjeksiyon yoluyla fare başına 4mL/kg olarak uygulandı.

- Bu işlem, her gün olmak üzere 7 gün boyunca uygulandı (Şekil 3-4).



Şekil 3-4:BALB/c farelere intraperitonal yolla OVA/Alum uygulanması

OVA ile provokasyon:

-Sensitizasyon işleminin ardından 10 gün hiçbir işlem uygulanmadı.

-Daha önce hazırlanmış olan 0,4 mg/mL konsantrasyonundaki OVA çözeltisinden 1 adet alınarak, oda sıcaklığına getirildi ve vorteks yapıldı.

-Uygulama öncesinde farelere anestezi uygulandı; fare sırt derisinden tutularak başı yukarıda, arka bacakları aşağıda kalacak pozisyona getirilerek kuyruğu parmaklar arasında kalacak şekilde tutuldu. Anestezik maddeler olan ketamin ve ksilazin 1:1 oranındaki solüsyonundan fare başına 4 mL/kg i.p. olacak şekilde enjekte edildi. Fareler hareketsiz kalana kadar beklendi.

- Anestezi sağlandıktan sonra, fareler, başı yukarıda ve arka bacakları aşağıda kalacak pozisyonda tutularak steril 20 µL'lik mikropipet ucu ile her bir burun deliğine 12,5 µL OVA solüsyonu damlalar halinde intranazal(i.n.) olarak uygulandı.Damlaların, nefes alımı ile buruna çekilmesi beklendi.

-Farelerin en az 1 dakika dikey pozisyonda kalması sağlanarak, normal nefes alıp almadığı gözlemlendi.

-Bu işlem 4 gün boyunca, günde bir defa tekrar edildi (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: BALB/c farelere intranazal yolla OVA uygulanması.

3.2.2.3. *A.vera* Formülasyonunun Uygulanması

Oluşturulan PG-A, akut astım modeli oluşturulmuş farelere 3.2.2.2 bölümünde belirtildiği gibi i.n. olarak uygulandı. Formülasyonun fare başına uygulanmış olan konsantrasyonu vücut yüzey alanı baz alınarak hesaplandı (Cheung ve ark 2009). Farelerin periyodik olarak tartımları yapılarak kilo değişimlerine bağlı olarak uygulanacak olan dozlar temelde PG-A 7,8 µg/mL baz alınarak formülde yeniden hesaplanarak uygulandı.

3.2.2.4. Farelerin Sonlandırılması ve kan, akciğer örneklerinin toplanması

Her bir sonlandırma aşamasında ileri çalışmalar için farelerden iki grupta örnekler temin edildi. Sağlıklı kontrol grubu olarak herhangi bir model oluşturulmayan 6-8 haftalık fareler 7.günün sonunda sonlandırıldı (n=4). Sham grubunda 6 fare bulunmakta ve fareler histolojik incelemeye ve bronkoalveolar lavaj sıvısı (BALF) için kullanılmak üzere ayrıldı. Sham grubu model uygulanan farelere 1X PBS tedavisi uygulanmasının ardından sonlandırıldı. Deneysel PG-A tedavi grupları toplam 18 hayvandan oluşmaktadır. Deneysel PG-A grubu model uygulanan farelere PG-A tedavisi uygulanmasının ardından sonlandırıldı Altılı her bir kafes grubundan 3'er hayvandan sağ/sol akciğer histoloji için sonlandırılan farenin sol akciğerinin üst/alt lobları ve bronşları kasetlere alınarak %10'luk

formaldehit çözeltisi içerisine aktarıldı. Aynı şekilde bronkoalveolar lavaj örnekleri için altılı gruptan diğer 3 hayvandan bronkoalveolar lavaj sıvısı elde edildi.

BALF Eldesi:

- İşlem öncesinde farelere, 4 mL/kg i.p ketamin ve ksilazin solüsyonu (1:1) ile anestezi uygulandı

-İlk olarak fareler dorsal dekübitus pozisyonuna getirilerek makas yardımıyla trakea üzerindeki boyun derisinde kesi açıldı. Tükürük bezleri ortaya çıkarılarak yukarıya doğru açılması sağlandı.

- Boyunda bulunan sternohyoid kası ortaya çıkarıldıktan sonra kas uzunlamasına kesildi ve trakea ortaya çıkarıldı.

- 21G kanül ile trakeanın içerisine girebilmek için trakeada küçük yarı kesik açılarak bu kesiden içeriye kanül ile girildi fakat kanülün fazla ilerlememesine dikkat edildi.

-Kanül trakeanın altında geçirilen iplik ile sabitlenerek 1 mL'lik şırınga ile 0,5 mL hacminde PBS+%5 FBS çözeltisi ile enjeksiyon yapıldı (Şekil 3-6).

-İlk lavaj için çözelti aspire edilerek 15 mL'lik bir Falcon tüpüne alınır. Prosedür 3-4 kere tekrarlandı (Şekil 3-6).

-Toplanan BALF 1800 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra 3.2.1.5 başlığı altında anlatılmış olan Zymo- Quick RNA MiniPrep Kit protokolüne bağlı olarak RNA örnekleri elde edildi.



Şekil 3-6: BALB/c fareden BALF örneğinin alınma aşaması.

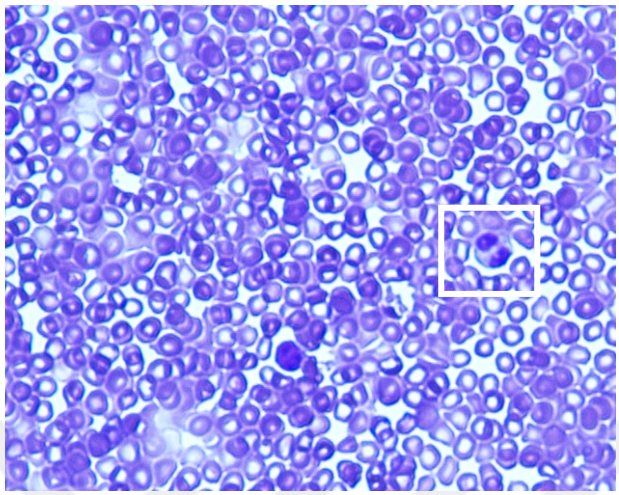
Kan örneklerinin alınması:

Grupların belirli zamanlarda hemogram verilerini elde edilmesi için farelerin fasiyal veninden kan örnekleri temin edildi. Kan örnekleri hemogram analizi için mor kapaklı pediatrik tüplere, serum eldesi için yeşil kapaklı pediatrik tüplere alındı. Serum eldesi için kan tüplerine 2000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemi uygulandı. Elde edilen serum örnekleri ELISA deneyleriiçin -20ºC'de saklandı.

Eozinofillerin Boyanması: Alerjenle indüklenmiş havayolu inflamasyonu modeli çalışılan farelerden eozinofil sayımı için pozitif kontrol ve PG-A tedavisi uygulanan grupların sensitizasyon ve provokasyon aşamalarında kan örnekleri alındı. İlgili protokol;

- Fareden alınan bir damla kan lam yüzeyine yerleştirildi. İkinci bir lam yayıcı olarak kullanıldı. Yayıcıyı kan damlasına doğru damlaya değene kadar 45 derecelik eğim ölçüsünde eğildi ve kan damlasının lamın sonuna kadar yayılması sağlandı. Oda sıcaklığı birkaç dakika kurumaya bırakıldı ve kurumuş lama May-Grünwald boyası damlatıldı. 1 dakika beklendikten sonra lam distile su ile 1 dakika boyunca yıkandı. Ardından lama

Giemsa boyası damlatıldı ve 15 dakika bekletildi. Süre sonunda lam distile su ile yıkandı ve eğik pozisyonda kurumaya bırakıldı. Lam, kenarında kan tabakasının çok inceldiği bir yere bir damla immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta incelendi (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: Işık mikroskobunda 40X eozinofil hücresi görüntüsü.

Histopatolojik inceleme için hemotoksilen-eozin boyaması: Alerjenle indüklenmiş havayolu inflamasyonu modeli çalışılan farelerden histolojik inceleme için sağlıklı kontrol, pozitif kontrol (sham) ve PG-A tedavisi uygulanan grupların sol akciğer loblarına ait doku kesitleri alındı. İlgili protokol;

-İlk aşama olan deparafinizasyon işleminde,lamdaki parafinin erimesini sağlayan etüvde bekleme ve parafinin dokudan uzaklaştırılması için uygulanan ksilen maruziyeti işlemlerini içerir. Doku taşıma sepetine yerleştirilen doku kesitleri 35-40^{o}C'lik etüvde 15 dakika bekletildi. Doku kesitleri ısı işleminden sonra iki ayrı kaptaki ksilolde 10'ar dakika bekletildi. Bu işlem sonunda lamdaki ve dokulardaki parafinler uzaklaştırıldı İkinci aşama olan hidrasyon işleminde, dokular sırasıyla dereceli alkollerin (%96, 90, 80, 70 etil alkol) her birinde 2-3 dakika bekletildi. Sonrasında doku kesitleri distile suda 10 dakika bekletilerek dokuların kaybettiği su yeniden kazandırıldı. Ardından lam sepeti hemotoksilen boya kabına daldırıldı ve 4 dakika bekletildi. Lam sepeti fazla boyadan arındırılması amacıyla boyadan çıkarılarak distile suda 2 dakika bekletildi. Hemotoksilen ile boyanan lam sepeti eozin boyasında 1 dakika bekletildi. Sonrasında lamlar çeşme suyunda yıkanarak boyama işlemi tamamlandı. Doku kesitleri tekrardan artan alkol derecelerine sahip çözeltilerden geçirilerek etüvde kurutuldu. Son olarak lamlar ksilen ile muamele edildi.

3.2.2.5. Rölatif mRNA Ekspresyon Deneyleri

Total RNA izolasyonu: BALF örneklerinin total RNA izolasyonları 3.2.1.5 başlığı altında belirtildiği şekilde Quick-RNA Miniprep Kitindeki adımlar izlenerek yapıldı. Elde edilen RNA'ların spektrofotometrede saflıkları ve konsantrasyonları *Thermo Multscan Go* kullanılarak ölçüldü. A230/A260 oranı 1,8-2,1 aralığında olan RNA örnekleri temiz kabul edildi. cDNA sentezi aşamasına kadar RNA'lar -80ºC'de muhafaza edildi.

cDNA Sentezi: BALF örneklerinin cDNA sentezi 3.2.1.5 başlığı altında belirtildiği şekilde Sensi-FAST cDNA sentezi kit protokülüne bağlı olarak gerçekleştrildi..

Gerçek Zamanlı 3.2.1.5 başlığında Sensi-FAST NO-ROX Kit protokolü uygulanan GZ-kPZR deneyi ile TNFα, IL1β , IL6, IFNγ mRNA ekspresyon seviyeleri çalışılmıştır.

Gerçek Zamanli Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-kPZR): GZ-PZR deneyine başlanmasından önce primerlerin erime sıcaklığı belirlenmiştir.

Primerlerin Erime Sıcaklığının Belirlenmesi:

Fare genomuna özgün primerler Primer3 v4.1.0 programı (http://primer3.ut.ee/) kullanılarak tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin erime sıcaklıkları (Tm) gradient PZR yapılarak belirlenmiştir. Liyofilize olarak sentezi yaptırılan primerler (Sentromer DNA Teknolojileri, Türkiye) 100 µM ana stok olacak şekilde distile su (dH2O) ile sulandırıldı, hazırlanan stoklar kullanıma kadar -20°C'de saklandı (Tablo 3-9). Çalışma stoğu forward ve reverse primerlerin dH2O ile 1:10 oranında sulandırılması ile hazırlandı. Primerlerin erime sıcaklığın (Tm) belirlenmesi için her bir primere konvansiyonel PZR işlemi uygulandı. RT-PZR karışımı, 3.2.1.5 başlığındaki aşamalarla gerçekleştrilmiştir. Çalışılan sıcaklıklar 62 °C, 61.4, 60.4 °C, 58.9 °C, 57.1 °C, 55.5 °C, 54.6 °C, 54.0 °C dereceleri arasında uygulanmıştır. Sentez bittikten sonra %2'lik agaroz jel döküldü ve her kuyudaki örnek yükleme tamponu ile beraber yürütüldü. Optimal sıcaklık 61°C olarak belirlenmiştir.

Tablo 3-9: GZ-PZR için kullanılan sitokinlere özgü primer dizileri

GEN ADI	PRİMER DİZİLERİ
IL5	F 5’ TCAGGGGCTAGACATACTGAAG 3’
	R 5’ CCAAGGAACTCTTGCAGGTAAT 3’
IFNγ	F 5’ ATGAACGCTACACACTGCATC 3’
	R 5’ CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC 3’
IL1-β	F 5’ GAAATGCCACCTTTTGACAGTG 3’
	R 5’ TGGATGCTCTCATCAGGACAG 3’
IL6	F 5’ TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC 3’
	F 5’ TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC 3’
TNFα	F 5’ CCTGTAGCCCACGTCGTAG 3’
	F 5’ GGGAGTAGACAAGGTACAACCC 3’

GZ-PZR gerçekleştirilmesi için son reaksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı (Tablo 3-10). Karışım ve cDNA örnekleri 96 kuyulu PZR plağına dağıtıldıktan sonra cihaza yerleştirildi ve üç adımlı GZ-PZR ile fluoresan okuma gerçekleştirildi (Tablo 3-11).

Tablo 3-10: GZ-PZR deneyi için hazırlanan karışımın içeriği

MALZEME	HACİM	SON KONSANTRASYON
2X SensiFAST SYBR No-Rox Mix	10µL	1X
10µM Forward Primer	0,8 µL	400 nM
10µM Reverse Primer	0,8 µL	400 nM
dH_20	6,4 µL	-
cDNA	2 µL	-
Son Hacim	**20µL**	**-**

Tablo 3-11: GZ-PZR deneyi için uygulanan termal protokol

DÖNGÜ	SICAKLIK	SÜRE	İŞLEM
1	95ºC	2 dk	Polimeraz Aktivasyonu
40	95 ºC	5 sn	Denatürasyon
	60-65 ºC	10 sn	Primer Bağlanması
	72 ºC	5-20 sn	Uzama

Primerin bağlandığı floresan artış görülen örneklerden elde edilen grafiklerdeki *cycle of threshold* (Ct) verileri kullanılarak değerlendirildi. mRNA ekspresyon değerlerinin belirlenmesi için yapılan RT-PZR deneylerinde kullanılacak her örnek ikili olarak çalışıldı. Elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. Genlerin artış, azalış oranları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı(Livak ve Schmittgen 2001). İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak belirlenmiştir. İstatiksel analizler GraphPad Prism 9.0 arayüzü ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.6. ELISA testleri

ELISA testleri için *in vivo* hayvan modeli oluşturma ve tedavi uygulama süreçlerinde belirli aralıklarla alınan, -80ºC'de muhafaza edilen serum örnekleri kullanıldı. ELISA deneylerinde seçilen sitokinler olarak IL6, IL1β, TNFα ve ovalbumine özgü IgE (OVA-IgE) ve PGD2 miktarları tayin edildi.

OVA-IgE, **TNFα, IL6 ve PGD2 ELISA Deneyleri:**

Bu ELISA deneyinde seçilen sitokinler olarak IL6 veTNFα miktarları tayin edilmiştir. İlgili protokol;

- Kit içeriğinde olan kalibratör seyreltici çözelti ile standart dilüe edildi ve vorteks yapıldı.

- Sıralanmış 7 tüpün (S2,S3,S4,S5,S6,S7) her birine protokolde belirtilen miktarda kalibratör seyreltici tampon eklendi ve S2 tüpüne standardın konularak seri dilüsyon yapıldı.

- Tüm kuyucuklara 50 µL örnek seyreltici eklenmesinin ardından örnekler ve standartlar 50 µL eklendi. Kontrol kuyucuklarına 50 µL kalibratör seyreltici tamponu ve sonrasında tüm kuyucuklara 50 µL biyotin-konjugat eklendi.

- Plaka kaplama filmi ile örtülerek oda sıcaklığında (18ºC- 25ºC) 2 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi.

- İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklar 400 µL yıkama tamponu ile yıkandı ve plaka emici bir bez veya kağıt bir havluya vurularak kuyucuklardaki fazla tamponun alınması sağlandı.

- Streptavidin-HRP 100X çözeltisinden 10 µL alınarak bir tüpte Streptavidin-HRP seyreltici ile 1mL'ye tamamlanarak her bir kuyucuğa 100 µL streptavidin-HRP eklendi.

- Plaka kaplama filmi ile örtülerek 1 saat boyunca çalkayıcıda inkübe edildi.

- İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucukların yıkanması ve fazla tamponun alınma işlemi tekrar edildi

- Tüm kuyucuklara 100 µL TMB solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika inkübe edildi.

- İnkübasyon süresi boyunca plakta oluşan renk değişimi gözlendi ve en yüksek konsantrasyonda olan standart koyu bir mavi renk aldığında, tüm kuyucuklara durdurma solüsyonu konuldu.

- Plakaların absorbansı 1 saat içerisinde mikroplaka okuyucuda 450 nm ölçüldü. Standart örneklere göre grafik eğrisi oluşturularak, her bir örnekteki OVA-IgE, TNFα, IL6 ve PGD2 miktarları hesaplanmıştır.

.

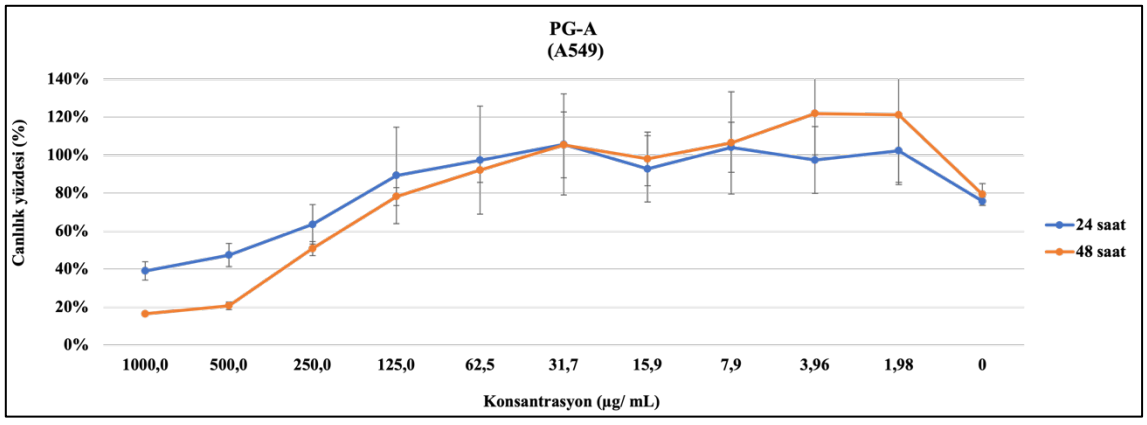
4. BULGULAR

4.1. *In vitro* deneyler

4.1.1. Hücre Canlılık Deneyi Sonuçları

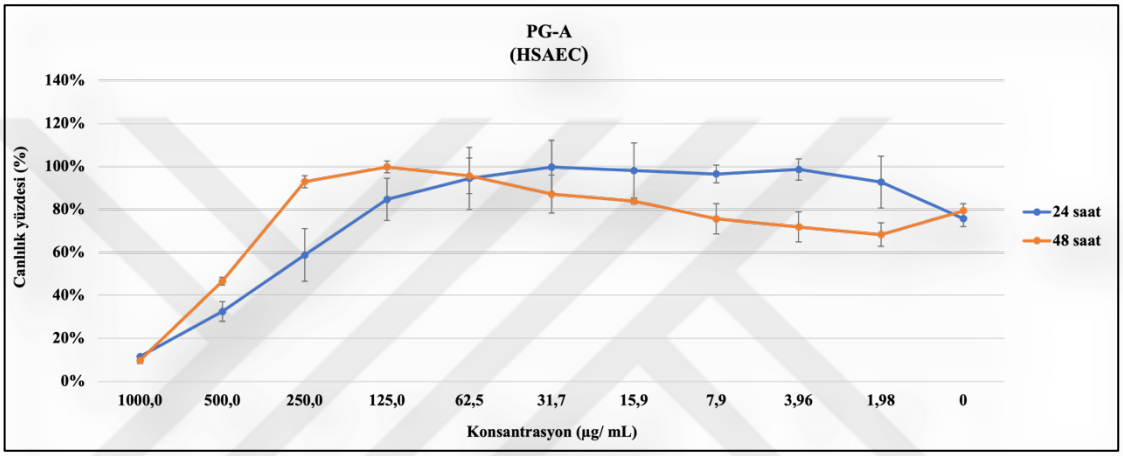
A549 hücre serisinde PG-A ve AJ maddelerinin A549 ile HSAEC hücre hatlarında 24 saat ve 48 saat maruziyetleri sonucunda elde edilen canlılık verileri grafiklerle gösterilmiştir. PG-A maddesinin A549 hücre serisi üzerinde yapılan MTT deneyi yorumlandığında; 48 saat diliminde 1000 µg/mL PG-A, %16 ile en düşük canlılık yüzdesine sahiptir.

1000 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda canlılık yüzdesi, 24 saatten 48 saate geçiştesırasıyla %39-%16 ve %47-%21 olarak yarı yarıya düşüş sergilemiştir. Kontrol grubu hücrelerinin canlılık yüzdesi 24 saatte %76, 48 saatte %79 canlılık yüzdesi elde edimiştir. Her iki zaman diliminin kontrol grubunun canlılık yüzdeleri %76-%79 ile , 125 µg/mL PG-A konsantrasyonun canlılık yüzdeleri %89- %78 olarak çok yakın değerler elde edilmiştir. Canlılık yüzdeleri bu konsantrasyondan noktasının ardından kontrol grubunun yüzdesinden daha yüksek değerlere çıkmıştır. En yüksek canlılık yüzdesi 48 saat zaman diliminin 3,96 ve 1,98 µg/mL konsantrasyonundaki %122 ve %121 maruziyet değerleri olmuştur. Her iki zaman diliminde konsantrasyon düşüşü ile 3,96 ve 1,98 haricinde benzer bir canlılık yüzde eğrisi sergilenmiştir (Şekil 4-1).



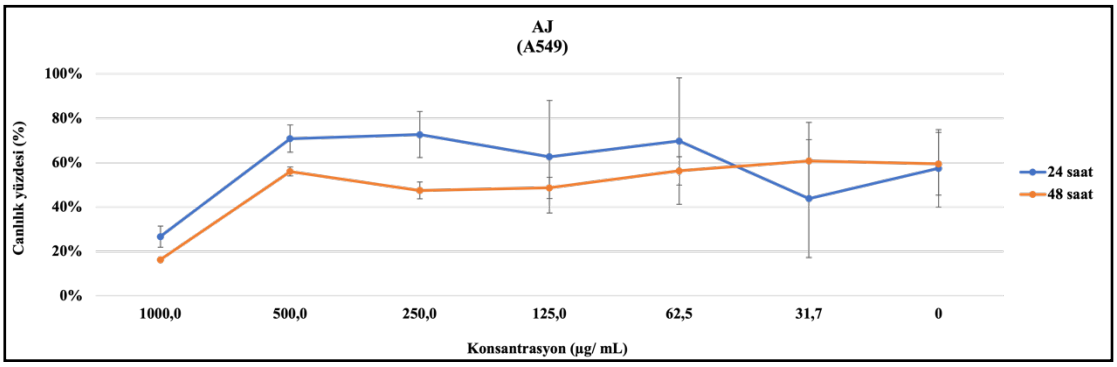
Şekil 4.1: A549 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan PG-A maruziyetinin iki farklı zaman diliminde (24 ve 48 saat) canlılık yüzdelerindeki değişim.

HSAEC hücre serisinde her iki zaman diliminde 1000 µg/mL PG-A maruziyeti sonucunda %10 canlılık yüzdesi elde edilmiştir. 24 saatlik maruziyet sonucunda konsantrasyon düşüşüne karşılık olarak canlılık yüzdelerinde artış görülmüş olup 62,5 µg/mL den sonrasında kontrol grubununun değerini geçmiştir. Her iki zaman diliminde de 125 µg/mL konsantrasyonuna kadar canlılık yüzdesi paralel olarak artmıştır. 48 saat zaman diliminde 62,5 µg/mL konsantrasyonundan sonra canlılık değerlerinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 4-2).



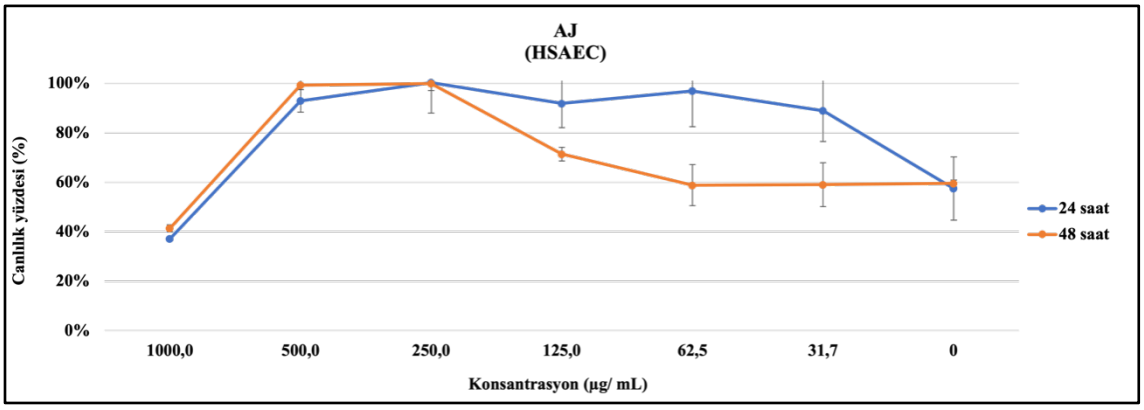
Şekil 4-2: HSAEC hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan PG-A maruziyetinin iki farklı zaman diliminde (24 ve 48 saat) canlılık yüzdelerindeki değişim.

A549 hücre serisinde her iki zaman diliminde 1000 µg/mL AJ maruziyeti sonucunda birbirine yakın canlılık yüzdeleri elde edilmiştir. İki zaman diliminde de birbirine pozitif korele canlılık eğrisi elde edilmiştir. 24 saatlik zaman diliminde 1000 µg/mL konsantrasyonundan ardından konsantrasyon azaldıkça canlılık yüzdesi artarak kontrol grubunu geçmiştir. Sadece 31,7 µg/mL konsantrasyonu %30 canlılık yüzdesi ile kontrol grubunun canlılık yüzdesinin altında kalmıştır. 48 saatlik zaman diliminde canlılık yüzdeleri 1000 µg/mL konsantrasyonun ardından artmış olup %40-60 aralığında seyretmiştir. 31,7 µg/mL konsantrasyon canlılık seviyesi kontrol grubu ile eşitlenmiştir (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: A549 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan AJ maruziyetinin iki farklı zaman diliminde (24 ve 48 saat) canlılık yüzdelerindeki değişim.

İki zaman diliminde AJ maruziyeti sonucunda en düşük canlılık yüzdesi 1000 µg/mL konsantrasyonunda %37 ve %41 olarak elde edilmiştir. 24 saatlik veriler değerlendirildiğinde; AJ'nin 500 µg/mL'den itibaren azalan konsantrasyona karşılık canlılık verileri kontrol grubunun canlılık yüzdesinin üzerinde olduğu gözlemlenmiştir. 48 saat diliminde hücrelerin sırasıyla %41, %99, %100, %71, %59, %59, %60 olarak, kontrol grubunun ise %60 yakın canlılık yüzdesine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: HSAEC hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan AJ maruziyetinin iki farklı zaman diliminde (24 ve 48 saat) canlılık yüzdelerindeki değişim

Çalışmamızın amacı PG-A'nın hava yolu inflamasyonuna etkisi üzerine dayandığından ilerleyen deneyler için IC_{50} hesaplanması HSAEC hücreleriyle elde edilen sonuçlar üzerinden gerçekleştirildi. PG-A ve AJ ile HSAEC hücresinde gerçekleştirilen hücre canlılık tayini deneyi sonucunda elde edilen IC_{50} değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4-2: Elde edilen IC_{50} Değerleri

	IC_{50} (µg/mL)	
Maddeler	**24h**	**48h**
PG-A	1033	121
AJ	312	500

4.1.2. GZ-PZR Deney Sonuçları

GZ-PZR deneyinde çalışılacak gruplar Tablo 4-2' de açıklanmıştır.AJ ve PG-A maddelerinin *in vitro* inflamasyon modeli üzerindeki etkilerini araştırmak adına inflamasyonda rol oynadığı belirlenmiş genler seçilmiştir. Her örnek için floresan sinyalinin eşiği geçmesi için gereken döngü saysını ifade eden (cycle threshold) Ct değeri hesaplanmıştır. Referans gen olarak ACTB geni seçilmiş olup diğer genlerin ekspresyon değerleri ACTB'ya göre normalize edilmiştir.

Tablo 4-2: GZ-PZR deneyinde çalışılan gruplar

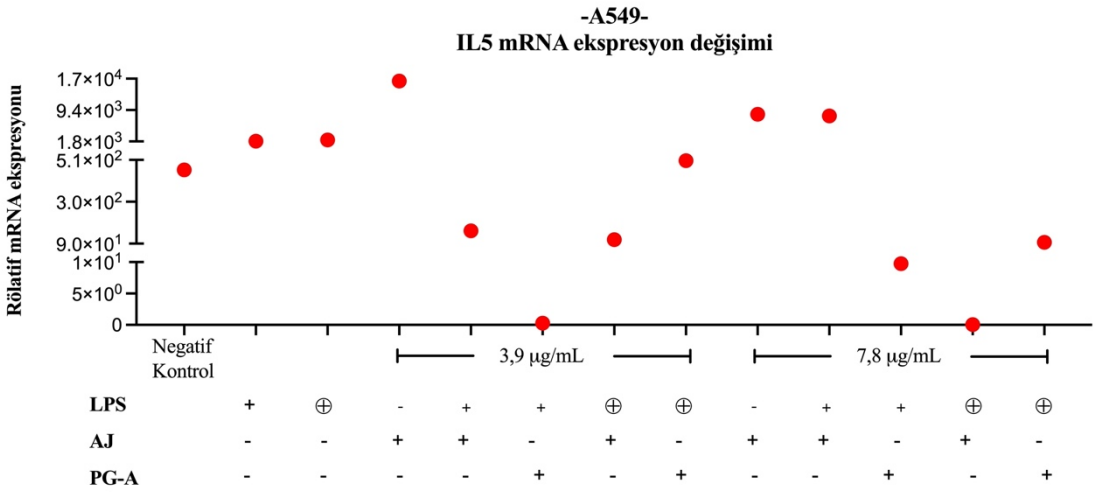
Gruplar	**Hücrelere uygulanan işlemler**
Negatif Kontrol	Hiç bir işlem uygulanmadan kültüre edilen hücreler
PG-A 3,9µg/mL	3,9µg/mL konsantrasyonunda PG-A maruziyeti uygulanan hücreler
PG-A 7,8 µg/mL	7,8 µg/mL konsantrasyonunda PG-A maruziyeti uygulanan hücreler
AJ 3,9µg/mL	3,9µg/mL konsantrasyonunda AJ maruziyeti uygulanan hücreler
AJ 7,8 µg/mL	7,8 µg/mL konsantrasyonunda AJ maruziyeti uygulanan hücreler
LPS1	Sadece 1 µg/mL konsantrasyonunda LPS indüksiyonu yapılan hücreler
LPS10	Sadece 10 µg/mL konsantrasyonunda LPS indüksiyonu yapılan hücreler

LPS 1+AJ 3,9	3,9 µg/mL konsantrasyonda AJ +1 µg/mL LPS uygulanan hücreler
LPS 10+AJ 3,9	3,9 µg/mL konsantrasyonda AJ +10 µg/mL LPS uygulanan hücreler
LPS 1+AJ 7,8	7,8 µg/mL konsantrasyonda AJ + 1 µg/mL LPS uygulanan hücreler
LPS 10+AJ 7,8	7,8 µg/mL konsantrasyonda AJ + 10 µg/mL LPS uygulanan hücreler
LPS 1+PG-A 3,9	3,9 µg/mL konsantrasyonda PG-A+1 µg/mL LPS uygulanan hücreler
LPS 10+PG-A 3,9	3,9 µg/mL konsantrasyonda PG-A+10 µg/mL LPS uygulanan hücreler
LPS 1+PG-A 7,8	7,8 µg/mL konsantrasyonda PG-A + 1 µg/mL LPS uygulanan hücreler
LPS 10+PG-A 7,8	7,8 µg/mL konsantrasyonda PG-A + 10 µg/mL LPS uygulanan hücreler

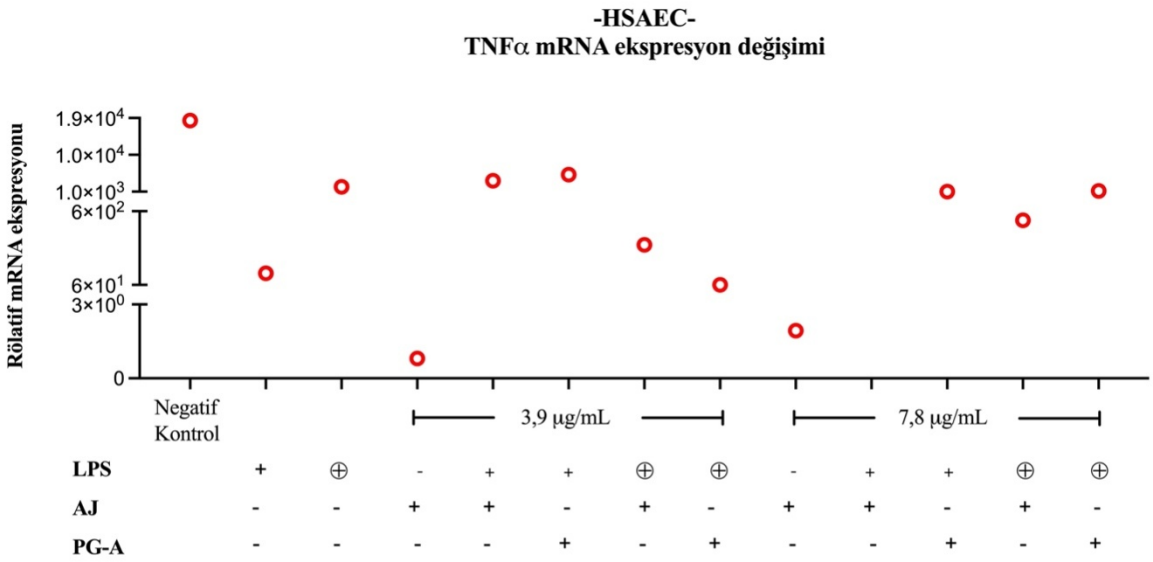
A549 hücre serisinde negatif kontrol grubunun TNFα mRNA ekspresyon seviyesi,iki konsantrasyonda (1 ve 10 µg/mL) sadece LPS maruziyeti olan gruplar ile birbirlerine yakın ekspresyon değerlerine sahiptir. Sadece AJ (3,9 µg/mL) uygulaması ile ekspresyon seviyesi artış göstermiştir. 1 µg/mL LPS ve PG-A uygulamasında, 1 µg/mL LPS ve AJ uygulamasına kıyasla TNFα ekspresyonu düşüş göstermiştir. 10 µg/mL LPS +AJ ile 1 µg/mL LPS+PG-A eskpresyon seviyeleri arasında bir fark olmadığı görülmüştür. PG-A (7,8 µg/mL) ve LPS uygulanan gruplarda LPS konsantrasyonun artışı eskpresyon seviyesinde düşüş elde edilmiştir. LPS (1 µg/mL) +AJ (7,8 µg/mL) uygulaması sonucu elde edilen TNFα ekspresyon seviyesinde, LPS konsantrasyon seviyesi değişmeksizin AJ yerine PG-A uygulandığında düşüş olduğu gözlenmiştir. İki konsantrasyonda da sadece LPS uygulanan grupların ekspresyon seviyesi, LPS varlığında PG-A uygulanan gruplara kıyasla oldukça yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 4-5).

HSAEC hücre serisinde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; iki konsantrasyonda LPS uygulamalarında elde edilen ekspresyon seviyeleri, negatif kontrole göre daha düşük bir seviyede elde edilmiştir. Sadece LPS uygulanan gruplar arasında konsantrasyon artışına bağlı TNFα ekspresyon seviyesinde düşüş görülmüştür. LPS (1 µg/mL) + AJ (3,9 µg/mL) uygulaması ile LPS (1 µg/mL) + PG-A (3,9 µg/mL)

uygulama arasında ekspresyon seviyelerinde fark bulunmamıştır. LPS (1 µg/mL) +PG-A (3,9 µg/mL) uygulaması, LPS (1 µg/mL)+AJ (3,9 µg/mL) uygulamasına kıyasla daha düşük bir ekspresyon seviyesine sahiptir. Buna rağmen LPS (10 µg/mL)+PG-A (7,8 µg/mL) uygulaması, LPS (10µg/mL) +AJ (7,8 µg/mL) uygulamasına kıyasla yüksek bir eskpresyon seviyesi göstermiştir. (Şekil 4-6)



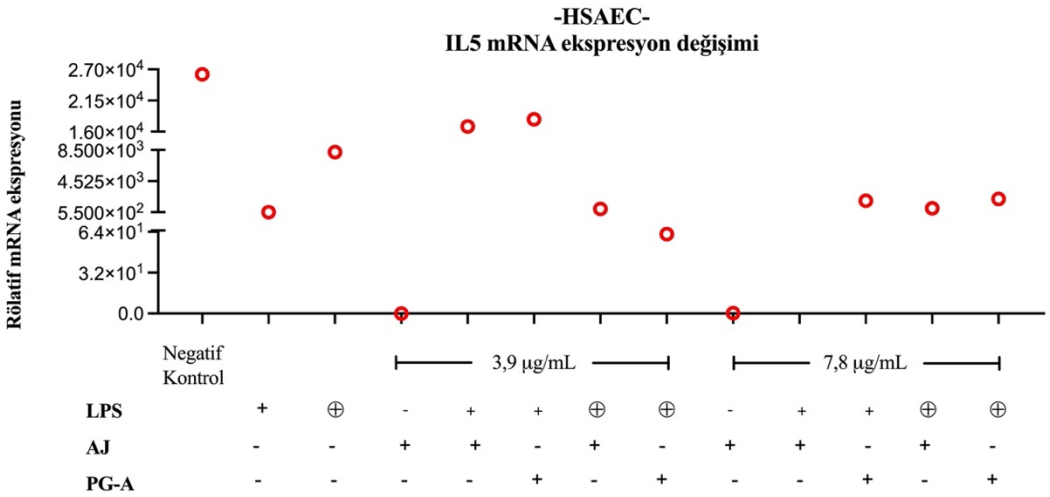
Şekil 4-5: A549 hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda TNFα mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri. LPS; ⊕: 10µg/mL, +: 1 µg/mL



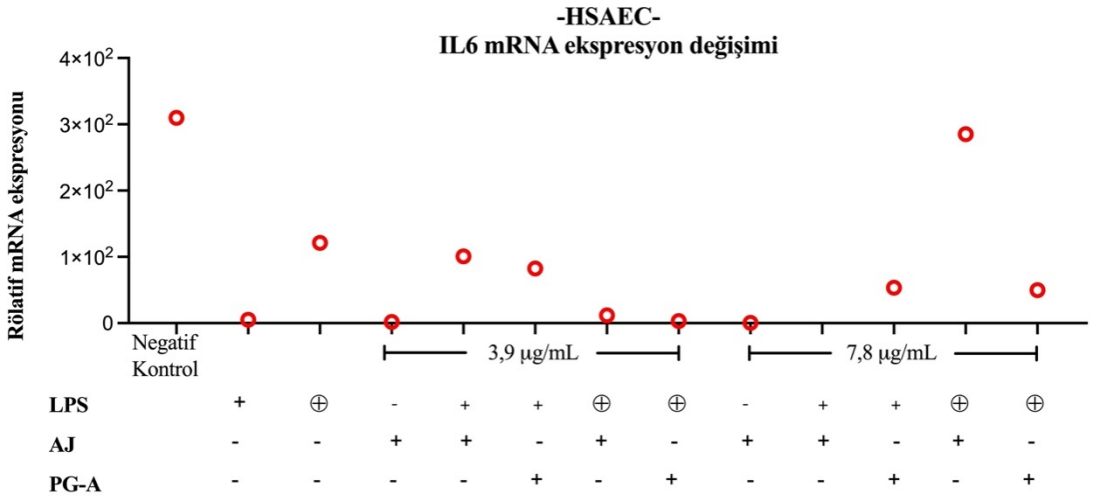
Şekil 4-6: HSAEC hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda TNFα mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri. LPS; ⊕: 10µg/mL, +: 1 µg/mL

Her iki hücre serisinde gerçekleştirilen uygulamalar sonunda elde edilen IL5 mRNA ekspresyon seviyeleri incelendiğinde; A549 hücre serisinde her iki konsantrasyonda sadece LPS (1, 10 µg/mL) uygulanan gruplarda, negatif kontrole göre daha yüksek fakat yakın ekspresyon seviyesileri elde edilmiştir. LPS (1 µg/mL)+PG-A (3,9 µg/mL) uygulaması sonucundan IL5 mRNA ekspresyonu görülmezken; LPS (10 µg/mL)+PG-A (3,9 µg/mL) uygulaması sonucunda ekspresyon elde edilmiştir. LPS (1 µg/mL)+PG-A (7,8 µg/mL) grubu ile LPS (10 µg/mL)+PG-A (3,9 µg/mL) arasında LPS konsanstrasyonuna korele ekspresyon seviyesinde artış görülmüştür. LPS (10 µg/mL)+AJ (7,8 µg/mL) uygulaması sonucunda ekspresyon bulunmazken; LPS (10 µg/mL)+PG-A (3,9 µg/mL) grubunda negatif kontrole kıyasla daha düşük olan bir ekspresyon seviyesi elde edilmiştir (Şekil 4-7).

HSAEC hücre serisinde her iki konsantrasyonda sadece LPS (1 ve 10 µg/mL) uygulanan gruplarda, negatif kontrole göre daha düşük IL5 ekspresyon seviyesi elde edilmiştir. Her iki konsantrasyonda (3,9 µg/mL, 7,8 µg/mL) sadece AJ uygulanan gruplarda IL5 ekspresyonu görülmemiştir. LPS(10 µg/mL) + AJ (3,9 µg/mL) uygulanan grubunun ekspresyon seviyesinin LPS(10 µg/mL) +PG-A (3,9 µg/mL) uygulaması yapılan gruba göre yüksek olduğu gözlenmiştir. LPS(10 µg/mL) +PG-A (7,8 µg/mL) grubu ile LPS (10 µg/mL) +AJ (7,8 µg/mL) grubu arasında ekspresyon farkı elde edilmemiştir (Şekil 4-8).

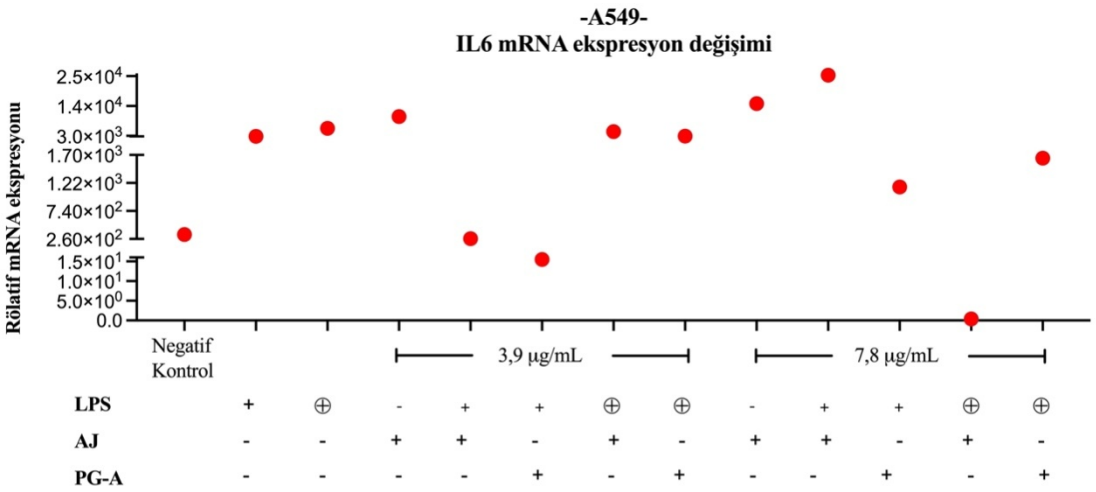


Şekil 4-7: A549 hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda IL5 mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri. LPS; ⊕: 10µg/mL, +: 1 µg/mL



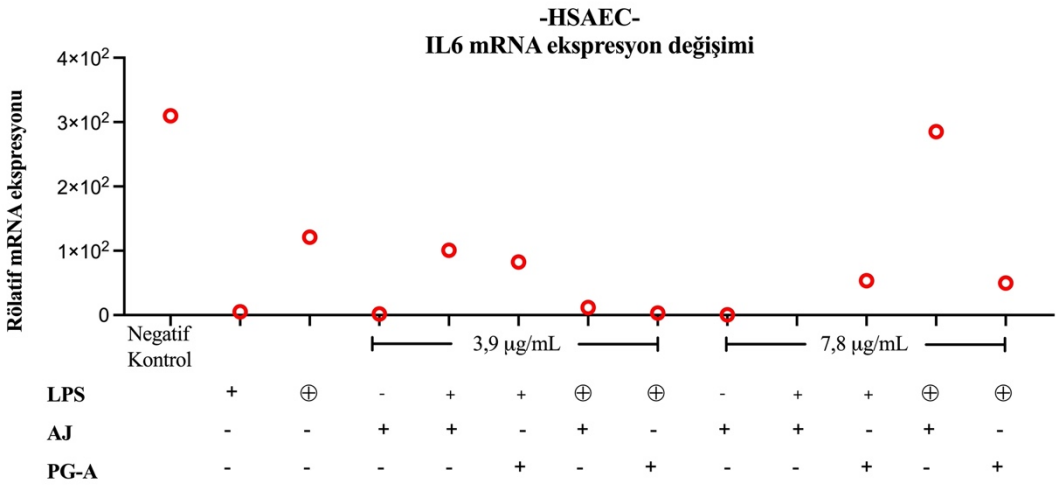
Şekil 4-8: HSAEC hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda IL5 mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri. LPS; ⊕: 10µg/mL, +: 1 µg/mL

IL6 mRNA ekspresyon seviyeleri incelendiğinde; A549 hücre serisinde her iki konsantrasyonda sadece LPS (1 ve 10 µg/mL) uygulanan gruplarda, negatif kontrole göre yüksek IL6 ekspresyon seviyesi elde edilmiştir. LPS(1 µg/mL) + AJ (3,9 µg/mL) uygulanan grubunun ekspresyon seviyesinin LPS(1 µg/mL) +PG-A (3,9 µg/mL) uygulaması yapılan gruba göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Benzer bir şekilde AJ ve PG-A (3,9 µg/mL) konsantrasyonları değişmeksizin LPS (10 µg/mL) ile uygulama yapılan gruplar arasında ekspresyon seviyeleri arasında fark bulunmamıştır. LPS (1 µg/mL) + PG-A (7,8 µg/mL) uygulanan grupta LPS(1 µg/mL) + AJ (7,8 µg/mL) grubuna kıyasla daha düşük bir ekspresyon seviyesi elde edilmiştir. Buna rağmen, LPS(10 µg/mL) + PG-A (7,8 µg/mL) uygulanan grubu LPS(10 µg/mL) + AJ (7,8 µg/mL) grubuna ve negatif kontrole kıyasla daha yüksek bir ekspresyon seviyesine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4-9).



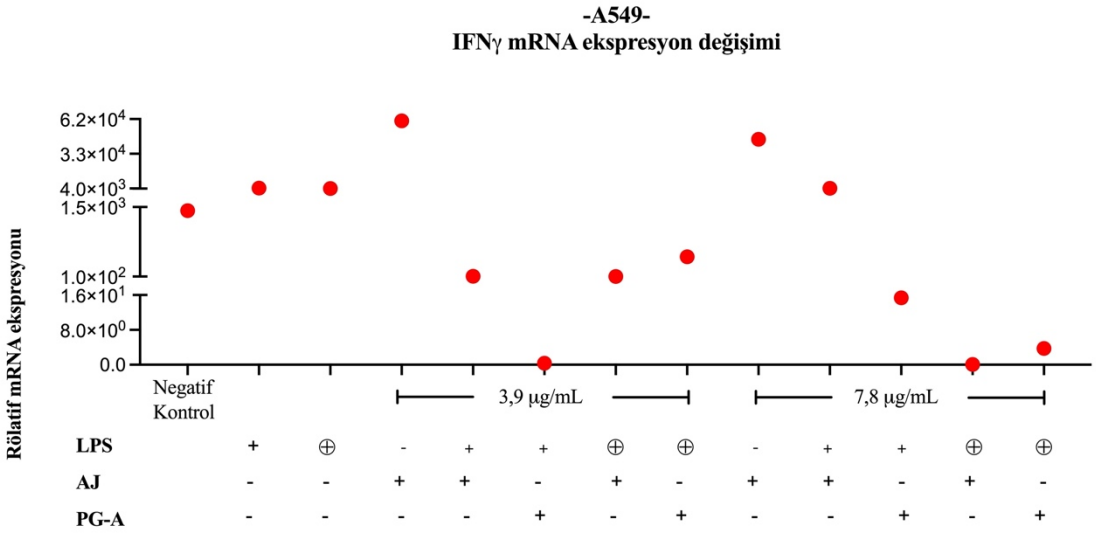
Şekil 4-9: A549 hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda IL6 mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri. LPS; ⊕: 10µg/mL, +: 1 µg/mL

HSAEC hücre serisinde sonuçları değerlendirildiğinde; uygulamaların yapıldığı tüm gruplarda elde edilen IL6 ekspresyon seviyelerinin, negatif kontrole kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. Sadece LPS(1 ve 10 µg/mL) uygulanan gruplar arasında konsantrasyon artışına pozitif korele olarak ekspresyon seviyesi artışı elde edilmiştir. LPS(1 µg/mL) + PG-A (3,9 µg/mL) uygulanan grubu LPS(1 µg/mL) + AJ (3,9 µg/mL) grubuna kıyasla daha düşük bir ekspresyon seviyesi elde edilmiştir. Benzer olarak; LPS(10 µg/mL) + PG-A (7,8 µg/mL) uygulanan grup, LPS(10 µg/mL) + AJ (7,8 µg/mL) grubuna kıyasla daha düşük bir ekspresyon seviyesi elde edilmiştir(Şekil 4-10).



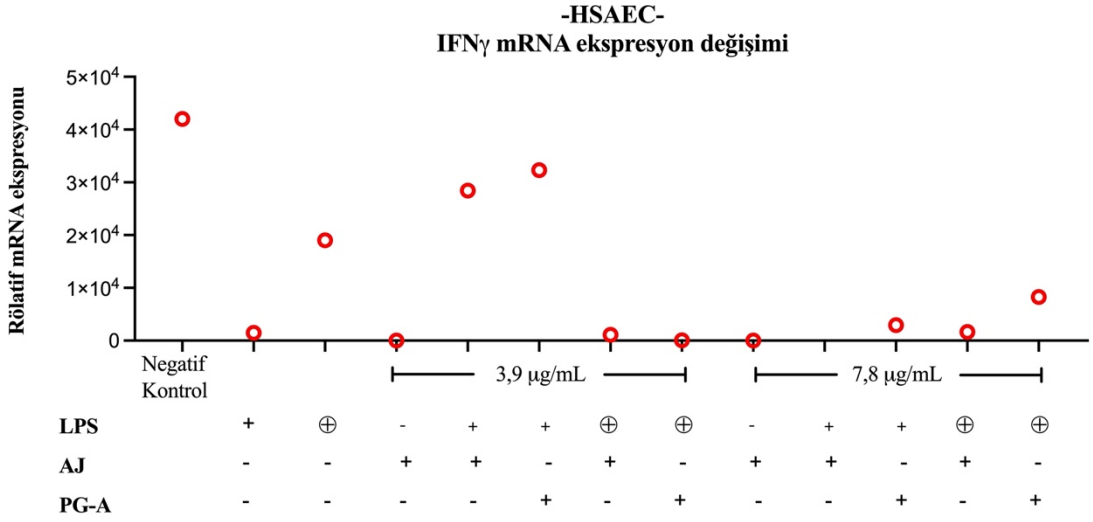
Şekil 4-10: HSAEC hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda IL6 mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri. LPS; ⊕: 10µg/mL, +: 1 µg/mL

Elde edilen IFN-**γ** mRNA ekspresyon seviyelerine değerlendirildiğinde; A549 hücre serisinde sadece LPS(1 ve 10 µg/mL) uygulanan gruplar arasında konsantrasyon artışına korele bir fark elde edilmemiş olup yakın ekspresyon seviyeleri elde edilmiştir. LPS(1 µg/mL) + PG-A (3,9 µg/mL) uygulanan grubun, LPS(1 µg/mL) + AJ (3,9 µg/mL) grubuna göre düşük bir ekspresyon seviyesine sahip olduğu gözlenmiştir. LPS(10 µg/mL) + PG-A (3,9 µg/mL) uygulanan grubun eskpresyon seviyesinin, LPS(10 µg/mL) + AJ (3,9 µg/mL) grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, LPS (1 µg/mL) + AJ (7,8 µg/mL) grubunda , LPS(1 µg/mL) + PG-A (7,8 µg/mL) grubuna kıyasla daha yüksek bir ekspresyon seviyesi elde edilmiştir (Şekil 4-11).



Şekil 4-11: A549 hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda IFN*γ* mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri. LPS; ⊕: 10µg/mL, +: 1 µg/mL

HSAEC serisinde elde edilen sonuçlar incelendiğinde; uygulamaların yapıldığı tüm gruplarda elde edilen IFN**γ** ekspresyon seviyelerinin, negatif kontrole kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. Sadece LPS(1 ve 10 µg/mL) uygulanan gruplar arasında konsantrasyon artışına koreleekspresyon seviyelerinde artış elde edilmiştir. LPS(1 µg/mL) + PG-A (3,9 µg/mL) grubu, LPS(1 µg/mL) + AJ (3,9 µg/mL) grubuna göre yüksek IFN**γ** seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde, LPS (10 µg/mL) + PG-A (7,8 µg/mL) grubu , LPS(10 µg/mL) + AJ (7,8 µg/mL) grubuna kıyasla daha yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4-12).



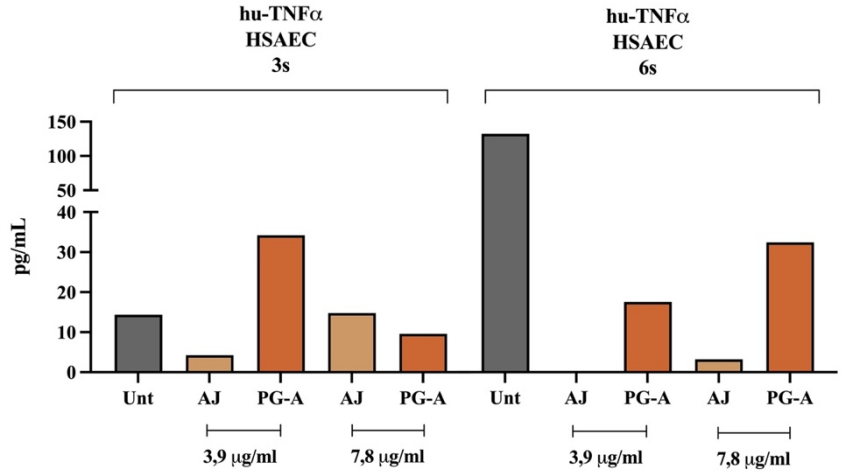
Şekil 4-12: HSAEC hücre serisinde PG-A, AJ ve LPS uygulamaları yapılan/yapılmayan gruplarda IFNγ mRNA ekspresyon seviyesi grafikleri. LPS; ⊕: 10µg/mL, +: 1 µg/mL

TNFα ve IFNγ ELISA Deney Sonuçları:

Gerçekleştirilen ko-kültür deneyinde çalışılan hücre kültürü gruplarından elde edilen süpernatant örnekleri ile insan TNFα ve IFNγ ELISA deneyleri gerçekleştirilmiştir. HSAEC, A549 hücre serileri ve üç saatlik LPS maruziyeti uygulanmış THP-1 hücre serisi ve altı saatlik LPS maruziyeti uygulanmış THP-1 hücre serisi ile direkt ko-kültür deneyi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirilirken ifade edilen maruziyet süresi, THP-1 hücre serisine maruziyet uygulanan LPS süresini ifade etmektedir.

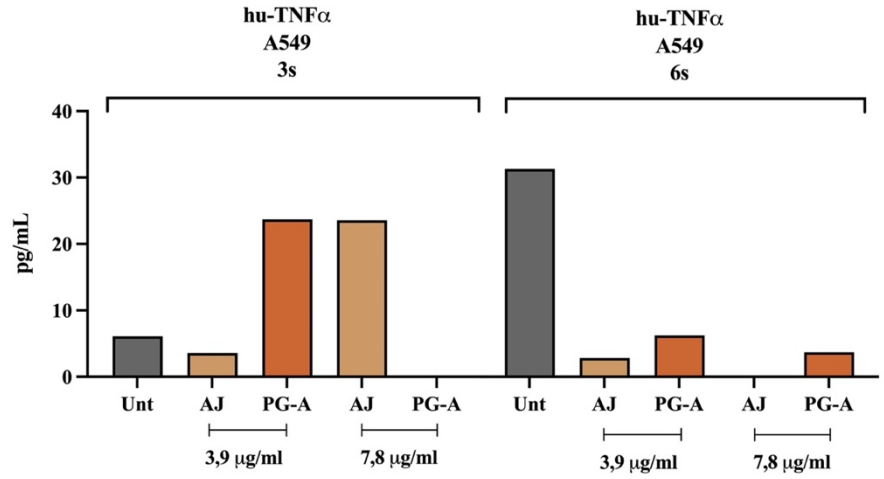
TNFα ELISA Sonuçları:

HSAEC hücre serisinde hiçbir maruziyet uygulanmamış untreated (unt) grubunda TNFα seviyesi maruziyet süresinin uzamasına bağlı olarak artmıştır. Üç saatlik maruziyet uygulanan gruplarda AJ'nin konsantrasyon artışına pozitif korele TNFα miktarı artmıştır. Fakat üç saatlik maruziyet uygulanan gruplarda PG-A'nın konsantrasyon artışına negatif korele olarak TNFα miktarı azalmıştır. Yine 3,9 µg/mL PG-A'nın TNFα seviyesi maruziyet süresinin artışına negatif korele olarak azalmıştır. Aksine 7,8 µg/mL PG-A'nın TNFα seviyesi maruziyet süresinin uzamasına pozitif korele olarak artmıştır (Şekil 4-13).



Şekil 4-13:Ko-kültürü yapılan HSAEC ve 3 saat ve 6 saat LPS maruziyeti gerçekleştirilen THP-1 hücrelerine, AJ ve PG-A uygulamaları sonucunda elde edilen hu-TNFα ELISA sonuçları.

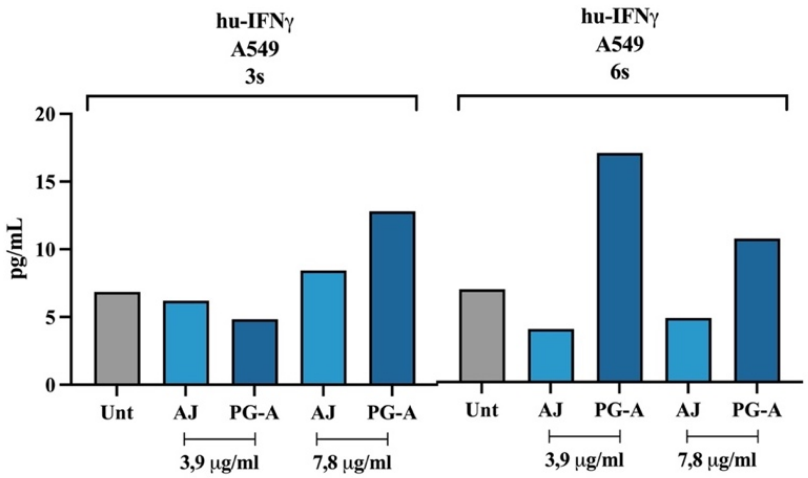
A549 hücrelerinde TNFα sonuçları değerlendirildiğinde; üç saatlik maruziyet süresinde unt grubunun TNFα seviyesi, maruziyet süresinin uzamasına pozitif korele olarak artmıştır. Üç saatlik maruziyet uygulanan 3,9 µg/mL PG-A'nın TNFα seviyesi maruziyet süresinin uzamasına karşılık olarak azalmıştır. Yine üç saatlik maruziyet uygulan 7,8 µg/mL PG-A'nın maruziyet süresi uzamasına cevap olarak TNFα seviyesi artmıştır. 7,8 µg/mL AJ'nin TNFα seviyesi maruziyet süresinin uzamasıyla azalmıştır (Şekil 4-14).



Şekil 4-14:Ko-kültürü yapılan A549 ve 3 saat ve 6 saat LPS maruziyeti gerçekleştirilen THP-1 hücrelerine, AJ ve PG-A uygulamaları sonucunda elde edilen hu-TNFα ELISA sonuçları.

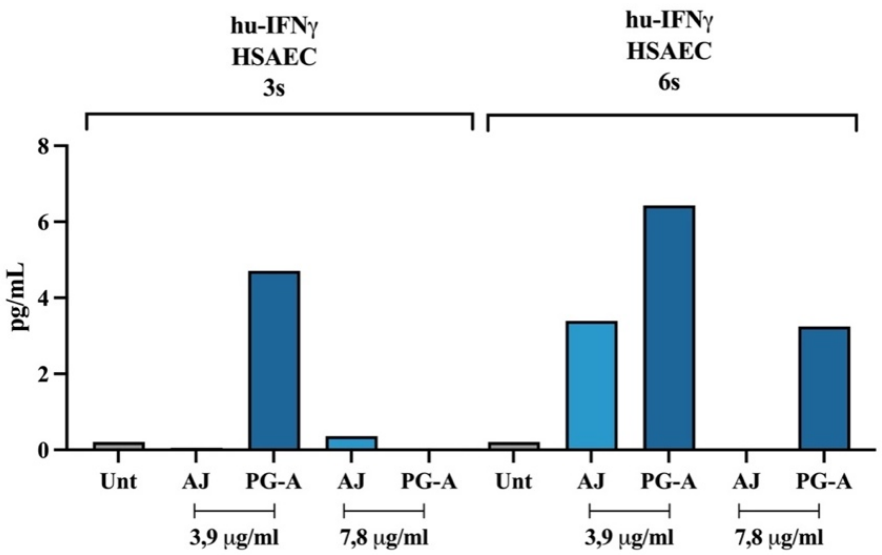
IFNγ ELISA Sonuçları:

A549 hücre serisinde üç saatlik maruziyet uygulanan unt grubunun IFNγ seviyesi maruziyet süresinin artışından bağımsız olarak değişmemiştir. Üç saatlik maruziyet uygulanan 3,9 µg/mL ve 7,8 µg/mL AJ'nin IFNγ seviyesi maruziyet süresinin uzamasına negatif korele olarak azalmıştır. 3,9 µg/mL PG-A üç saatlik maruziyet sonucunda elde ediln IFNγ seviyesi maruziyet süresi uzamasına cevap olarak artmıştır. Üç saatlik maruziyet uygulanan 3,9 µg/mL PG-A konsantrasyon artışına pozitif korele olarak IFNγ seviyesi artmıştır. Buna rağmen, üç saatlik maruziyet uygulanan 7,8 µg/mL PG-A'nın IFNγ seviyesi maruziyet süresinin uzamasına negatif korele olarak azalmıştır (Şekil 4-15).



Şekil 4-15:Ko-kültürü yapılan A549 ve 3 saat ve 6 saat LPS maruziyeti gerçekleştirilen THP-1 hücrelerine, AJ ve PG-A uygulamaları sonucunda elde edilen hu-IFNγ ELISA sonuçları.

HSAEC hücrelerinde üç saatlik maruziyet uygulanan unt grubunun IFNγ seviyesi maruziyet süresi uzamasından bağımsız olarak değişmemiştir. Yine üç saatlik maruziyet uygulanan 3,9 µg/mL PG-A maruziyet süresinin uzamasına cevap olarak IFNγ seviyesi artmıştır. 7,8 µg/mL PG-A üç saatlik maruziyet sonucunda IFNγ cevabı elde edilmemiştir. Buna karşın altı saatlik maruziyet uygulanan 7,8 µg/mL PG-A IFNγ cevabı elde edilmiştir. Üç saatlik maruziyet uygulanan 3,9 µg/mL AJ'nin IFNγ seviyesinde maruziyet süresinin uzaması ile artma gözlemlenmiştir. Aksine 7,8 µg/mL AJ'de üç saatlik maruziyet sonucunda elde edilen IFNγ seviyesi maruziyet süresinin uzaması ile azalmıştır (Şekil 4-16).



Şekil 4-16:Ko-kültürü yapılan HSAEC ve 3 saat ve 6 saat LPS maruziyeti gerçekleştirilen THP-1 hücrelerine, AJ ve PG-A uygulamaları sonucunda elde edilen hu-IFNγELISA sonuçları.

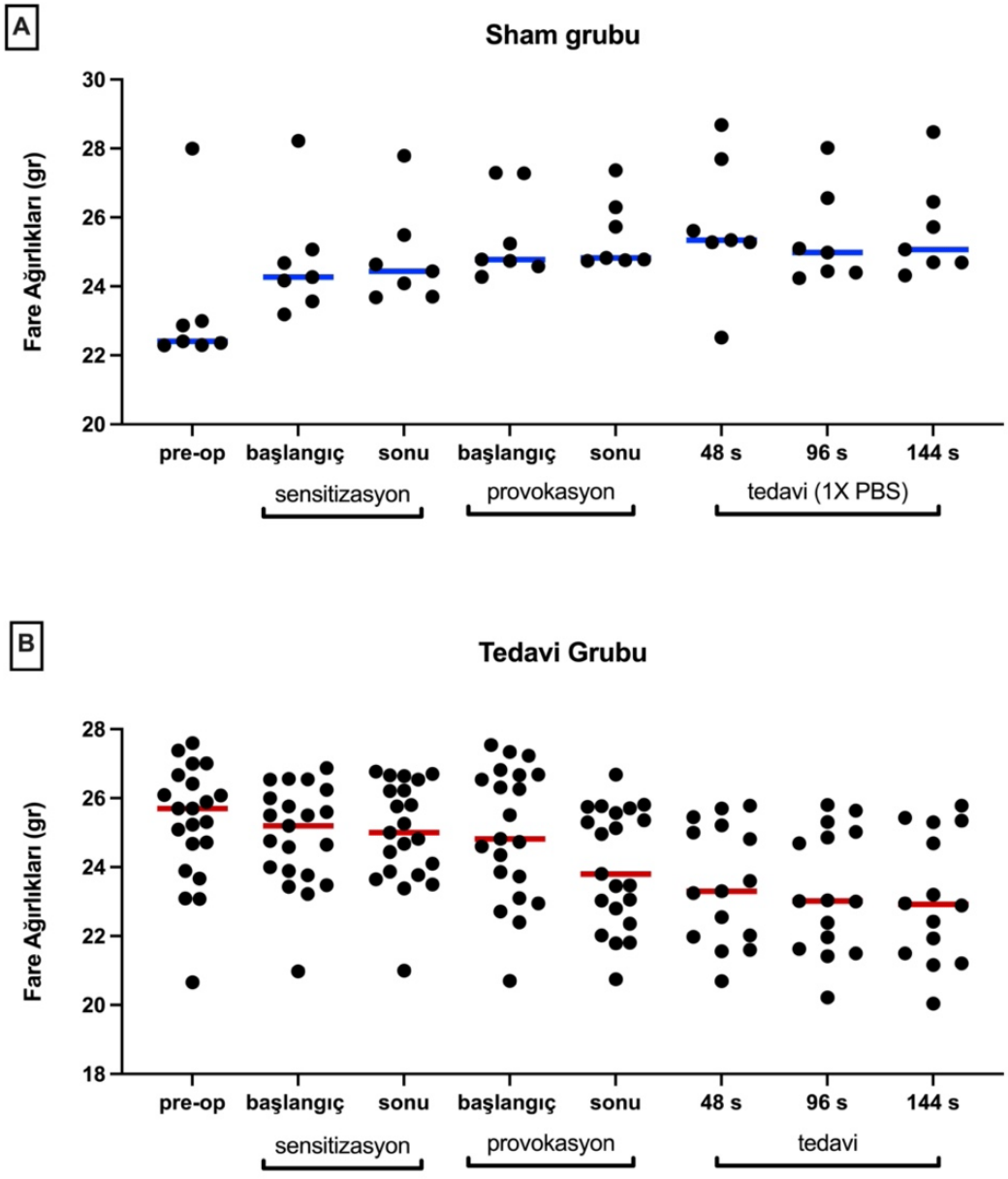
4.2. *In vivo* Deney Sonuçları

4.2.1. Hayvanların Ağırlıkları ve Yem Tüketim Miktarları

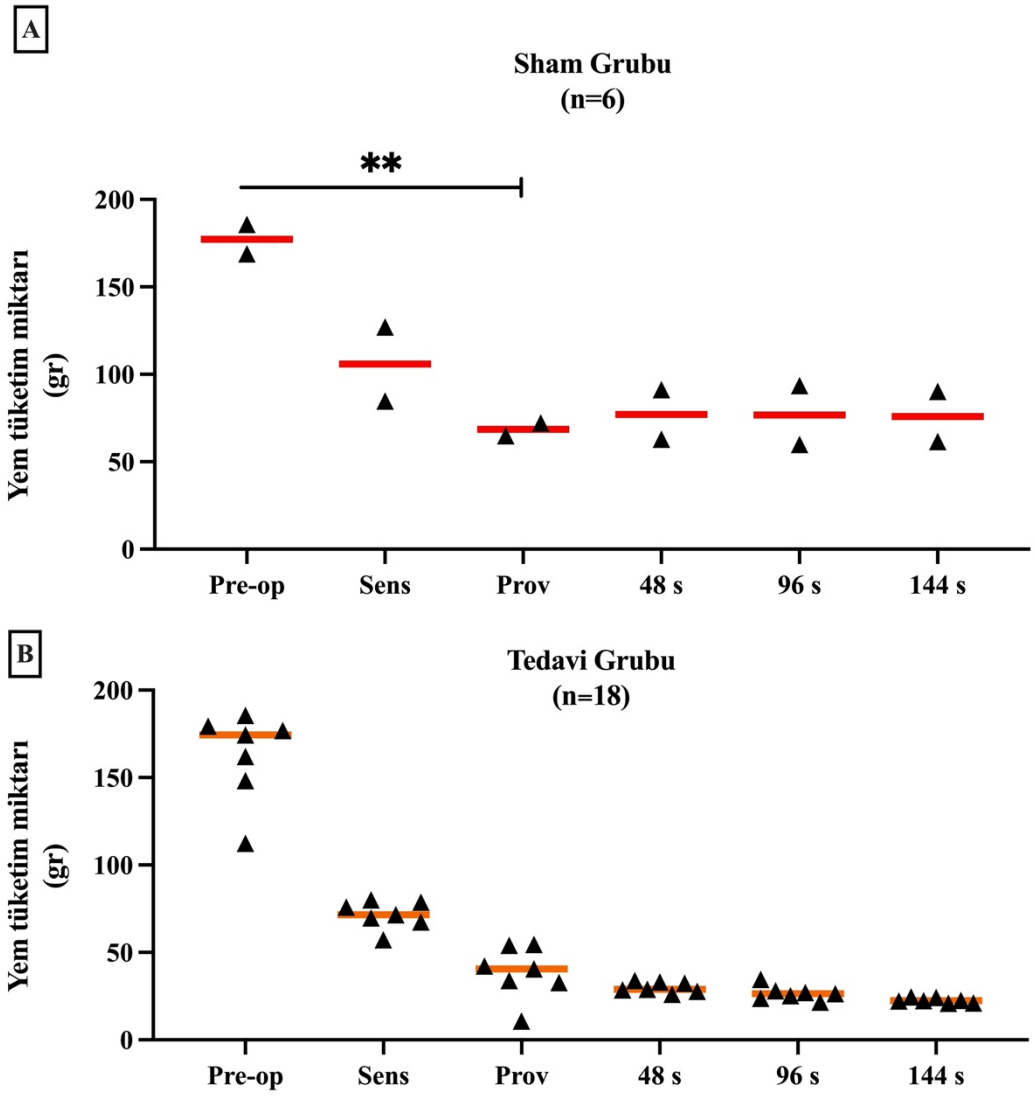
Farelerin 21 günlük model oluşturma ve tedaviyi kapsayan toplamda 27 gün süren deney akışı tamamlanmıştır. Bu süreç boyunca hayvanların ağırlıkları ve yem tüketim miktarları takip edilmiştir. Bu süreç boyunca hayvanların ağırlıkları ve yem tüketim miktarları uygulama öncesinde (pre-op), sensitizasyon (sens), provokasyon (prov) ve tedavi aşama zamanlarında ölçülmüştür.

Sham grubuna ilişkin elde edilen hayvan ağırlıkları uygulama süreçlerinde pre-op'a göre artış göstermiş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p< 0,001$) (Şekil 4-17A). PG-A ile uygulanan tedavi sürecinin gerçekleştirildiği gruptaki hayvanların ağırlıklarındaki değişim, pre-op'a göre sensitizasyon (sens) ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamış fakat provokasyon (prov) aşamasına göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı gözlenmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 4-17B). Yem tüketim miktarlarına bakıldığında ise, sham grubunda pre-op ve provokasyon aşamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı azalma elde edilmiştir ($p=0,007$) (Şekil 4-18A).Tedavi grubunda ise, pre-op aşaması tüm

uygulamalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azaldığı görülmüştür ($p<0,0001$) (Şekil 4-18B). Ayrıca sens grubu ile tüm tedavi grupları arasıdan istatistiksel olarak azalma elde edilmiştir ($p<0,0001$).



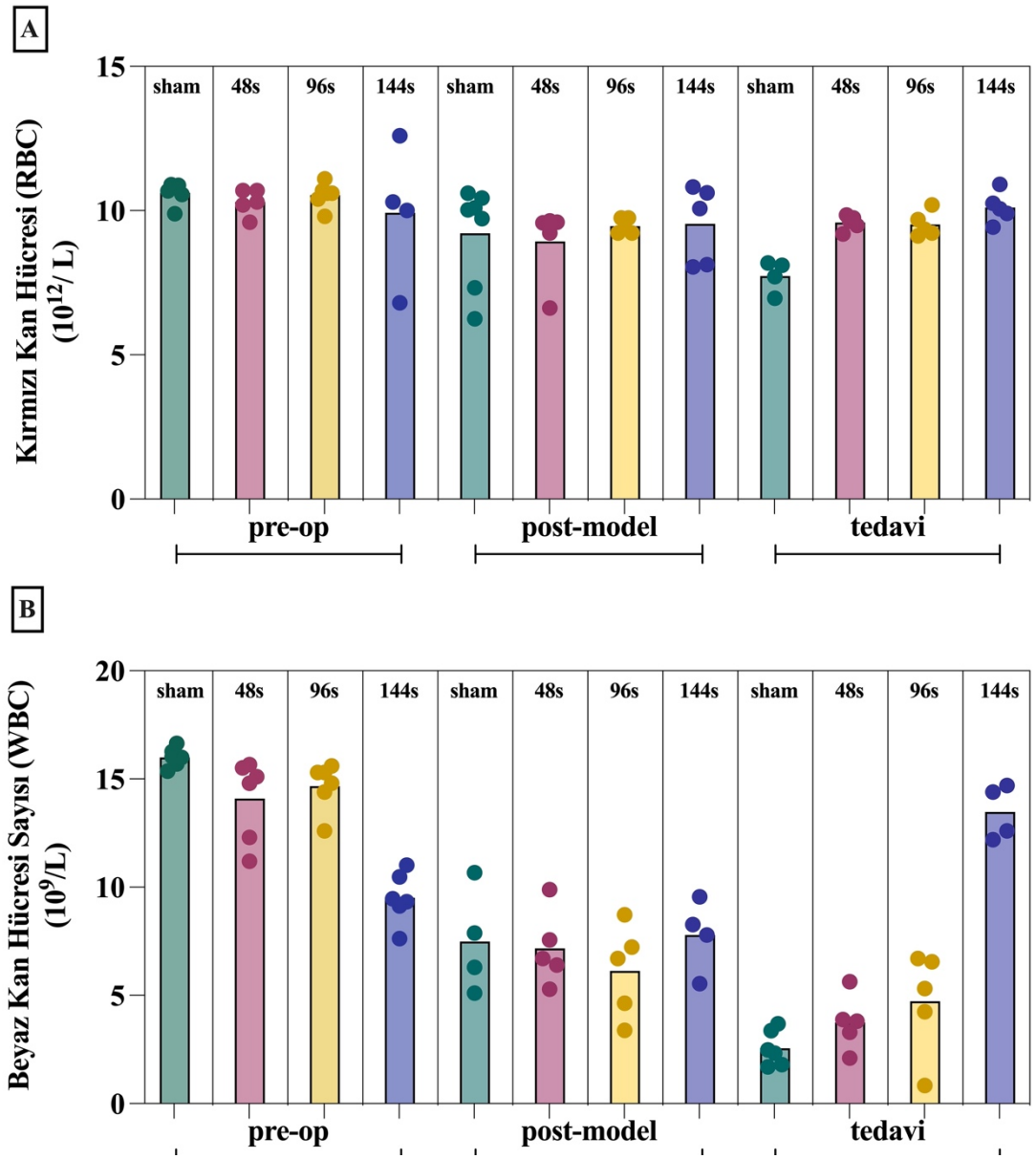
Şekil 4-17: Akut astım modeli gerçekleştirilen sham ve tedavi gruplarında bulanan uygulama aşamalarındaki fare ağırlıkları değişimi.



Şekil 4-18: Akut astım modeli gerçekleştirilen sham (A) ve tedavi (B) gruplarında bulanan uygulama aşamalarındaki yem tüketim miktarları değişimi.

4.2.2. Hemogram Sonuçları:

Alerjenle indüklenen hava yolu inflamasyonu oluşturulan 21 günlük model süresinde hayvanlardan belirli dönemlerde kan örnekleri alınmıştır. Hemogram ölçümü yapılan kan örneklerinin takibi hayvanların sonlandırma aşamasına değin sürdürülmüştür.



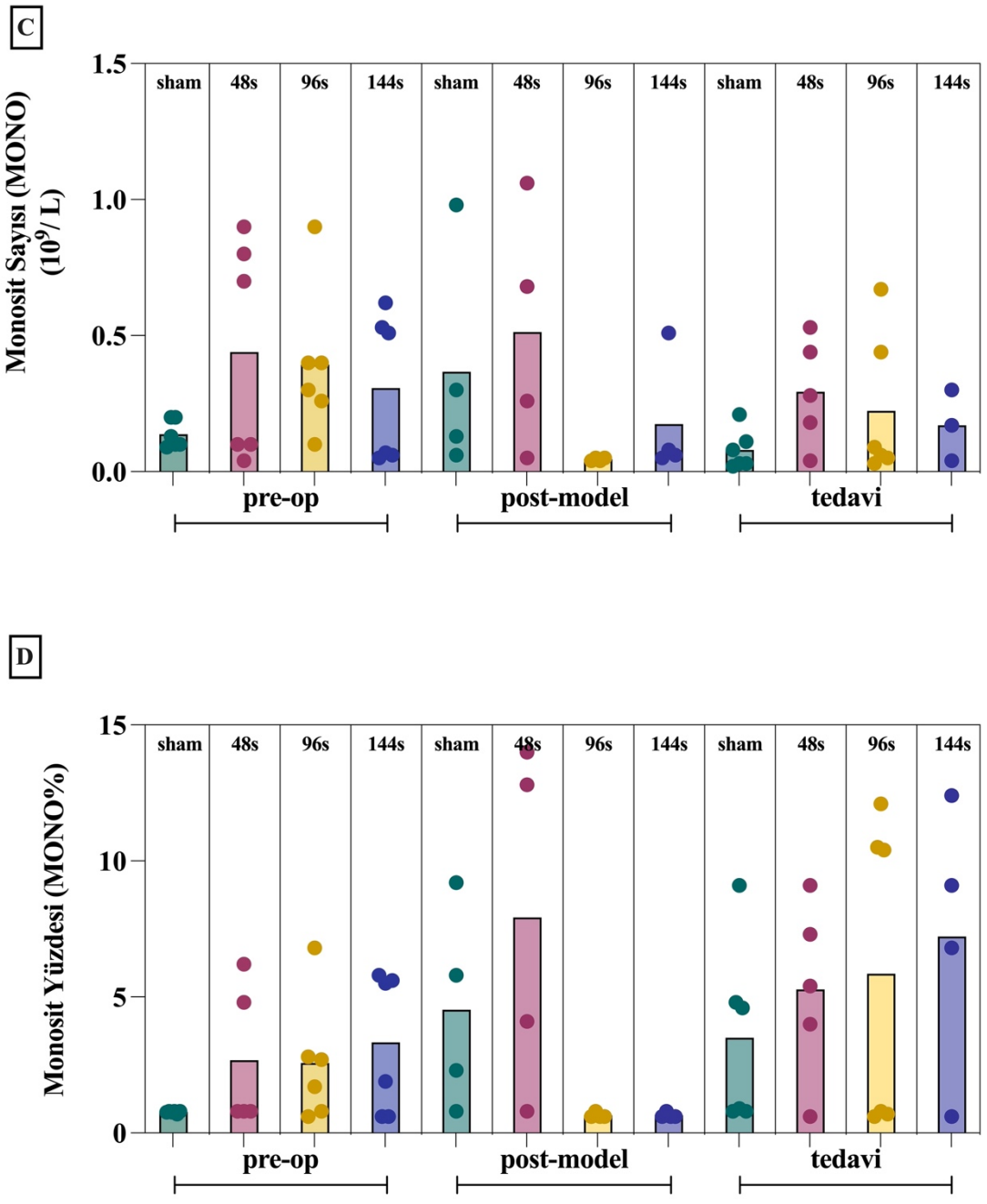
Şekil 4-19: Akut astım modelinde çalışılan sham, 48 saat, 96 saat ve 144saat tedavi gruplarının model uygulamasındaki her bir aşamada elde edilen kırmızı kan hücresi (RBC) (A) ve beyaz kan hücresi (WBC) (B) değerleri.

Kan alımları, akut astım modeli oluşturulmadan önce (pre-op), pozitif kontrol (sham) ve PG-A tedavisi alan (48s, 96s, ve 144s) gruplarda, model oluştuktan sonra (post-model) ve tedavi aşamalarında olmak üzere 3 farklı zamanda gerçekleştirilmiştir.

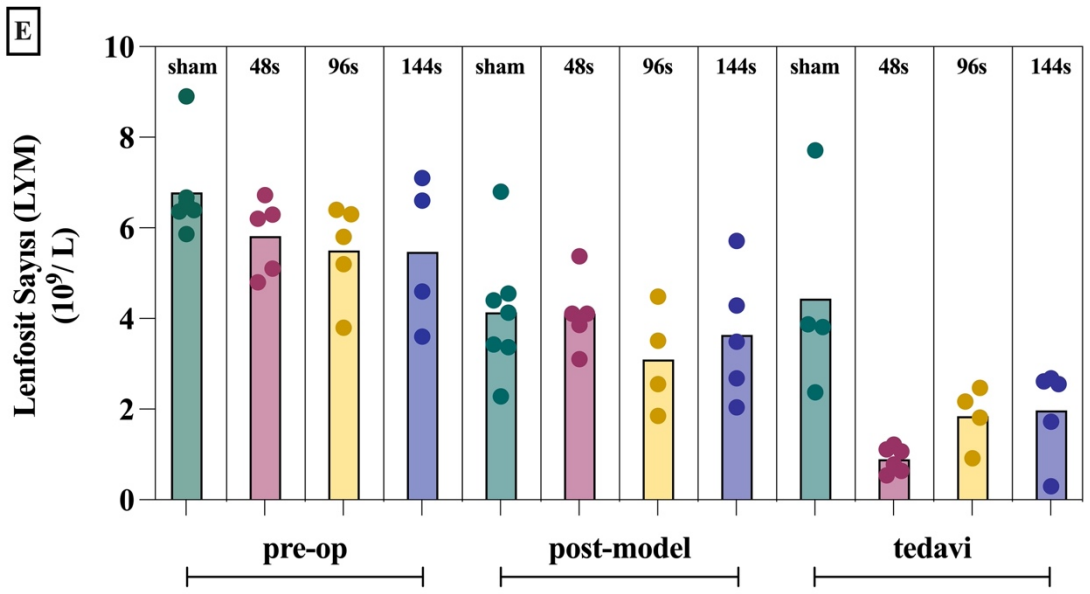
Hemogram parametrelerinden ilk olarak kırmızı kan hücrelerine (RBC) bakıldığında ; Pre-op, post-model ve tedavi aşamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar elde edilmiştir (p= 0,0069). Pre-op aşamasında bulunan gruplar arasında 144s grubunun RBC değeri diğer aşamasına kıyasla azalmıştır. Sham grupları kendi aralarında pre-op aşamasından tedavi aşamasına geçişte RBC sayılarında azalma göstermiştir. Tedavi gruplarında ise post-model aşaması içerisnde 48s grubundan 144s grubuna doğru istatistiksel olarak anlamlı olmasa da RBC sayılarında artış gösterilmiştir. Tedavi aşamasında sham grubundan 48s ve 96s gruplarına geçişte RBC değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttığı görülmüştür. Tedavi aşamasında sham ile 144s grupları arasında RBC sayısı istatistiksel olarak artmıştır (p= 0,0437) (Şekil 4-19A). Bir sonraki hemogram parametresi olan beyaz kan hücreleri (WBC) değerleri incelendiğinde, Pre-op aşamasında tedaviye geçişte tüm sham grupları arasında istatistiksel olarak WBC sayısında azalma olduğu görülmüştür (p<0,0001).Ayrıca WBC değerlerinde tüm aşamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir(p<0,0001).Post-model ve tedavi aşamalarında bulunan tüm aşamalarda 144s grubunda diğer gruplara nazaran WBC sayısının diğer grup yüksekolduğu görülmüştür. Tedavi aşamasında bulunan gruplar arasında tedavi süresinin artışına pozitif korele şekilde, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da WBC sayıları artmıştır. Sham, 48s ve 96s grupları pre-op aşamasından tedaviye geçişte WBC değerlerinde azalma olduğu belirlnmiştir (Şekil 4-19B).

Bir sonraki hemogram parametreleri olarak monosit sayıları (MONO) ve monosit yüzdeleri (MONO%)değerlendirilmiştir. Pre-op, post-model ve tedavi aşamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık elde edilmemiştir.Sham ve 48s gruplarında pre-op aşamasından post-model aşamasına geçişte MONO sayılarında artma olduğu görülmüştür. Post-model aşamadan tedavi aşamasına geçişte ise MONO sayısında azalma elde edilmiştir. Dört kere PG-A tedavi uygulaması yapılan 96s grubunda pre-op aşamasından post-model aşamasına geçişte MONO sayısında azalma, tedavi aşamasına geçişte ise MONO sayısında artma olduğu görülmüştür. Altı kere PG-A ile tedavi uygulaması gerçekleştirilen 144s grubunda ise pre-op aşamasından tedaviye geçişte MONO sayısı azalmıştır (Şekil 4-20C). Aşamalar ve gruplar genel olarak

değerlendirildiğinde monosit sayısı ile monosit yüzdeleri (Şekil 4-20D) arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır.



Şekil 4-20:Akut astım modelinde çalışılan sham, 48 saat, 96 saat ve 144saat tedavi gruplarının model uygulamasındaki her bir aşamada elde edilen monosit sayısı (MONO) (C) ve monosit yüzdesi(MONO%) (D) değerleri.

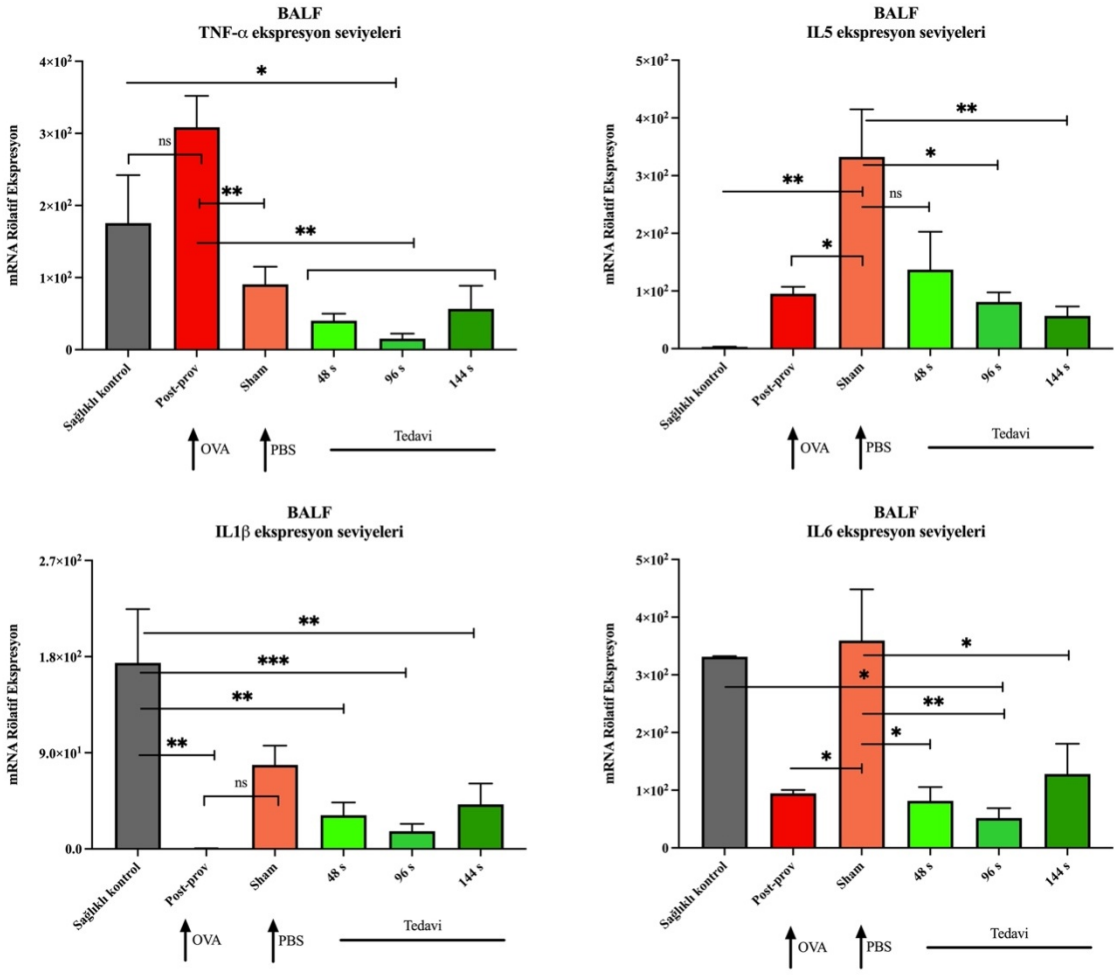


Şekil 4-21:Akut astım modelinde çalışılan sham, 48 saat, 96 saat ve 144saat tedavi gruplarının model uygulamasındaki her bir aşamada elde lenfosit sayısı (LYM) değerleri

Son hemogram parametresi olarak lenfosit (LYM) sayılarıyorumlandığında; sham gruplarında LYM sayısında pre-op aşamasından post-model aşamasına geçişte azalma olduğu, tedaviye geçişte ise post-model aşamasına kıyasla artma olduğu görülmüştür. Pre-op aşamasından tedaviye geçişte 48s, 96s ve 144s grupları her bir aşamada LYM sayıları azalma göstermilştir. Pre-op aşamasında sham grubu diğer gruplara kıyasla yüksek LYM sayısına sahip olmakla birlikte 48s, 96s ve 144s grupları arasında LYM sayıları açısında belirgin bir farklılık bulunmamıştır. Post-model aşamasında LYM sayıları 96s grubunda en düşük seviyesine ulaşmıştır. Post-model aşamasında 144s grubunda ise LYM sayısında 96s grubuna kıyasla artma olduğu fakat sham ve 48s gruplarının LYM sayıları kadar artmadığı görülmüştür. Tedavi aşamasında PG-A ile tedavi uygulaması yapılan 48s, 96s ve 144s grupları arasında tedavi süresi artışna bağlı olarak LYM sayılarında istatistiksel olarak almalı olmasa da artma olduğu görülmüştür. LYM sayılarında tüm aşamalar arasında istatistiksel olarak anlamlılık olduğu gösterilmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 4-21E).

4.2.3. BALF Örneklerinde mRNA Ekspresyon Seviyeleri

Elde edilen BALF örnekleri sırasıyla; sağlıklı kontrol (n=3), post-prov (n=3), sham grubu (n=3), deneysel PG-A tedavi grupları (n=9) olarak toplamda 18 örnekten oluşmaktadır. Bu 15 örnekten elde dilen total RNA örnekleri kullanılarak cDNA'ları sentezlenmiş olup rölatif ekspresyon seviyeleri RT-PZR yöntemi ile belirlenmiştir. TNFα, IL1β , IL5ve IL6 sitokinlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.



Şekil 4-22: Akut astım modeli uygulanmış BALB/c farelerden alınan BALF örneklerinin TNFα (A), IL5 (B) , IL1β, (C), IL6 (D) mRNA ekspresyon seviyeleri.

Sağlıklı kontrol, Sham ve deneysel PG-A tedavisi (48s, 96s ve 144s) alan gruplardan toplanan BALF örneklerinden elde dilen total RNA örnekleri kullanılarak cDNA'ları sentezlenmiş olup rölatif ekspresyon seviyeleri GZ-PZR yöntemi ile belirlenmiştir. TNFα, IL1β , IL5, grafiği yok ve IL6 sitokinlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Referans gen olarak *RPLP0* seçilmiştir.

TNFα ekspresyon seviyelerine bakıldığında karşılaştırılan gruplar arasında istatiksel olarak anlamlılık bulunmuştur (p=0,0004). Sağlıklı kontrol ile post-prov grupları arasında anlamlı farklılık bulunmasa da TNFα seviyesi artmıştır. Post-prov ve sham grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuş olup TNFα seviyelerinde azalma görülmüştür (p=0,0072). Benzer şekilde post-prov ile tedavi gruplarının tamamında istatiksel anlamlı şekilde TNFα seviyeleri azalmıştır. İki defa tedavi uygulanan 48 saatlik grupta p=0,0013; dört defa tedavi uygulanan 96 saatlik grupta p= 0,0003; 6 defa tedavi uygulanan 144 saatlik grupta ise p= 0,0010 çok yönlü ANOVA sonucunda ile belirlenmiştir. Ayrıca sağlıklı kontrol değerine göre 96 saatlik tedavi sonucunda TNF- α seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (p=0,0417) (Şekil 4-22A).

IL5 mRNA ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmiştir (p=0,0023). Sağlıklı kontrol ile post-prov grupları arasında anlamlı farklılık bulunmasa da IL5 seviyesinde artış görülmüştür. Sağlıklı kontrol ve sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış elde edilmiştir (p= 0,0035). Sham grubu ile iki kere tedavi uygulanan 48 saatlik grup arasında anlamlılık görülmemiş olup IL5 seviyelerinde azalma belirlenmiştir. Sham grubu ile 4 defa tedavi uygulanan 96 saatlik grup ve 6 kere tedavi uygulanan 144 saatlik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gözlenmiştir (sırasıyla p=0,0109 ve p=0,0048) (Şekil 4-22B).

IL1β mRNA seviyeleri incelendiğinde, tüm gruplar arasında anlamlı farklılık elde edilmiştir (p=0,0005). Sağlıklı kontrol ile post-prov grupları arasında IL1β seviyelerinde ekspresyon seviyeleri açısından istatiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür (p= 0,0008). Aynı şekilde saağlıklı kontrol ve tedavi grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Sağlıklı kontrol ve iki kere tedavi uygulanmış 48 saatlik grup arasında p=0,0031; sağlıklı kontrol ile 4 kere tedavi uygulanmış 96 saatlik grup arasında p= 0,0007; pre-op ile 6 kere tedavi uygulanmış 144 saatlik grup arasında p= 0,003 değerleri elde edilmiştir (Şekil 4-22C).

IL6 mRNA ekspresyon seviyelerine bakıldığında, tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim belirlenmiştir (p=0,0023). Sağlıklı kontrol ile 4 defa tedavi uygulanan 96 saatlik grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş elde edilmiştir (p=0,0469). Sağlıklı kontrol ile post-prov arasında istatistiksel anlamlılık görülmese de IL6 seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Post-prov ve sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür (p=0,0497). Sham grubu ile tedavi grupları arasında

istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmiştir, anlamlılık değerleri sırasıyla; sham ile 48 saatlik tedavi grubu p=0,0196, sham ile 96 saatlik tedavi grubu p=0,0086, sham ile 144 saatlik tedavi grubu p= 0,0352 olarak elde edilmiştir (Şekil 4-22D).

ELISA deney sonuçları:

ELISA testleri için hayvanlardan alınan serum örnekleri aşağıda belirtildiği şekilde gruplandırılmıştır;

Pre-op; sağlıklı kontrol, sham ve tedavi gruplarındaki hayvanlardan hiçbir uygulama yapılmadan önce alınan serum örnekleri

Post-sens; sham ve tedavi gruplarındaki hayvanlardan sensitizasyon işlemi sonrasında alınan serum örnekleri

Post-prov; sham ve tedavi gruplarındaki hayvanlardan sensitizasyon ve provokasyon işlemleri sonrasında alınan serum örnekleri

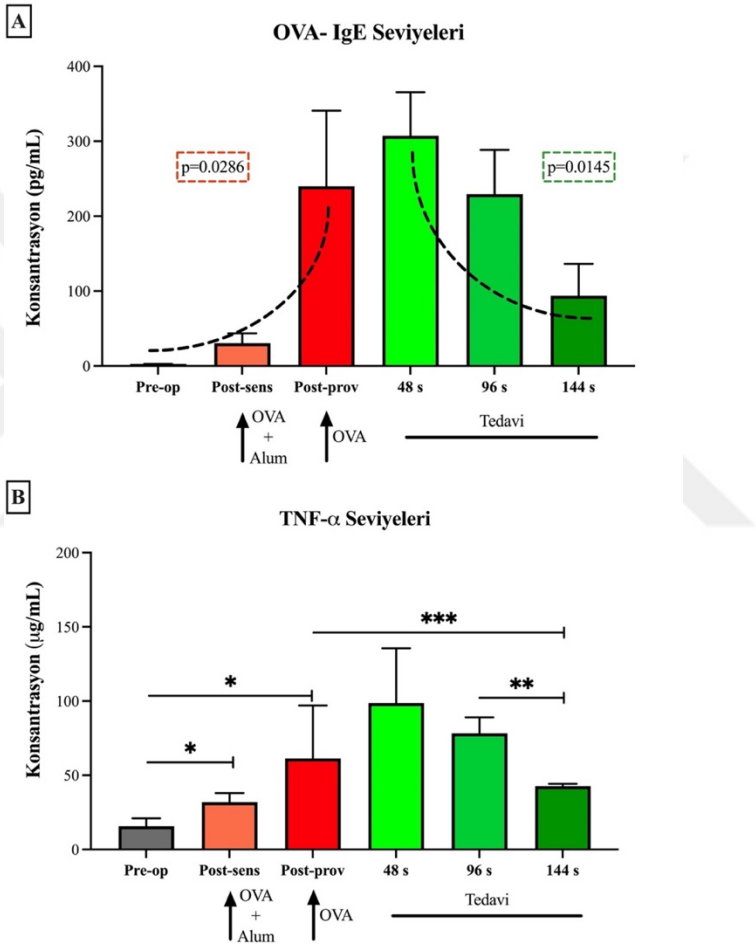
48s, 96s, 144s; *in vivo* modelin tüm aşamalarının uygulanmasının ardından belirlenen süre boyunca PG-A tedavisi yapılan hayvan gruplarından alınan serum örnekleri

OVA'ya özgü IgE Miktarı

In vivo takip süreçleri boyunca elde edilen fare serum örneklerinde OVA-IgE seviyeleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, post-sensitizasyon ve post-provokasyon süreçlerinde uygulanan sırasıyla OVA+Alum ve devamındaki intranasal OVA uygulamasıyla OVA'ya özgü IgE seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır (p=0,0286). Akut astım modelinin oluşturulmasını takiben farklı zaman aralılarında uygulanan (48, 96, 144. saatler) PG-A tedavisinin istatiksel olarak anlamlı şekilde OVA'ya özgü IgE seviyelerini azaltığı görülmüştür (p=0,0286). Post-prov'da OVA'ya özgü IgE seviyelerinin 48 saat uygulanan tedaviye rağmen arttığı görülmüştür. 96 saate kadar 4 defa uygulanan tedavinin 48 saatte gerçeklşetirlinen 2 tedsviye göre azaldığı fakat post-prov'daki OVA'ya özgü IgE seviyelerinin değişmediği gözlenmiştir. Ayrıca 144 saatteki uygulanan 6 kere tekrarlanan tedavi uygulaması sonucunda OVA'ya özgü IgE seviyelerini post-prov'a göre anlamlı azaldığı (p=0,0150), post-sens'e göre ise anlamlı şekilde azalmadığı gözlenmiştir (p=0,0663) (Şekil 4-23A).

TNFα Miktarı

In vivo takip süreçleri boyunca elde edilen fare serum örneklerinde TNFα seviyeleri belirlenmiştir (Şekil 4-23B). Astım modeli uygulamasının aşamaları kendi içerisinde değerlendirildiğinde, pre-op aşamasındaki TNFα seviyelerinin post-sens uygulaması sonucunda anlamlı şekilde arttığı görülmüştür (p=0.0140). Aynı şekilde pre-op TNFα seviyelerinin post-prov uygulaması sonucunda da anlamlı bir artış elde edilmiştir (p=0.042).



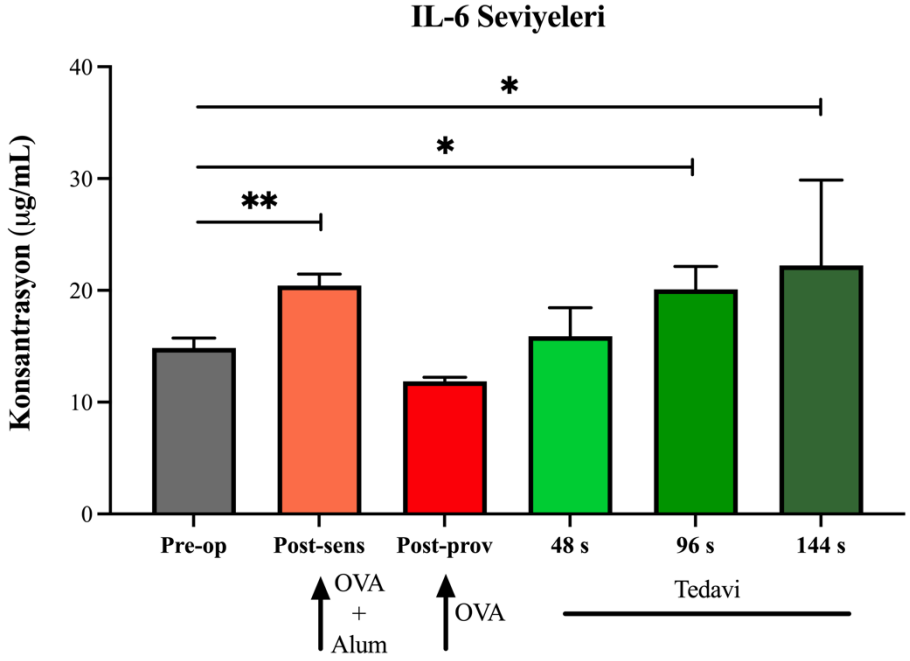
Şekil 4-23: Akut astım modeli uygulanan BALB/c farelerden alınan serum örneklerinde ELISA deneyleri sonucunda elde edilen OVA-IgE (A) ve TNFα(B) seviyeleri.

Post-prov uygulamasını takiben 2 kere tekrarlanan 48 saatlik PG-A tedavisi sonucunda TNFα seviyelerinde istatitsiksel olarak anlamlılık bulunmasada artış elde edilmiştir. 6 defa tekrarlanan 96 saatlik tedavi uygulaması ise 48 saat uygulanan tedaviye kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bulunmasada TNFα seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Ayrıca, 144 saate kadar 6 kere uygulanan tedavinin sonucunda elde edilen TNFα

seviyesinin 96 saate kadar uygulanan tedaviye kıyasla anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (p=0.037). Devamında, 144 saate kadar 6 defa tekrarlanan tedavi uygulamasının sonucunda TNFα seviyeleri post-prov'a kıyasla anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (p=0.0003).

IL6 Miktarı

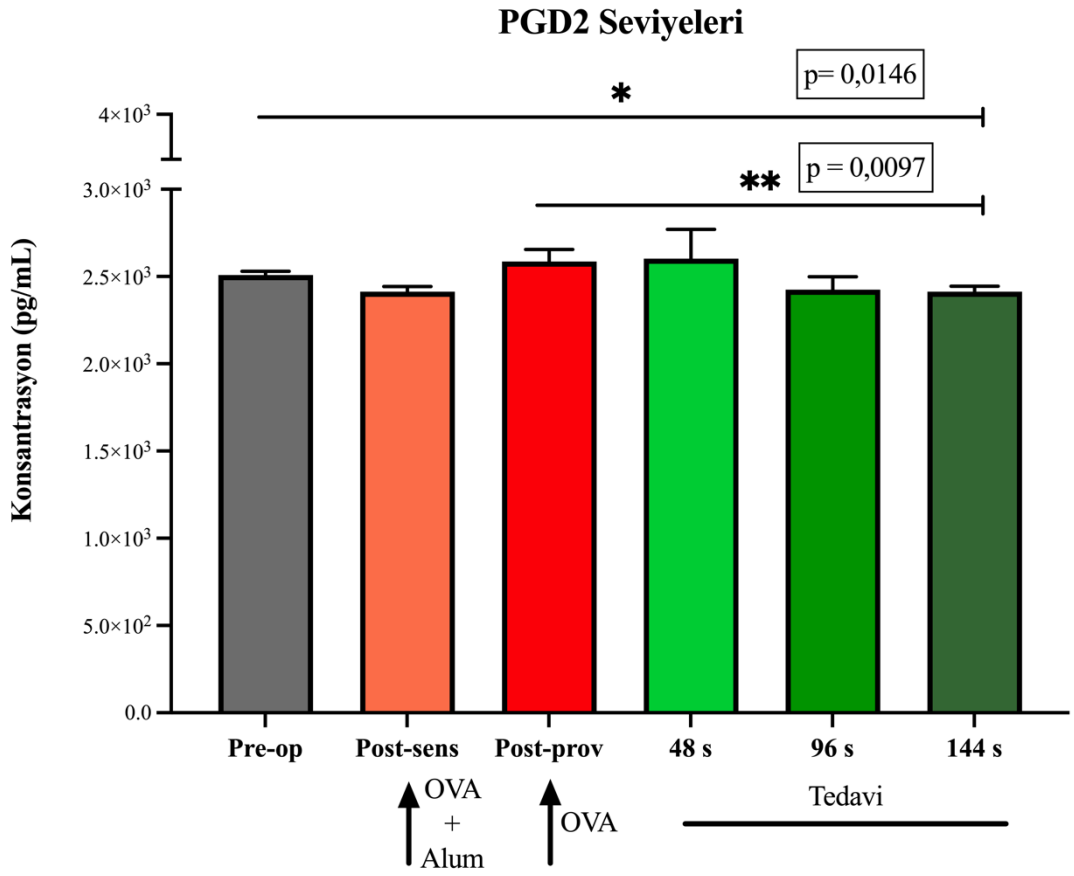
In vivo takip süreçleri boyunca elde edilen fare serum örneklerinde IL6 seviyeleri belirlenmiştir. Astım modeli uygulamasının aşamaları kendi içerisinde değerlendirildiğinde, pre-op IL6 seviyelerinin post-sens uygulaması sonucunda anlamlı olarak arttığı görülmüştür (p=0,0011). Pre-op IL6 seviyelerinin post-sens uygulamasını takiben post-prov uygulaması sonucunda azaldığı gözlenmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,0779). İki kere tekrarlanan 48 saatlik tedavi uygulaması sonucunda IL6 seviyelerinin pre-op seviyesine yaklaştığı görülmüştür (p=0,6381). Dört defa tekrarlanan 96 saatlik tedavi uygulaması ile IL6 seviyeleri pre-op seviyesine göre istatistiksel olarak artmıştır (p=0,0193) buna rağmen, post-sens seviyelerine yakın olduğu görülmüştür. Tedavinin devam eden süreci olan 144. saate kadar 6 defa uygulanan tedavinin sonucunda IL6 seviyesinin pre-op seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı (p=0,0259) fakat bu artışın hem post-sens hem de post-prov'a göre anlamlı olmadığı görülmüştür (p > 0,05)(Şekil 4-24).



Şekil 4-24: Akut astım modeli uygulanan BALB/c farelerden alınan serum örneklerinde ELISA deneyleri sonucunda elde edilen IL6 seviyeleri.

Prostaglandin D2 (PGD2) Miktarı

In vivo takip süreçleri boyunca elde edilen fare serum örneklerinde PGD2 seviyeleri belirlenmiştir. Astım modeli uygulamasının aşamaları kendi içerisinde değerlendirildiğinde, gruplar arasında (pre-op, post-sens, post-prov, tedavinin 48 ve 96. saatleri) anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Yalnızca pre-op değerlerine göre tedavinin en uzun süre değerlendirildiği 144.saat olarak uygulanan zaman diliminde PGD2 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir (p=0,0146) (Şekil 4-25).



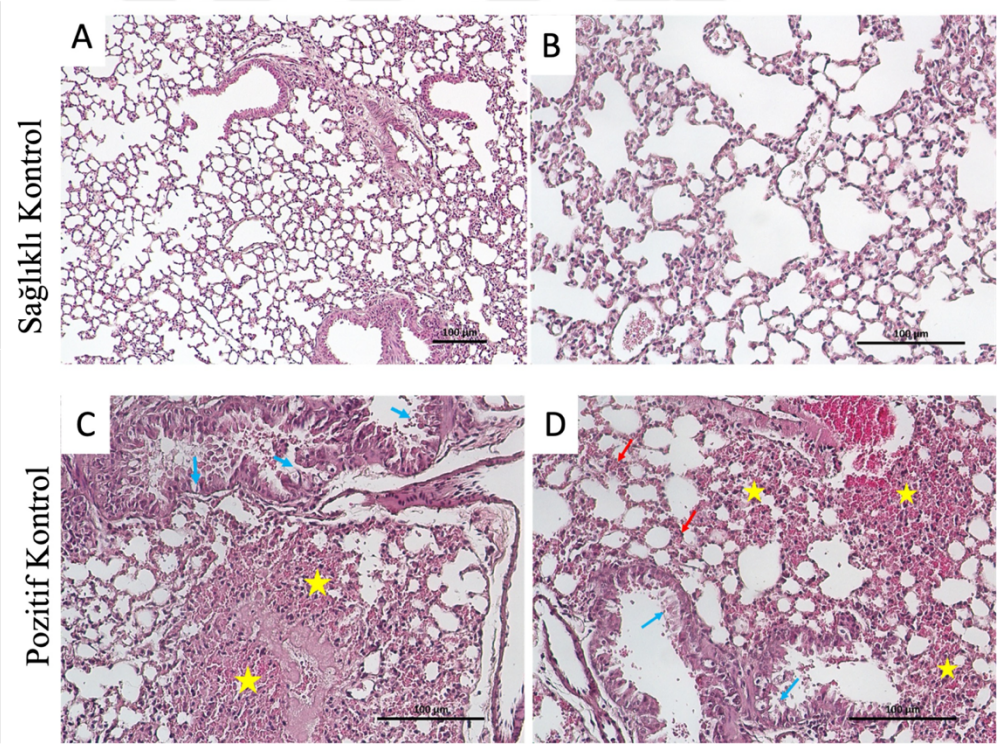
Şekil 4-25: : Akut astım modeli uygulanan BALB/c farelerden alınan serum örneklerinde ELISA deneyleri sonucunda elde edilen PGD2 seviyeleri.

4.2.4. Akciğer Dokularının Histoloji Sonuçları

Akciğer dokuları sırasıyla; sağlıklı kontrol (n=1), pozitif kontrol(sham; n=3), deneysel PG-A tedavi grubu (48s, 96s ve 144s; n=9) toplamda 13 örnekten oluşmaktadır. Bu 13 örnekten elde edilen akciğer dokuları hemotoksilen-eozin ile boyanarak incelenmiş ve skorlanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesiyle gruplar açısından ilk olarak negatif

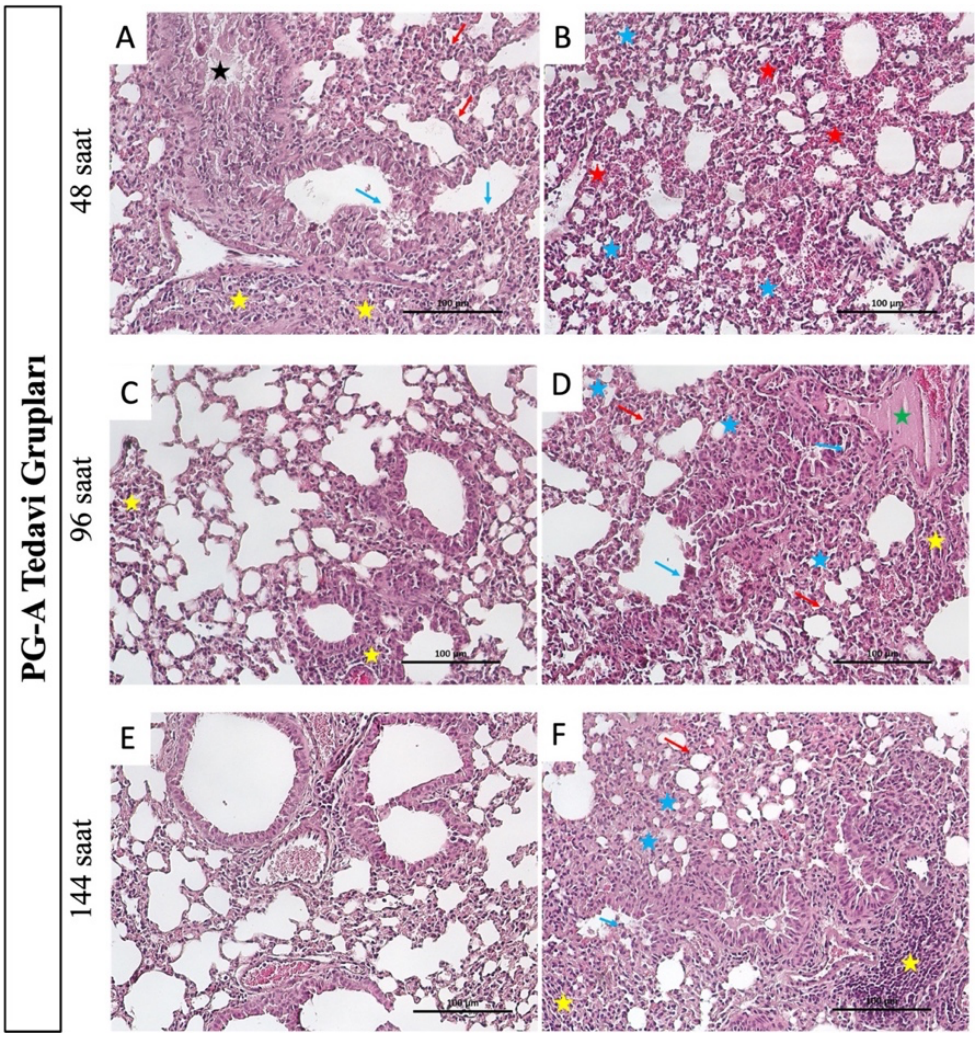
kontrol değerlendirilmiştir. Akciğer dokularının histolojisi beklendiği gibi normal, sağlıklı akciğer görünümdedir. Bronş, bronşiyol ve alveol yapılarında herhangi bir anormal durum gözlenmemiştir. İnteralveoler septumlar ince yapıları belirgindi (Şekil 4-26A ve 4-26B).

İkinci grup olan pozitif kontrol(sham) grubunda alerjenle indüklenmiş havayolu inflamasyonu modeli oluşturulan bu grupta önemli histopatolojik değişiklikler saptanmıştır. Bronş, bronşiyol duvarın epitel alanlarında belirgin dejenerasyonlar (nükleer piknoz, perinükleer ve sitoplazmik ödem, hücre ölümü v.b.) gözlenmiş olup, lümende çok sayıda epitel hücresi ve hücre artıkları gözlenmiştir. Akciğerler boyunca geniş alanlarda hemoraji, asidofilik amorf madde birikimleri görülmüştür. İnteralveolar septumda kalınlaşma ve bağ dokusunda hemoraji saptanmıştır. Özellikle damar çevresinde ve interalveoler septumun bağ dokusunda inflamatuar hücre infiltrasyonu görülmüştür (Şekil 4-26C ve 4-26D).



Şekil 4-26: A ve B. Sağlıklı kontrol grubuna ait akciğer kesitleri (A: HE X10; B: HEX20). C ve D. Pozitif kontrol grubuna ait akciğer kesitlerinde bronşiyollerin duvar epitelinde belirgin dejenerasyon; lümeninde epitel hücresi ve hücre artıkları görülmekte (mavi oklar). Hemoraji, inflamatuar hücre infiltrasyonu (sarı yıldızlar) ve interalveoler septumun kalınlaştığı görülmektedir (kırmızı oklar)(HE X20).

Son olarak üçüncü grup olan üç zaman diliminde PG-A tedavisi uygulanan gruplara ait HE sonuçları değerlendirilmiştir. Bu grupta da alerjenle indüklenmiş havayolu inflamasyonu modeli grubunda olduğu gibi belirgin değişiklikler saptanmıştır.İlk olarak 24 saat arayla iki defa tedavi uygulanan tedavi grubuna ait akciğer kesitlerinde bronşiyollerin duvar epitelinde belirgin dejenerasyona bağlı (nükleer piknoz, perinükleer ve sitoplazmik ödem, hücre ölümü vb.); lümeninde epitel hücresi ve hücre artıkları görülmekte (mavi oklar), siyah yıldız ile gösterilen bronşiyol lümeninin hücresel artıklar nedeni ile neredeyse tamamen kapalı olduğu görülmektedir. Hemoraji, inflamatuar hücre infiltrasyonu (sarı yıldızlar), interalveolar septumun belirgin kalınlaştığı (kırmızı oklar) ve alveol lümeninde kollaps meydana geldiği bildirilmektedir.(mavi yıldızlar). Tedaviye ilişkin bir iyileşme bulgusuna rastlanmamıştır (Şekil 4-27A ; B). Bir sonraki tedavi grubu olan 4 defa tedavi tekrarlanan 96 saat tedavi grubuna ait akciğer kesitlerinde patolojik değişikliklerde azalma olduğu görülmektedir(Şekil 4-27C). Bazı akciğer bölgelerinde bronşiyollerin duvar epitelinde dejenerasyon (mavi oklar), interalveolar septumda kalınlaşma (kırmızı oklar), alveol lümeninde kapanma kollaps olduğu (mavi yıldızlar), küçük Hemoraji, inflamatuar hücre infiltrasyonu (sarı yıldızlar) ve amorf madde birikimi (yeşil yıldız) meydana gelmiştir (Şekil 4-27D).



Şekil 4-27: A ve B. 48 saat uygulanan tedavi grubuna ait akciğer kesitleri ; C. ve D. . 96 saat boyunca tedavi 4 defa tekrarlanan tedavi grubuna ait akciğer kesitleri E. ve F. 144 saat süresince 6 defa uygulanan tedavi grubuna ait akciğer kesitleri. Mavi oklar. Epitel hücreleri ve hücre artıkları; Sarı yıldızlar. Hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu; Kırmızı oklar. İntralveolar septumun belirgin kalınlaşması; Mavi yıldızlar. Alveolar lümeninde kollaps; Siyah yıldız. Bronşiyal lümenin hücresel artık hücreler ile tamamen kapanması (HE 20X).

5. TARTIŞMA

Alerjik hastalıklar çoğunlukla IgE'ye bağlı mekanizmalarla yönlendirilen çeşitli inflamasyon modelleri ile karakterize edilir. İnflamasyon süreci astım, alerjik rinit, atopik dermatit vs olmak üzere birçok alerjik hastalıklar arasında benzer birkaç ortak özelliklere sahiptir (Barnes2011). Alerjik inflamasyonda mukozal mast hücrelerinin IgE'ye bağlı aktivasyonu , T yardımcı 2 lenfositlerin ve doğal lenfosit hücreleri (ILC2) tarafından oluşturulan eozinofil infiltrasyonu ile meydana gelmektedir. Alerjik inflamasyona sahip hastalıkların arasındaki farklılıklar; anatomik, alerjik inflamasyon ve alt solunum yollarında bronkokonstrüksiyona sebep olan hava yolu düz kas hücreleri ve üst solunum yollarında vazodilatasyonla oluşan burun tıkanıklığına yol açan hücreler arasındaki etkileşimlere bağlı oluşmaktadır (Şahiner ve ark. 2022). Yapılan patofizyolojik araştırmalar alerjenlerin, burun ve bronşlarda inflamatuvar mukozal yanıtlara yol açtığını göstermiştir (Rowe-Jones 1997). Nazal solunum mukozası epitel, bazal membran ve lamina propria ve mikrovilluslardan oluşması nedeniyle solunum yüzeyinin arttırılmasında önemli rol oynamaktadır. İntranasal uygulama ile yapılan bir araştırmada, *Lactobacillus .rhamnosus* GG probiyotiğinin BALB/c türü farelerle oluşturulan alerjik hava inflamasyon modeline olan etkisi çalışılmış olup IL5, IL13 sitokin seviyelerinde ve hava yolu aşırı duyarlılığında azalma elde edilmiştir. Bu sonuç oral yol ile alınan probiyotiklerin etkili bir alternatif yol olarak intranasal yolun alerjik hava yolu inflamasyon tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir (Spacova ve ark. 2019). Subhashini ve ark'larının kurkuminin BALB/c türü farelerde oluşturulan astım modeli üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, intranasal uygulamanın intraperiotenal uygulamaya kıyasla daha düşük dozlarda bronkokonstriksiyonu ve akciğer inflamasyonunu hafifletmede etkili olduğu ortaya koyulmuştur (Subshashini ve ark. 2013).

Hava yolu inflamasyonu ile karakterize bronşiyal aşırı duyarlılık ve hücresel inflamasyonun meydana geldiği kronik bir hastalık olan astımın günümüzdeki tedavi seçenekleri semptomları hafifletmeye dayanmaktadır. Mevcut tedavi seçeneklerinden olan ilaç gruplarının kısa süreli kullanımlara uygun olduğu ancak uzun süreli kullanımda ciddi yan etkilere yol açabileceği belirtilmiştir (Ko FWS ve Salvi 2023). Bu nedenle hava yolu inflamasyonu temelli hastalıkların tedavisinde fitokimyasal araştırmalar hız kazanmaktadır.

Güçlü fitokimyasallara sahip bir bitki olan *A vera* çeşitli kültürlerde uzun bir tıbbi kullanım geçmişine sahip olmasının yanında antioksidan, antiviral, immünomodülatör ve antiinflamatuvar gibi farmakolojik etkileri yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Gao 2018). Literatürde *A.vera* ile oluşturulmuş formülasyonlar alerjik rinitte çalışılmış olup hava yolu inflamasyonuna yönelik herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir.*A.vera* bitkisinin içerisinde bulunan aloin etken maddesinin kombine alerjik rinit ve astım (CARAS) fare modeli üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmada, aloin ile tedavi edilen farelerin burun mukozasında incelme ve peribronşiyal inflamatuvar infiltrasyonununda azalma gösterilmiştir. Bu aloinin OVA ile indüklenen inflamatuvar yanıtı hafiflettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca aloin uygulanan grupta BALF'da IL4, IL5 ve IL13 seviyelerinde düşüş olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar, aloinin Th2 aracılı immün yanıtta baskılayıcı etkisi olduğunu göstermiştir (Feng ve ark. 2023).

Bu çalışma kapsamında ise özellikle *A.vera* sahip olduğu ve bugüne kadar sıklıkla *in vitro* olarak gösterilen anti-inflamatuvar, anti-alerjik özelliklerin daha etkili bir yönlenim ile formülize edilip kullanılabilir formlarının çeşitlendirilmesi amaçlanmıştır. Buradan hareketle, bu çalışmada *A.vera* jeli ile farmasötik etkili preparatlarda çok sık kullanılan ve EMA onayı olan bilinen ve etkileri iyi araştırılmış bir eksipiyan olan propilen glikol (PG) kullanılmıştır. PG, topikal preparatlarda nemlendirici, çözeltilerde koruyucu ve ayrıca aerosollerde, oral çözeltilerde ve topikallerde yardımcı çözücü olarak kullanılmaktadır (EMA 2017). Çok geniş kullanımı olan PG, *A.vera* ile birlikte belirlediğimiz oranda karıştırılarak intranazal ve olası inhalasyon edilebilir özellik kazandırılmaya çalışılmıştır. Bunun etkinliklerinin gösterilmesi için alerjenle indüklenen havayolu inflasyonu modelini hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde çalışarak ve sadece *A.vera* verilen gruplarla karşılaştırılmıştır. Bu anlamda bakıldığında bu çalışma tamamlayıcı ve preklinik aşamaya hazırlık sürecini kapsamaktadır.

İlk olarak 24 saat ve 48 saat'lik AJ ve PG-A ön formülasyonu uygulanmasının A549 ve HSAEC hücre hatlarındaki hücre canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. 24 saat ve 48 saatlik maruziyet uygulanan AJ ve PG-A'nın belirlenen IC_{50} değerleri açısından karşılaştırılmalar yapılmıştır. Her iki bileşiğin de hücre canlılığını teşvik ettiği görülmektedir. PG-A'nın 48 saat sonunda elde edilen IC_{50} değerinin düşmesine sebep olarak PG-A'nın proliferatif etkisinin yanında viskoz olan yapısının hücrelerin besin besiyerinden faydalanmasında engelleyici bir rol oynadığı söylenebilir.Yapılan bir

araştırmada *A.vera* jelinin hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu arttığı belirtilmiştir (Shafaie ve ark. 2020). AJ'in IC_{50} değerlerinde PG-A'da olduğu gibi maruziyet süresi artışına bağlı azalma elde edilmemiştir. Bu sonuca PG-A'nın viskozitesinin AJ'den daha düşük olması gösterilebilir. Başka bir sebep olarak da AJ'den daha düşük vizkoziteye sahip olan PG-A'nın hücre proliferasyonunu arttırması sonucunda hücrelerin besinyetersizliği yaşayarak IC_{50} değerlerinde azalmaya sebep olduğu düşünülebilir. PG-A'nın yüksek konsantrasyonda elde edilen IC_{50} değerleri, ilerleyen süreçlerde yapılması planlanan *in vivo* deneyleri için umut vadeden bir formül olacağını göstermektedir.

Öncelikle *in vitro* aşama tamamlanmış olup *A.vera* jeli ile oluşturulan PG-A ön formülasyonunun iki ayrı hücre serisinde LPS ile indüklenmiş *in vitro* inflamasyon modelinde çalışılmıştır. Bu kapmsada hücre serisi olarak A549 ve HSAEC hücre hatları öncelikle indüklenmiş ve PG-A, AJ ve sadece indüklenen gruplarla karşılaştırılmıştır. Belirlenen uygulama zamanı ve olası tedavi edici dozların seçimi sonrasında, hedeflenen *in vitro* inflamasyon modeli literatürden seçilen çalışmalarda bildirildiği gibi oluşturulmuştur (Grandel ve ark. 2009; Keuper ve ark. 2011; Akgün ve ark. 2015). In vitro inflamasyon modeli için gram-negatif bakterilerin dış hücre zarında bulunan lipopolisakkarit (LPS) tercih edilmiştir. LPS hücre zarında bulunan Toll benzeri reseptör 4'e (TLR4) bağlanmaktadır. TLR4 reseptörlerine bağlanan LPS, pro-inflamatuvar sitokinlerden olan IL6, IL1β ve TNFα'nın transkripsiyonuna ve transkripsiyon faktörü olan NF-κB yolağınının aktivasyonuna neden olmaktadır (Li ve ark. 2020). Çalışmamızda A549 ve HSAEC hücre serileri ile LPS maruziyeti için LPS konsantrasyonları 1μg/mL ve 10 μg/mL olarak seçilmiştir. Literatüre baktığımızda Grandel ve ark. (2009)'larının A549 hücreleri üzerinde gerçekleştirdikleri ko-kültür deneylerinde en yüksek sitokin (IL6 ve IL8) cevabının 1 ve 10 μg/mL konsantrasyonlarında elde edildiği bildirilmiştir. Bir diğer araştırmada LPS maruziyeti gerçekleştirilen A549 hücrelerinde TNFα, IL1β, ve IL6 sitokin mRNA ekspresyonu seviyelerinde artış elde edilmiştir (Wang ve ark. 2021). Biz de çalışmamızda ilk olarak, A549 ve HSAEC hücre hatlarında 24 saatlik LPS maruziyeti uygulaması ile indüklenmesi beklenen NF-κB yolağına AJ ve PG-A maddelerinin etkililiği gen ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir.

A549 hücrelerine uygulanan yalnızca 1 μg/mL ve 10 μg/mL konsantrasyonlarda LPS maruziyeti sonucunda TNFα mRNA seviyeleri benzer şekilde artmıştır. Bu durum LPS indüksiyonunun A549 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olmadığı sonucuna işaret etmekte ve LPS konsantrasyon artışının sinyalizasyonda bir değişime neden olmadığını

ortaya koyan bir araştırma ile de uygunluk göstermektedir (Ibeagha-Awemu 2008). A549 hücre serisinde 1 µg/mL LPS + PG-A 3,9 µg/mL grubu 1 µg/mL LPS + AJ 3,9 µg/mL grubuna kıyasla TNFα mRNA seviyesini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da daha fazla düşürdüğü görülmüştür. Bu durumda PG-A'nın AJ'den daha etkili bir anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğu söylenebilir. LPS 10 µg/mL + PG-A 3,9 µg/mL ve LPS 10 µg/mL + AJ 3,9 µg/mL grupları değerlendirildiğinde; AJ ve PG-A maddelerinin arasında bir etkinlik farkı ve TNFα mRNA seviyelerinde bir azalma gözlenmemiştir. Elde edilen bulgulara göre yüksek konsantrasyona sahip LPS (10 µg/mL) ile indüklenmesine karşı AJ ve PG-A (3,9 µg/mL) maddelerinin konsantrasyonlarının yeterli olmadığı sonucuna varılabilir. Bu değerlendirmeyi destekleyici bir sonuç olarak; A549 hücrelerinde LPS'nin 10 µg/mL konsantrasyonuna karşı PG-A ve AJ konsantrasyonunun 7,8 µg/mL'e uygulandığı gruplarda TNFα mRNA seviyelerinin kontrole kıyasla azaldığı görülmüştür. Ayrıca, yanıtta belirlenen bu farklılıkların, literatürde daha önce bildirildiği gibi A549 hücrelerindeki TLR4 yüzey ekspresyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. İlgili çalışmada, TLR4 reseptörlerinin A549 hücrelerin yüzeyde eksprese edildiği bildirilmiştir (Monick ve ark. 2003). A549 hücre serisinde AJ'nin 3,9 µg/mL olduğu LPS'in her iki konsantrasyonda (1 µg/mL;10 µg/mL) uygulandığı gruplarda IL5 mRNA seviyesi kontrole kıyasla düşük bir seviyede elde edilmiştir. LPS (1 µg/mL)+ PG-A (3,9 µg/mL) grubu kontrol grubuna kıyasla en düşük IL5 ekspresyonu edilen grup olduğu gözlenmiştir. Ayrıca PG-A'nın (7,8µg/mL) konsantrasyonunda ve LPS'in (1 µg/mL;10 µg/mL) iki konsantrasyonun da uygulandığı gruplarda IL5 mRNA ekspresyon seviyesi kontrole göre azaldığı görülmüştür. PG-A 'nın 3,9 µg/mL konsantrasyonunda olduğu A549 hücrelerinde iki konsantrasyonda(1 µg/mL ve 10 µg/mL) LPS maruziyeti sonucunda konsantrasyondan bağımsız olarak kontrole göre daha yüksek seviyede IL6 ekspresyonu elde edilmiştir.

IFNγ mRNA ekspresyon seviyesi değerlendirildiğinde, sadece AJ uygulanan gruplarda (3,9 µg/mL ve 7,8 µg/mL) kontrole göre daha yüksek IFNγ seviyesi elde edilmesi AJ'nin anti-inflammatuvar etkisinin göstergesi olarak ifade edilebilir. Bununla birlikte, AJ'nin her iki konsantrasyonda (3,9 µg/mL; 7,8 µg/mL) ve iki farklı LPS (1 µg/mL ve 10 µg/mL) konsantrasyonda uygulandığı grupların, IFNγ seviyesinin kontrole göre daha düşük olması; AJ'nin inflamasyon cevabına karşı yeterli olmama ihtimalini düşündürmektedir. Benzer olarak PG-A'nın iki farklı konsantrasyonu ve yine iki farklı

LPS uygulaması sonucunda IFNγ mRNA ekspresyonu, AJ gruplarına kıyasla yüksek fakat kontrol grubuna göre düşük olduğu görülmüştür. Buradan hareketle, PG-A'nın uygulanan konsantrasyonlarının inflamasyonu baskılayıcı ve/veya tedavi edici etkisinin gözlenmemesinin birkaç sebebe bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bunlar arasında, uygulanan *in vitro* maruziyetin yeterli sürede olmaması, indüklemede seçilen dozların süre açısından yetmemesi veya PG-A içerisinde bulunan AJ'nin konsantrasyonunun artırılması gerektiği olabilir. Fakat buraya kadar elde edilen sonuçlarda ve ön formülasyonda belirlenen PG ve AJ oranının belirli sınırlarda kalması intranazal hedeflenen tedaviyi zorlaştıracağı tahmin edilmiş, i*n vitro* anlamda ko-kültür öncesinde mRNA ekspresyon seviyelerinin etkililiği sınırlı oranda gösterileceği düşünülmüştür. Devam eden ko-kültür aşamasında *in vitro* inflamasyon modeli sayesinde baskılayıcı ve/veya olası tedavi etkinliğinin gösterebilmesi için sitokin miktarlarının kantitatif olarak değerlendirilmesine karar verilmiştir. mRNA ekspresyonlarının değerlendirildiği ve çalışmanın asıl yanıtlarının arandığı hücre serisi olan HSAEC hücre serisinde, sadece LPS maruziyeti uygulanan gruplar arasında konsantrasyon artışına pozitif korele şekilde artan TNFα mRNA seviyeleri belirlenmiştir. Ayrıca kontrol grubunun TNFα seviyesi baz alındığında; yalnızca LPS 10 µg/mL ile indüklenen grupta, PG-A 3,9 µg/mL uygulaması, AJ 3,9 µg/mL uygulamasına göre TNFα mRNA seviyesinde daha fazla azalmasını sağlamıştır. Bu anlamda sadece TNFα açısından bakıldığında HSAEC hücrelerinde uygulanan PG-A maddesinin kontrol grubuna göre TNFα seviyesini azaltması A549 ile gözlenen sonuçlardan daha fazla anti-inflamatuvar etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Değerlendirdiğimiz diğer sitokin seviyesi ise, IL5 mRNA ekspresyonudur. HSAEC hücrelerinde kontrol grubuna göre en düşük IL5 ekspresyon seviyesini 10 µg/mL LPS ile indüklediğimiz ve PG-A'nın 7,8 µg/mL konsantrasyonda yapılan uygulamasında sonucunda elde edilmiştir. Ayrıca yine aynı dozda uygulanan LPS konsantrasyonu uygulanan gruplardan PG-A'nın diğer konsantrasyonunda (3,9 µg/mL) IL5 seviyesi, kendi kontrol grubu ile aynı seviyede kalmıştır. Bu sonuç, PG-A'nın dozunun 7,8 µg/mL konsantrasyonda yeterli etkiyi gösterdiğini kanıtlar niteliktedir. Literatüre baktığımızda varolan çalışmalarda havayolu epitel hücrelerinin TNFα, IL1β, IL6, ve IL11 sitokinlerini eksprese ettikleri belirtilmiştir (Mills ve ark. 1999). Fakat, 1998 yılında Salvi ve ark'ları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, immün sistemde görev alan Th2 hücrelerinden salınan IL5 sitokinin, mRNA düzeyinde sağlıklı hava yolu epitel hücreleri tarafından

eksprese edildiği gösterilmiştir (Salvi 1998). Bu nedenle çalışmamızda ilk olarak mRNA eskpresyonu düzeyinde değerlendirilen sitokin seviyeleri, ko-kültür aşaması kapsamında salınan miktarlar açısından da değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, HSAEC hücre serisinde PG-A 'nın yeterli konsantrasyonda uygulanması alerjik inflamasyon belirteçlerinden biri olan IL5 mRNA ekspresyonunu baskılayabildiğini göstermekte ve *in vivo* çalışma aşaması öncesinde ümit vadeden bir nitelik taşıdığı görülmektedir.

Bir diğer pro-inflamatuvar sitokin olan IL6 mRNA ekspresyonları değerlendirildiğinde; LPS ile uygulanan iki farklı dozun indüksiyonundan bağımsız olarak PG-A'nın spesifik konsantrasyonu etkililik açısından anlamlı farklılıklar taşımaktadır. Özellikle kontrole göre bakıldığında her iki PG-A dozunda IL6 mRNA seviyesinde anlamlı bir azalma görülmüş ve hatta sadece 7,8 µg/mL AJ uygulaması ile karşılaştırıldığında PG-A çok daha etkili bir yanıtın oluşmasını sağlamıştır. LPS ile gerçekleştirilen indüksiyon varlığında, AJ'nin tek başına uygulanması konsantrasyona spesifik etkiler sağlamıştır ve PG-A konsantrasyon artışına bağlı olarak IL6 mRNA ekspresyonunda azalma buradan kaynaklanmaktadır. Yapılan bir çalışma kapsamında *A.vera* jelinde bulunan aloin maddesi konsantrasyonun artışına bağlı olarak IL6 mRNA ekspresyon seviyesinde azalma gözlendiği bildirilmiştir (Ma ve ark. 2108). Bizim sonuçlarımızda da benzer etkiler görülmüş fakat ön formülasyon bu etkiyi daha iyi hale getirmiştir.PG-A (3,9 µg/mL) +LPS (1 µg/mL) grubunun, kontrol grubunun sitokin seviyesinden yüksek olmamakla beraber tüm gruplardaki en yüksek IFNγ ekspresyon seviyesine sahip olması PG-A'nın inflamasyona karşı tedavi edici etkinliğinin güçlü olduğunu düşündürmüştür.

Genel anlamda elde edilen mRNA ekspresyonu sonuçlarında belirgin farklılıklar göze çarpmaktadır. Bunlardan ilki, HSAEC ile A549 hücre serilerinin aynı koşullarda yapılan maruziyetlere farklı yanıtlar sağlamasıdır. Bu elbette beklenen bir etki olup, sonuçlar açısından hücre içi sinyalizasyonlarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ek olarak, sağlıklı ve kanserli havayolu epitel hücrelerinin taşıdıkları biyolojik farklılıklar belirgindir, aynı koşullarda farklı yanıtlar geliştiren bu hücrelerde temel hedef ilk olarak alerjenle indüklenen havayolu inflamasyonun oluşturulmasıdır. İkincil olarak LPS'nin etkili dozunun seçimi sonrası olası tedavi ve/veya baskılayıcı etkilerin AJ ve PG-A arasındaki olası farklıların gösterilmesidir. Sonuçlara bakıldığında A549 ve HSAEC hücre serilerinin yanıtları açısından mRNA eskpresyonlarına bakıldığında dozların etkili olduğu, konsantrasyon gradiyentine bağlı farklı yanıtları

sağladığı, PG-A'nın AJ'ye göre daha etkili olduğu görülmektedir. Buradan yola çıkarak uygulama zamanları ve olası ön sonuçların değerlendirilmesi için 24 saatin yeterli olduğu görülmüş ve LPS varlığında sistemik etkinin takliti için monosit bir hücre aracılığıyla gerçek etkili yanıtların araştırılması hedeflenmiştir. Buraya kadar elde edilen ve değerlendirilen tüm kısımlar *in vivo* öncesinde *in vitronun* tamamlayıcı etkilerini belirleme hedefiyle izlenmiş ve gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşaması ve *in vitro* deneylerin son aşamasında PG-A ve AJ ile belirlenen ve indüklenen hücrelerdeki dozların seçilmesini takiben çalışmanın ko-kültür aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada A549 ve HSAEC hücre serileri tedavi etkinlikleri açısından yanıt veren ve bu yanıtın stimülasyonu için ise THP-1 monosit hücreleri indüklenerek ko-kültüre hazır hale getirilmiştir. Buraya kadar elde edilen veriler ışığında 1µg/mL LPS dozuna karar verilmiş ve ko-kültür aşamasında bu doza bağlı kalınmıştır. Bir kanser hücre serisi olan A549 bu ko-kültür modelinde alerjik inflamasyonu oluşturulamadığı veya zayıf yanıt veren grubunu temsil etmekte ve HSAEC hücre grubuna negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak ön kabul edilen A549 ko-kültür grubu literatürde ilk defa çalışılan PG-A'nın olası ve bilinmeyen etkileri belirlenene kadar çalışma grubu olarak kullanılıp, karşılaştırmalar gen ekspresyonu seviyesinde belirlenmiştir. Bu noktadan sonra ise çalışmada ise ko-kültür sisteminin negatif kontrol olarak seçilmiştir.

Alerjenle indüklenen *in vitro* ko-kültür inflamasyon modeli, süspanse bir hücre serisi olan THP-1 monosit hücrelerine, 1µg/mL olarak uygulanan indükleme konsantrasyonu, 3 ve 6 saatlik maruziyet ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, THP-1 hücrelerinin LPS ile uyarılımı sonucunda oluşan inflamatuvar sitokinlerin 3-6 saat süre sonunda meydana geldikleri belirtilmiştir (Chanput ve ark. 2014).THP-1 hücrelerine 0-30 saatlik zaman dilim aralığında uygulanan LPS maruziyeti sonucunda NF-kB yolağına dair en yüksek yanıt 3 ve 6 saatlik zaman dilimlerinde elde edilmiştir (Chanput 2010). Çalışmamızda, iki zaman diliminde de LPS maruziyeti uygulanmış THP-1 hücreleri ile A549 ve HSAEC hücre hatlarında AJ ve PG-A maddelerinin anti-inflamatuvar etkileri direkt hücre-hücre ko-kültür modeli üzerinde araştırılmıştır. Başka bir çalışmada ise insan bronş epitel hücrelerinde TLR4'ün yüzey ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (Devaney ve ark. 2003). LPS maruziyeti sonucunda ise LPS'in etki gösterme süresinin 4 saat olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark. 2004). Çalışma kapsamında en sık kullanılan süreler açısından literatürde kesinlik bulunmayıp araştırmacılar farklı

yaklaşımları benimsemiştir. Bu çalışmamızın amacı *in vivo* ile prekliniğe yaklaşmak hedeflendiği için LPS ile THP-1 hücre serisinin indüklenmesinde farklı konsantrasyonlardan ziyade iki farklı zaman dilimi ile indüksiyon sağlanmasına karar verilmiş ve etkililik bu bağlamda karşılaştırılmıştır. Ayrıca, endojen sitokinlerden ve inflamatuvar cevabın en temel sitokinlerinden biri olan TNFα'nın, LPS maruziyeti sonucunda salınımının indüklendiği gösterilmiş olup (Leister ve ark. ve 2011) çalışmanın ilk kantite tayini yapılacak sitokin olarak seçilmiştir.

A549 hücre serisinde TNFα sitokin seviyesi, 7,8 µg/mL konsantrasyonunda uygulanan PG-A ile, her iki zaman diliminde de hem kontrol grupları ile kıyaslandığında hem de diğer uygulama grupları olan 3 ve 6 saatlik LPS ile indüklenen sonuçlar açısından en düşük TNFα seviyesini sağlanmıştır. Yalnızca AJ varlığında hem AJ konsantrasyonuna hem de LPS ile indüklenen THP-1 hücrelerine karşı oluşturulan yanıtta negatif korelasyon görülmüş ve doza bağlı etkiler açısından TNFα seviyelerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada LPS ve bir tür bakteri olan *S*higella *flexneri* ile indüklenmiş kan hücreleri ile THP-1 hücre serisinin ko-kültür uygulamasında, *A. vera* jeli uygulaması ile TNFα ve IL1β sitokin seviyelerinde azalma olduğu gösterilmiştir (Habeeb ve ark. 2007). Ön formülasyonumuz olan PG-A'nın ise tüm bunların aksine TNFα açısından daha uzun süre aktive edilen THP-1 hücreleri varlığında azalan bir seyirde yanıt oluşturduğu görülmüştür. İndüklenmeye bağlı olarak TNFα'nın bu kadar farklılık göstermesi aynı şekilde herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubunda dahi gözlenebilmektedir.

Aynı grupta değerlendirilen ikinci sitokin olan IFNγ seviyeleri AJ ve PG-A konsantrasyona bağlı olarak artış göstermiş fakat aynı konsantrasyon grupları arasında AJ ve PG-A açısından negatif korelasyon gözlenmiştir. Üç saatlik maruziyette PG-A 7,8 µg/mL grubu kontrol grubuna kıyasla daha yüksek IFNγ seviyesine sahiptir. Fakat daha uzun süre LPS ile indüklenen THP-1 hücreleri varlığında konsantrasyon artışına ters oranda yalnızca PG-A gruplarında IFNγ seviyeleri artmıştır. Bu anlamda bakıldığında, AJ'nin tek başına TNFα ve IFNγ açısından ters korelasyon gösterdiği ve gruplar arasında da heterojen yanıtlara neden olduğu belirlenmiştir. PG-A'da ise TNFα seviyelerindeki azalma IFNγ açısından bakıldığında doza ve indüklenme süresine bağlı olarak değişken ve paralel olmayan yanıtlar göstermiştir. A549 hücreleri ile gerçekleştirilen ko-kültür modelinde gözlenen heterojen yanıtlar, tedavi etkinliğini gösterme anlamında alerjenle

indüklenen havayolu inflamasyon modeli oluşturulamadığını ve var olan uygulamaların yanıtsal bütünlüğünün sağlanamadığını düşündürmektedir.

Çalışmanın temel hedefi kapsamında beklenilen yanıtların asıl değerlendirileceği HSAEC hücre serisi ile oluşturulan ko-kültür modelinde AJ ve PG-A'nın uygulandığı iki konsantrasyonun 3 saatlik indüklenme ile oluşturduğu yanıta bakıldığında doz artışına göre negatif korelasyon sağladığı görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise, yalnızca PG-A 3,9 μg/mL konsantrasyonunun TNFα seviyelerini anlamlı arttırdığı ve bu artışın aynı şekilde IFNγ açısından da pozitif korele olduğu gözlenmiştir. THP1 hücrelerinin daha uzun süre indüklendiği (6saat) ko-kültür grubunda konsantrasyon artışına bağlı olarak TNFα seviyelerinin arttığı fakat kontrole göre yarı yarıya daha az miktarda olduğu belirlenmiştir. Diğer bir açıdan IFNγ seviyelerine bakıldığında kontrole göre artmış ve PG-A, AJ ile karşılaştırıldığında artış devam etmiştir. Lakin daha uzun süre indüklenme ve IFNγ ile gösterilmeye çalışılan olası tedavi edici etkinin 3,9 μg/mL konsantrasyonunda temel itibariyle AJ'ye bağlı olduğu, devamında uygulanan iki kat arttırılan dozda (7,8 μg/mL) AJ'nin IFNγ'yı baskıladığı ve net etkinin formülasyona dayalı olduğu tek koşulun; 6 saat indüklenen şartlarda 7,8 μg/mL konsantrasyonundaki PG-A uygulanması olduğu görülmüştür.

Değerlendirilen ön formülasyonun yalnızca bütüncül etkilerinin seçimi *in vivo* öncesinde kriktik bir karar aşamasını kapsamaktadır. A549 hücrelerinde elde edilen heterojen yanıtlar, modelin hava yolu inflamasyonuna özgün koşullar gerektirdiğini göstermekte ve HSAEC hücreleri ile elde edilen sonuçlarda daha uzun süreli monosit indüksiyonunun, spesifik bir konsantrasyonda daha iyi ve daha spesifik tedavi etkililiği sağlayacağına kanaat edilmiştir. Hatta, yalnızca AJ grubuna göre IFNγ'nın baskılandığı noktanın belirlenmesi ise olası tedavinin sürdürülebilirliğinin ilk aşamasını işaret etmektedir. Buradan hareketle bugüne kadar literatürde sıklıkla bildirilen üç alerjenle indüklenen havayolu inflamasyonu modelleri arasında seçim yapılmıştır (Hachet-Haas ve ark. 2008; Caceres ve ark. 2009; Gasparik ve ark. 2012). Bu çalışmalar arasında *in vivo* model açısından 8, 21 ve 23 günlük sensitizasyon ve takip eden provokasyon uygulaması ile birçok preparatların tedavi etkinliği değerlendirilmiştir (Li ve ark. 2017; Adam-Bonci ve ark. 2021; Baker ve ark. 2021). Çalışmamız kapsamında ise *in vitro* bulgular ışığında bakıldığında iki şarta gereksinim olduğu düşünülmektedir. *In vitro* süreç boyunca indüksiyon olarak ifade edilen model gelişimi, *in vivo* süreç boyunca sensitizasyon ve provokasyon anlamında kullanılacaktır. Alerjenle indüklenen hava yolu inflamasyonu

modeli açısından gerekecek ilk koşul, uzun süreli bir indüksiyon gerektiğinin yani *in vitro* aşamadaki 3 ve 6 saatlik LPS indüksiyonundan hareketle uygun zamanın seçimidir. *In vitro* aşamada elde ettiğimiz koşullara göre indüksiyon süresi kritik bir önemde ve uygulanacak konsantrasyon ise yalnızca ön formülasyonun etkisini apaçık bir şekilde ortaya koymayı sağlar nitelikte olmalıdır.

In vivo kapsamda, astım veya hava yolu inflamasyonunda rol oynayan mekanizmaları araştırmak adına birçok hayvan türü kullanılmıştır (Blume ve Davies 2013). Kemirgenlerde kendiliğinden astım, havayolu inflamasyonu veya alerji gelişmemesine rağmen, boyutlarının küçük olması, barındırma maliyetleri, kolaylıkla sensitizasyon ve provokasyon aşamalarının gerçekleştirilebilmesi gibi avantajları tercih edilmelerini sağlamaktadır (Nials ve Uddin 2008). Fare modellerinde, insanda gözlenen astım, havayolu inflamasyonunda gözlenen parametreler arasında farklılıklar olması, fare modeli seçiminin kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte Th2 yönlü immünolojik yanıt elde edildiğinden dolayı ilgili modellerde çoğunlukla BALB/c ve C57BL/6 fare türleri kullanılmaktadır. Fakat BALB/c fareler C57BL/6 farelerinden daha güçlü Th2 yönlü immünite yanıtı verdiğinden daha sık tercih edilmektedir (Boyce ve Austen 2005).

Literatürde varolan fare modelleri açısından bir karar verilmesi gerektiği durumda, model gelişimi sürecinde kullanılacak indükleyici ajanlar ve zamana bağlı parametrelerinin seçimi ikinci ve üçüncü önemli aşamalardır. Sırasıyla, ilgili modelin seçimindeki ikinci ve bir diğer önemli parametre olan OVA ve alerjenler tarafından indüklenme sürecidir. Modellerde indüklenme için gerçekleştirilen sensitizasyon ve provokasyon aşamalarında sıklıkla kullanılan bir alerjen olan OVA, insan astımında meydana gelen yüksek IgE seviyesi, hava yolu inflamasyonu ve AHR gibi astım belirtilerinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır (Zosky ve ark. 2007). Ancak hava yollarındaki inflamasyonun karakteri, farelerin akciğer hava yollarının dağılımı ve dallanmasındaki farklılıklar birebir insan astımının mimik edilmesini kısıtlayan faktörler olarak sıralanabilir.

Model seçimindeki üçüncü aşamaya baktığımızda ise 8 günlük indüksiyon (sensitizasyon ve provokasyon) uygulamasının heterojen yanıtlara yol açabileceği ihtimali ve beklenen etkinin gösterilememesi halinde preklinik aşama için yetersiz sonuçların ortaya çıkma ihtimalini düşündürmüştür. Diğer bir indüksiyon seçeneği olarak 23 günlük indüksiyonun ise intranazal uygulamalar için gerekecek tekrarlayan anestezi

ve formülasyonun, viskozitesine bağlı tekrarlanabilir uygulamaları zorlaştıracağına kanaat getirilmiştir. Bütün bunların yanı sıra, literatürde mevcut modellerde özellikle intranazal olarak uygulanan son aşamanın OVA konsantrasyonları çok farklı olup, olası astım gelişimine yol açması ve uygulama esnasında bronkokonstrüksiyona bağlı kayıplar dışlanmak istenmiştir. Bu riskli ihtimaller nedeniyle değerlendirilme aşaması sınırlı bir süre ile gerçekleştirilmiştir. 8 günlük indüksiyonun provokasyon aşamasında 400 mg/kg OVA, 23 günlük indüksiyonda ise 4 mg/kg OVA önerilmiştir (Gasparik ve ark. 2012). Fakat 21 günlük modelde intranazal olarak 0,4 mg/kg OVA uygulanması önerilmektedir ve bu öneri 21-günlük bu modelin ön plana çıkmasını sağlamıştır. Bunlar haricinde 8-günlük model önerisinde, daha az bileşik veya antikor gerektiren *in vivo* ilaç adaylarının aktivitesini hızlı bir şekilde taramak amacıyla geliştirilen bir model olduğu vurgulanmıştır (Daubeuf ve Frossard 2013). Fakat, hayvan sarfiyatının önüne geçmek ve hızlı etkililik amacıyla ön verimiz olmamasından hareketle, ön formülasyonun sonuçlarına daha net bir pencereden bakabilmek için 21 günlük modelde karar kılınmıştır.

Çalışmamızın *in vivo* kısmında Daubeuf ve ark'larının 2013 yılında BALB/c fareler gerçekleştirdikleri akut astım modelleri arasından, yukarıda bahsi geçen süreçler sonrasında -21 günlük model kullanılarak- PG-A ön formülasyonunun etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir (Daubeuf ve Frossard 2013). Bu kapsamda *ad libitum* beslenen dişi BALB/c fareler sağlıklı kontrol, pozitif (sham) grubu ve tedavi grupları olarak ayrılmıştır. Tedavi süreci üç farklı zaman diliminde (48, 96, 144 saat) sonlandırılarak, izlenen parametreler gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

21 günlük akut astım modeli uygulanan tüm grupların protokol süresi boyunca belirli zamanlarda ağırlık tartımları, yem takipleri ve kan alımları gerçekleştirilmiştir. Tedavi grubuna uygulanacak olan PG-A'nın tedavi zamanında farelere uygulanması gereken doz miktarı vücut kitle indeksine göre oluşturulmuş olan Meeh denklemi ile hesaplanmıştır (Cheung ve ark. 2009). Hayvanların ağırlıklarındaki değişikliklere göre konsantrasyon hesaplamaları güncellenmiştir. Farelerin takibi yapılan gözlemlerden olan ağırlık ölçümleri değerlendirildiğinde; sham grubunda pre-op aşamasında fare ağırlıkları model uygulaması başlangıcı ile artmıştır. Fakat farelerin ağırlıklarında tedavi süresinin bitimine kadar bir değişim olmamıştır. Tedavi grubunda ise pre-op ve post-op sürece kadar fare ağırlıklarında varolan aşamalar sürecinde (sensitizasyon, provokasyon, tedavi) azalma görülmüştür. Gerçekleştirilen bir çalışmada OVA kaynaklı hava yolu inflamasyon modeli uygulanan BALB/c farelerin OVA sensitizasyonu ve provokasyonu aşamalarında

ağırlıklarında meydana gelen azalmanın OVA'ya bağlı epididimal yağ ağırlığındaki azalma nedeniyle ortaya çıktığı belirtilmiştir (Ku ve Lin 2015). Tedavi boyunca farelerin ağırlıkları arasında bir değişim gözlenmemiştir. PG-A ile yapılan tedavi sürecinde fare ağırlıklarının değişmemesi, PG-A'nın olası bir değişime veya herhangi bir yan etkiye neden olmadığını göstermektedir. Benzer sonuçların elde edildiği bir başka çalışma olan Min ve ark. (2020)'larının gerçekleştirdikleri araştırmada piyasada preparatı da olan bir ekstrenin (*Pelargonium sidoides*) OVA indüksiyonlu astım modelinde etkisi araştırılmıştır. Preparatın fare ağırlıklarında bir değişime neden olmamasını, yan etki ve ve toksisiteye yol açmaması olarak değerlendirmişlerdir (Min ve ark. 2020). Buradan hareketle PG-A tedavisinin fare ağırlıklarındaki stabilitesi yan etkiye ve toksisiteye neden olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Farelerin yem tüketim miktarları değerlendirildiğinde; sensitizasyonun başladığı aşamadan itibaren yem tüketim miktarı azalmakta, tedavide ise değişmeksizin belli bir seviyede kalmaktadır. Bu sonucun farelerin ağırlık değişimi ile pozitif korele olduğu ve farelere uygulanan OVA/Alum indüksiyonunun bir sonucu olarak geliştiği belirlenmiştir.

In vivo takipler sürecinde izlenen bir diğer parametre, hemogram verileridir. Bu kapsamda ilgili model ile ilişkili olabilecek parametreler kırmızı kan hücresi (RBC), beyaz kan hücresi (WBC), monosit (MONO) ve lenfosit (LYM) sayılarındaki ve monosit yüzdesindeki (MONO%) değişikliklerdir. İlk olarak, farelerden alınan kan örneklerinde gruplara ve aşamalara dayalı RBC sayıları; sham grubunda pre-op aşamasından tedavi aşamasına değin azalan bir profil göstermiştir. Tedavi gruplarında ise; post-model aşamanın ardından azalma görülmüştür ve tedavi aşamasında RBC sayısında bir miktar artış istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, yalnızca 144 saatlik tedavi uygulamasında olduğu gözlenmiştir. PG-A ile uygulanan tedavinin RBC değerlerindeki artışı, daha önce literatürde bildirilen *A. vera* içeriğindeki polisakkaritlerin eritropoezi stimüle edici bir etkiye sahip olmasından kaynaklandığına işaret etmektedir (Channa ve ark.2014). Ayrıca *A. vera*'nın RBC hücre sayısında iyileştirici etkisi olduğu başka kaynaklarda da gösterilmiştir (Shokri 2017). Bu anlamda bakıldığında RBC bulgularındaki değişim model gelişimi ve tedaviye olan uyumlulukla koreledir.

İkinci olarak; sham grubuna ait WBC sayılarındaki değişimde her aşamada anlamlı bir azalma görülmüştür. Sham grubunda post-model'den tedavi aşamasına geçişteki azalma, tüm tedavi gruplarında gözlenen azalmaya kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır. Beklenildiği gibi sham grubunda tedavi olarak PBS kullanımının etkili

olmadığı belirlenmiştir. Tüm tedavi gruplarında post-model aşamadan tedaviye geçişte, WBC sayılarının anlamlı olarak azalması PG-A'nın mevcut olan inflamasyona karşı uygulanan üç ayrı zaman diliminde de (48, 96 ve 144 saat) etkili olduğunu göstermektedir.

Üçüncü olarak bakılan parametre ise monosit sayılarındaki değişimdir. OVA ile indüklenmiş alerjik astım modelinde önemli etkiler taşıdığı bilinen (Jiang ve ark. 2019) MONO sayıları ve yüzdeleri incelendiğinde PG-A ile uygulanan 48 ve 96 saatlik tedavi gruplarında, post-modele kadar ki süreçte monosit sayıları artmış olup tedavi aşamasında ise azaldığı görülmüştür. Bu durum, monosit sayısındaki artışın inflamasyonun etkisi ile meydana geldiğine ve PG-A tedavisiyle gözlenen azalmanın inflamasyonu bastırma kabiliyetine işaret eden bir bulgudur. Yapılan bir çalışmada OVA ile indüklenen fare astım modelinde, artan monosit sayısının anti-inflamatuvar etkisi ile bilinen Laktoferrin maruziyeti ile azaldığı gösterilmiştir (Lin ve ark. 2022). Bu açıdan bakıldığında PG-A ile uygulanan tedavinin anti-inflamatuvar etki sağlayabildiği ve bunun monosit sayıları ile korele olduğu düşünülmektedir.

Diğer bir hemogram verisi olan LYM sayıları değerlendirildiğinde, sham grubunda post-modele kadarki geçişte azalma olduğu fakat tedaviye geçişte ise LYM sayısında artış meydana gelmiştir. Tedavi gruplarındaki LYM sayılarında ise aşamalar arasında; pre-op'dan post-modele geçişteki azalma sham grubu ile uyumludur. Fakat tedavi süreci devam ettikçe LYM sayıları azalmaya devam etmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı azalma sadece 48 saatlik tedavi grubu olmuştur. OVA ile indüklenen besin alerjisi modeli geliştirilen BALB/c fareleri üzerinde yapılan bir çalışmada, *A.vera* jelinin artan Th2 hücre popülasyonun baskıladığı gösterilmiştir (Lee ve ark. 2018). Bu manada değerlendirildiğinde PG-A'nın bulgularının sadece LYM sayıları açısından benzerlik taşıdığı düşünülmüştür.

In vivo deneysel süreçler boyunca farelerin ağırlıkları, yem tüketim miktarları ve hemogram izlem parametreleri değerlendirilmiş ve PG-A kullanılarak uygulanan tedaviyle gelişen olası olumlu etkiler öngörülmüştür. Terapötik etkilerin asıl kantitasyonu için yapılan bir sonraki aşama ELISA yöntemiyle belirlenen OVA'ya özgü IgE, TNFα, IL6 ve PGD2 seviyeleri değerlendirilmiştir.

Bilindiği üzere, OVA indüklenmesi ile meydana gelen hava yolu inflamasyonu Th2 yönlü cevap yanıtını oluşturmaktadır. Th2 yanıtı ile sekrete edilen sitokinlerin alerjik astım fenotipine yol açtığı bildirilmiştir (Walter ve ark.2005). Oluşan hava yolu

inflamasyonu sonucunda, AHR, mukus üretimi ve serumda IgE seviyesinde artış gibi örüntüler ortaya çıkmaktadır (Holgate ve ark. 2015). Ayrıca, Th2 yanıt ile IgE sekresyonu arasında bağlantı olduğu literatürde belirtilmiştir (Oettgen ve Geha 2000). Hava yolu inflamasyonunda erken yanıtın IgE bağımlı olduğu ve IgE antikorlarının yüksek afiniteli IgE reseptörüne bağlanması sonucunda mast hücrelerinin degranülasyonunun geliştiği bildirilmiştir (Zhou 2014). Çalışmamızda ilk değerlendirdiğimiz OVA'ya özgü IgE yanıtı, OVA indüksiyonunun pre-op, post-sens, post-prov ve tedavi uygulamalarında ayrı ayrı belirlenmiştir. Bu kısımdaki sonuçlarda post-model ifadesi daha ayırıcı bir tanı gereksiniminden dolayı post-sens ve post-prov aşamalarının farkı ile analiz edilmiştir. Kantitasyon sürecinde aşamalardaki değişimler ile ilgili değişimler modeli onaylamalı fakat terapötik etkilerinde ortaya konulmasını sağlamalıdır. Başlangıçta i.p. yolla uygulanan Alum ve OVA'yı takiben ve ardından OVA ile provokasyon aşaması gerçekleştirildiğinde IgE seviyesinin arttığı ve hatta post-sens aşamasına kıyasla sekiz katlık bir artış olduğu gösterilmiştir. PG-A ile yapılan tekrarlayan tedavilerden, 48 saatlik maruziyet IgE'deki artışın devam ettiğini yani Th2 inflamasyonunun henüz baskılanamadığını göstermektedir. Tedavi süresi uzadıkça OVA'ya spesifik IgE seviyesinin düştüğü ve tüm tedavi aşamaları arasında en düşük OVA'ya özgü IgE seviyesinin 144 saatlik tedavi grubunda meydana geldiği görülmüştür. Bu anlamda yalnızca IgE değerlendirildiğinde tedavinin yarıda kesildiği düşünülmektedir. Fakat bunun tespiti için ilerleyen verilerin bu bulguyu desteklemesine ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Yardımcı T hücrelerinin varolan IgE seviyelerine bağlı olarak, alerjik hava yolu inflamasyonun belirteçlerinden biri olan TNFα seviyeleri incelenmiştir. Pre-op aşamasından post-prov aşamasına geçişte, IgE ile pozitif korele olarak TNFα seviyesinin de arttığı görülmüştür. Üç ayrı zaman diliminde gerçekleştirilen PG-A maruziyeti sonucunda TNFα seviyeleri, tedavi devam ettikçe azalma eğilimi göstermiştir. Diğer bir deyişle, altı günlük tekrarlayan PG-A maruziyeti sonucunda tedavi grubundaki TNFα seviyesinin post-prov aşamasında daha düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, post-sens ve pre-op seviyelerine halen yüksek seviyede olduğu görülmektedir. Tedavi tekrarlarının uygulanmasıyla ters orantılı olarak TNFα seviyesinin azalması, OVA/alum ile oluşturulan inflamasyonun PG-A'nın beklenen terapötik etkisinin sağlayabileceğini düşündürmektedir. Lakin altı günlük tedavi sonucunda TNFα seviyesinin pre-op seviyesine düşmemiş olması PG-A maruziyetinin daha uzun bir zaman

diliminde uygulanması ile beklenilen tedavi etkinliğini sağlayabileceğine işaret etmektedir. TNFα'nın astım patogenezine katkıda bulunduğu, alerjik inflamasyonun başlatılmasında önemli bir rolü olan pro-inflamatuvar bir sitokin olduğu bilinmektedir (Tracey ve Cerami 1994; Nakae ve ark. 2006). TNFα'nın Th1 aracılı inflamasyonda rol aldığı biliniyor olsa da, yapılan bir çalışmada Th2 tipi sitokinlerin üretimi için de gerekli olduğu ve Th2 yönlü cevaba ait hücrelerin alerjik inflamasyon bölgesine yönlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (Cohn ve ark. 1997; Artis ve ark. 1999; Iwasaki ve ark. 2003). Bu anlamda bakıldığında TNFα seviyelerinin tedaviyle azalması beklenmekte fakat pre-op seviyesine yakın bir aralıkta olması gerekliliği yoktur. Tedavi süreçlerinde sitokinlerin birden fazla hedefe, birden fazla yanıtı tetikleme özelllikleri sinerjik etkinliklerine bağlıdır. Buradan hareketle, IgE ve TNFα seviyelerinin pozitif korelasyonları belirlenmiş olup, ilgili modelin başarıyla oluşturulduğu ve özellikle PG-A'nın buna bağlı yanıtları tetikleyebildiği net bir şekilde belirlenmiştir. Buraya kadarki veriler ışığında *in vitro* ve *in vivo* sonuçlar uyumlu olmakta, *in vitro* boyunca seçilen dozun yanıt tetikleyebildiği gösterilmiş kabul edilebilmektedir. Tedavi süreçlerinin gerçekleşme kapasitesi için IgE ve TNFα ile başlayan sürecin, Th2 haricinde olası başka etkilerinin varlığı değerlendirilmiştir. Bu bağlamda IL6 seviyelerine olan etkisi pro-inflamatuvar yanıtta yalnızca Th2 değil, NFκB yolağınında hem modelin gelişmesi hem de tedavi yanıtlarının incelenmesinde etkili olduğu düşünülmüştür. Oluşturulan alerjenle indüklenen havayolu inflamasyonu modelinde bu etkilerin gözlenmesi şaşırtıcı olmamakla birlikte, tedavide söz sahibi yolağın sınırlarının çizilmesini zorlaştırmıştır. Yardımcı T hücrelerinin indüklenmesi ve tedavi yönündeki değişimleri, ilave olarak IL6 ile belirlenen değişimler tedavi hedeflerinin spesifitesinde özgün bir aracının belirlenmesini zorlaştırmıştır. Bunun aşılması amacıyla ilk olarak, PGD2 seviyelerini kantite etmek, BALF ile değişimin karşılaştırılması ve histolojik bulguların değerlendirilmesi yönünde bir tercih yapılmıştır. Bilindiği üzere, alerjene spesifik IgE'nin artışı ile mast hücreleri nanomolar aralıkta da olsa yüksek seviyede lokal PGD2 üretirler (Lewis ve ark. 1982). Bu bilgiye dayanarak, elde edilen PGD2 seviyelerinde 144 saatlik tedavi grubunda hem pre-op hemde post-prov aşamasına göre azalan bir örüntü sergilediği belirlenmiştir. PG-A ile tedaviye bir yanıt gözlendiği, bu yanıtlar içerisinde IgE ve TNFα seviyelerindeki azalmaya benzer PGD2 nin hem pre-op'a göre hemde post-prov'a göre anlamlı azalması prostanoid sentez yolağıyla ilişkili olabileceğini kanıtlar niteliktedir (Subhashini ve ark. 2016). Araşidonik asit metabolizmasından üretilen lipid mediyatörleri olan PG'ler çeşitli hücre tiplerinde

bulunmakta ve bulundukları hücrelerin yüzeyinde parakrin veya otokrin sinyalizasyon yoluyla aktive edilmektedirler (Korbecki ve ark. 2014; Debeuf ve Lambrecht 2018). PG'ler bağışıklık sisteminde görevli hücreler arasında köprü alışverişi rolünü üstlenmektedir. Pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde önemli görevleri bulunmaktadır. Hava yolu inflamasyonu oluşum mekanizmasında PG'lerden üretilen PGD2, eozinofillerin, fibroblastların, düz kas hücrelerinin ve Th2 hücrelerinin aktivasyonunda görev almaktadır (Komi ve Bjermer 2019). Bu nedenle alerjik kökene sahip hastalıkların biyokimyasal mekanizmalarını aydınlatmak adına gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda PG'ler hava inflamasyonu belirteçleri olarak araştırılmaktadır. Beklenen yanıtın, PDG2'nin bir kemoatraktan ve Th2 hücrelerini aktive edici özelliklerini baskılayıcı etkileri olabileceğini, fakat artan IL6 seviyeleri ile elde edilen sonuçların havayolu inflamasyonu ile sınırlı olabileceği gibi PDG2 üzerinden etkileyen bir terapötik etkinin ön plana çıktığını göstermektedir. Bazı modeller ve bazı tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesinde sistemik etkilerden ziyade lokal etkilerin ayrıca değerlendirilmesi gerekmektedir. Bunlar arasında en çok lokal etkinin değerlendirilme gereksinimi havayolu ile ilişkili hastalık gruplarıdır. Çalışma kapsamında seçilen model havayolu inflamasyon modelidir. Lokal etkilerin değerlendirilmesi ise literatürde de sıklıkla tercih edilen BALF örneklerinde mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesidir (Ku ve ark. 2015). Bu çalışmada da beklenen lokal etkilerin değerlendirilmesi için yalnızca kandan belirli sitokin seviyelerinin belirlenmesi yeterli olmamıştır. Tedaviye giden süreçle bazı işaretler ve bazı yolakların değişimi ön görülse dahi, lokal etkilerin daha kesinleştirici sonuç ifadesini sağlayacağı düşünülmüştür. Buradan hareketle BALF örneklerinde TNFα, IL5, IL6 ve IL1β seviyeleri mRNA ekspresyonu açısından karşılaştırılmıştır.

İlk olarak TNFα mRNA seviyeleri değerlendirildiğinde, OVA/Alum indüksiyonu uygulanan post-prov aşamasında ekspresyonu kontrole göre artmıştır. Sham grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında, her üç zaman diliminde PG-A uygulanan tedavi gruplarının TNFα mRNA eksprsyon seviyesi sham grubuna kıyasla azalmıştır. Tedavi grupları kendi içerisinde PG-A uygulama süresi artışına korele olmayan mRNA cevabı alınmıştır. İki kere PG-A ile uygulanan 48s tedavi grubundan 96s tedavi grubuna geçişte TNFα mRNA ekspresyon seviyesi azalmış olmasına rağmen 144s tedavi grubuna geçişte ekspresyon seviyesi artmıştır. Fakat 144s tedavi grubunda olan bu artan mRNA ekspresyon seviyesi sham grubuna kıyasla düşük bir seviyeye sahiptir. PG-A ile tedavi

etkisinin gen düzeyinde 96s tedavi grubuna değin etkili olduğu fakat 6 günlük PG-A uygulanan 144s tedavinin diğer tedavi gruplarına kıyasla TNFα mRNA ekspresyonunu baskılayamadığı gösterilmiştir. İkinci olarak değerlendirilen IL6 mRNA ekspresyon seviyeleri pre-op aşamasından post-prov aşamasına geçişte azalmıştır. Pre-op grubuna kıyasla sham grubunda IL6 mRNA ekspresyon seviyesi artmıştır. Tüm tedavi gruplarına elde edilen IL6 mRNA ekspresyon seviyesi sham ve pre-op gruplarına kıyasla azalmıştır. Pro-inflamatuvar sitokinlerinden olan IL6, PG-A uygulanan tedavinin etkisiyle azalmıştır.

Bilindiği üzere, eozinofilik granülositlerin birikiminin, astım gibi hava yolu aşırı duyarlılık reaksiyonlarında mukus üretimi ve havayolu yeniden yapılanmasını sağladığı böylelikle alerjik inflamasyonda ayırt edici bir rol aldığı bildirilmiştir (Possa ve ark. 2013). Aktive olmuş eozinofiller çeşitli sitotoksik proteinler ve IL4, IL5, IL10 ve IL13 gibi Th2 tipi inflamasyonunu yönlendiren birçok pro-inflamatuar sitokinleri salgılarlar (Hamid ve Tulic 2009; Renz ve ark. 2021). Bunlar arasında bu çalışma kapsamında BALF örneklerinde ayırıcı bir belirteç olarak TNFα ve IL6 haricinde IL5 miktarıda değerlendirilmiştir. Th2 hücrelerinden salınan IL5 mRNA ekspresyon seviyesi pre-op aşamasından post-prov aşamasına geçişte beklendiği gibi artmıştır. Yine beklenilen bir cevap olarak sham grubunda IL5 mRNA ekspresyon seviyesi en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Tedavi gruplarında PG-A'nın uygulama süresinin artışına negatif korele olarak azalmıştır. Bu da, PG-A ile uygulanan tedavinin Th2 yönlü inflamasyona karşı anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Yine bir pro-inflamatuvar sitokinlerden olan IL1β mRNA seviyesi, pre-op aşamasından post-prov aşamasına geçişte azalmıştır. Tedavi gruplarında elde edilmiş olan IL1β mRNA ekspresyon seviyeleri sham grubuna kıyasla azalmıştır. Tedavi gruplarında elde edilmiş olan IL1β ekspresyon cevaplarının TNFα ve IL6 sitokin ekspresyon cevapları ile pozitif korele olduğu görülmektedir. BALF mRNA ekspresyon profillerindeki değişim, histolojik anlamda akciğer dokularındaki değişiklikler birlikte gözden geçirilmiştir. Yapılan incelemelerde akciğer dokuları ilk olarak sağlıklı kontrol grubunda incelenmiş ve beklenildiği gibi alveolar, bronş ve bronşiyollerin özgün yapıları gösterilmiştir. Sham grubunda ise alerjenle indüklenen hava yolu inflamasyonu modeli oluşturulmuş ve PBS ile i.n. ile tedavi gruplarındaki gibi verilmiştir. Akciğer dokuları incelendiğinde bronş ve bronşiyol duvarın epitelinde dejenerasyona bağlı epitel hücreleri ve hücre artıkları gözlenmiştir. Akciğer boyunca hemoraji, dejenere hücre grupları görülmüş olup damar çevresinde

inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlanmıştır. İntraalveolar septum noktasında kalınlaşma, bağ dokusunda hemoraji ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu meydana gelmiştir. İntranazal ve inhale yol ile uygulanan OVA sonucunda karşılaştırılan bir çalışmada, intranasal OVA uygulaması gerçekleştirilen grupta bronşiyal bölgelerde inflamasyon varlığı gösterilmiştir (Kim ve ark. 2019). Diğer bir i.n. ile verilen OVA uygulamasında, BALB/c farelerin hava yollarındaki düz kaslarda kalınlaşma olduğu histolojik veriler içerisinde sunulmuştur (Akkoç ve ark. 2018). Bu anlamda bakıldığında bulgularımız diğer sham grubu kullanan çalışmalarla uyumludur.

PG-A ile uygulanan tedavi gruplarında ise zamana bağlı değişimler takip edilmiştir, ilk olarak 48 saat olarak ifade edilen i.n. iki PG-A uygulaması sonucunda sham grubundaki bir kısım değişiklikler gözlenmiş olup; bronşlarda çok sayıda epitel hücresi ve hücre artıkları belirlenmiştir. Ayrıca bazı bronşiyollerin neredeyse tamamen kapalı olduğu gösterilmiştir. Bu anlamda iki tedavi uygulamasının yeterli olmadığı sonucuna kanaat getirilmiştir. Farelerde aynı zamanda lokal etkiler bazında TNFα, IL5, IL6, IL1β mRNA seviyelerinin azalmaya başladığı, ek olarak serumda ölçülen OVA'ya özgü IgE, TNFα seviyelerinin halen yüksek seyrettiği, fakat tedavinin sinerjik sitokin seviyelerinin etkisiyle indüklenmesi için gereken yeterli IL6 seviyesinde yükselme görülmediği belirlenmiştir. Bunun sonucunda PDG2 seviyesi de post-prov sonrası yükselmeye devam etmiştir. Beraberinde takip edilmiş olan hemogram parametrelerine bakıldığında 48 saat monosit seviyelerinin sham grubuna göre artmaya başladığı, lenfosit sayılarına göre en düşük olduğu noktadır. Buradan elde edilen tedavinin gerçekleşmediği, inflamasyonun hem lokal hemde sistemik etkilerinin zorlaştığı ve PG-A'nın bir etkinlik gösteremediği belirlenmiştir.

Tekrarlayan tedavi uygulamasının dört defa uygulandığı grupta ise, histolojik anlamda sağlıklı görünen bronşiyal alanlara rastlanmıştır. Bir kısım epitel dejenerasyonuna bağlı interalveoler septumda kalınlaşma, alveol lümeninde kapanma, küçük hemoraji alanları gözlense de sham ve 48 saate göre patolojik değişimlerde belirgin azalmalar gözlenmiştir. Tedavi uygulamasının lokal etkileri birlikte değerlendirdiğimizde BALF örneklerindeki TNFα, IL6 ve IL1β mRNA ekspresyon seviyeleri azalmıştır. IL5 seviyesi ise sham ve 48 saate göre daha azdır. Sistemik etkiler açısından ise PDG2, TNFα ve OVA'ya özgü IgE seviyelerinin azalmaya başladığı görülmüştür. Ayrıca IL6 seviyeleri artmaya devam etmektedir ve post-sens seviyesine yakın bir oranda olduğu görülmektedir. Lokal etkilerin sistemik yansımaları istatistiksel anlamda daha

gözlenebilir bir noktadadır ve eş zamanlı takibi yapılan hemogram bulgularından monosit ve lenfosit sayılarının da artmaya başladığı belirlenmiştir. PG-A'nın tekrarlayan uygulamalarıyla elde edilen buraya kadarki verilerle tedaviye yanıt alındığı ve bir iyileşme potansiyelini yakalamak için tekrarlayan uygulamalara gereksinim olduğu düşünülmüştür. Buradan hareketle 144 saatlik uygulama olarak ifade edilen ve 6 tekrarlı i.n. PG-A maruziyeti sonucunda; diğer tüm zamanlara kıyasla yer yer epitel dejenerasyonu, interalveoler septumda kalınlaşma, alveol lümeninde kapanma gözlense de, patolojik bulgularda anlamlı azalmalar olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular BALF'ta gözlenen TNFα ve IL1β 'nin 96 saate göre artsa dahi pre-op'a ve sham grubuna göre düşük kaldığı, IL5 seviyelerinin ise en düşük seviyeye ulaştığı görülmektedir. Lokal etkilerin, sistemik anlamda PDG2 seviyelerinde belirgin olarak gösterilen 144 saatteki anlamlı azalmasının ise BALF IL6 mRNA ekspresyon seviyelerindeki anlamlı etkilerle gerçekleştiğini göstermektedir. Aynı durum serumdaki IL6 seviyelerindeki artışla da pozitif koreledir. OVA'ya özgü IgE ve TNFα'nın serumdaki azalması da iyileşmenin hem devam ettiği hem de tedavinin tamamlanma noktasına yaklaşıldığını kanıtlar niteliktedir. Bu bilgilerin ilk öngörüldüğü kısım yine hemogram verilerine bakıldığında artan lenfosit oranıyla kısıtlı da olsa anlaşılmaktadır. Fakat eş zamanlı olarak bir miktar artan monosit sayısının, inflamasyonun da halen mevcut olduğunu göstermekte, histolojik olarak da yer yer belirlenen kısmi dejenere alanların varlığıyla kendini göstermektedir. İyileşmenin sürdürülebilirliği halen Th2 yönünde olsa da, PDG2'de belirlenen azalma kemoatraktan ve Th2 hücrelerini aktive edici özelliklerini baskılanabileceğine işaret etmektedir.

Çalışma kapsamında sınırlı sayıda değişkenle, PG-A'nin ilgili modeldeki etkilerine bakılması bir kısıtlılık olsa dahi histolojik bulguların zamana bağlı iyileşme örüntülerinin lokal, sistemik etkiler anlamında desteklenmesi ve bütün bu bulguların *in vitro*'da öngörülerek seçilen dozla uyumlu oluşu, PG-A'nın tedavi etme kapasitesini öne çıkarmaktadır. *A. vera*'nın i.n. uygulamaları kapsamında literatürde bildiğimiz kadarıyla alerjenle indüklenen havayolu inflamasyonu açsından henüz bir çalışma gerçekleştirilmemiştir (Bulut ve ark. 2022). Bir başka çalışmada ise farelerdeki akut astım modelinde post-prov'un etkisinin birkaç hafta içerisinde azaldığı ortaya koyulmuştur (McMillan ve Lloyd 2004). Varolan bu modeller karşılaştırıldığında, bu çalışma kapsamında tercih edilen alerjenle indüklenen hava yolu inflamasyonu açısından bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Ön formülasyonu hazırlanmış olan PG-A'nın ise i.n.

uygulamalar için *A. vera* lokal etkilerinin, hava yolu ile sınırlamaya uygunluğu da ayrıca değerlendirilmiştir.

Doğadaki terapötik etkili birçok preparat düşünüldüğünde *A.vera*'nın bilinen anti-inflamatuvar (Duansak ve ark. 2003), anti-diyabetik (Misawa ve ark. 2012), antifungal (Sitara ve ark. 2011), antioksidan (El-Shemy ve ark. 2010), anti-hepatoksik (Salama ve ark. 2016), antikanser (Lee ve ark. 2001), kardiyoprotektif (Ji ve ark. 2018), osteoprotektif (Madhyastha ve ark. 2019) gibi bütün iyileştirici etkileri düşünüldüğünde, PG-A bu ön formülasyonu ile i.n. uygulanması sonucunda elde ettiğimiz bulgular şaşırtıcı değildir. *A.vera* viskozitesinin uygulama yöntemlerine olan kısıtlayıcı etkisi önerilen bu ön formülasyonla, uygulama kolaylığı açısından daha etkili bir hale dönüştürülmesi sağlanmıştır. Varolan ön formülasyonun buraya kadar belirlenen etkileri, preklinik çalışmalara güçlü bir başlangıç noktası sağlayabileceğini göstermektedir. Daha fazla parametrenin değerlendirilmesi ve önerilen prostanoid sentez mekanizmasına işaret eden bulguların daha detaylı araştırılması ve yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Adam-Bonci, T. I., Bonci, E. A., Pârvu, A. E., Herdean, A. I., Moţ, A., Taulescu, M. ve ark. (2021). Vitamin D Supplementation: Oxidative Stress Modulation in a Mouse Model of Ovalbumin-Induced Acute Asthmatic Airway Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, ***22***, 7089.

Akaberi, M., Sobhani, Z., Javadi, B., Sahebkar, A., Emami S., 2016.Therapeutic effects of Aloe spp. in traditional and modern medicine: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **84**, 759-772.

Akev, N., Can, A., Sütlüpınar, N., Çandöken, E., Özsoy, N., Özden, T.Y., Yanardag, R., Üzen, E., 2015. Twenty years of research on *Aloe vera*. *Istanbul Journal of Pharmacy* (Formerly: Journal of the Faculty of Pharmacy Istanbul University), **45**, 191-215.

Akgün, J., Schabussova, I., Schwarzer, M., Kozakova, H., Kundi, M. ve Wiedermann, U. (2015). The Role of Alveolar Epithelial Type II-Like Cells in Uptake of Structurally Different Antigens and in Polarisation of Local Immune Responses. *PloS one*, **10**, e0124777.

Akkoç, T., Genç, D., Zibandeh, N. ve Akkoç, T. (2018). Intranasal ovalbumin immunotherapy with mycobacterial adjuvant promotes regulatory T cell accumulation in lung tissues. *Microbiology and immunology*, **62**, 531–540.

Akuthota, P., Wang, H. B., Spencer, L. A., & Weller, P. F. (2008). Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **38**, 1254–1263.

Añibarro-Ortega, M., Pinela, J., Barros, L., Ćiric, A., Silva, S.P., Coelho, E., ve ark., 2019. *Antioxidants,***8**, 444.

Artis, D., Humphreys, N. E., Bancroft, A. J., Rothwell, N. J., Potten, C. S. ve Grencis, R. K. (1999). Tumor necrosis factor alpha is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. *The Journal of Experimental Medicine*, **190**, 953–962.

Astım Tanı ve Tedavi Rehberi. (2020). Türkiye Ulusal Alerji ve Klinik İmmünoloji Derneği, https://www.aid.org.tr/

Athari S. S. (2019). Targeting cell signaling in allergic asthma. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **4**, 45.

Atiba, A., Wasfy, T., Abdo, W., Ghoneim, A., Kamal, T., Shukry, M. (2015). *Aloe vera* gel facilitates re-epithelialization of corneal alkali burn in normal and diabetic rats. *Clinical Ophthalmology*, **9**, 2019–2026.

Baker, J. R., Jr, Rasky, A. J., Landers, J. J., Janczak, K. W., Totten, T. D., Lukacs, N. W. ve ark. (2021). Intranasal delivery of allergen in a nanoemulsion adjuvant inhibits allergen-specific reactions in mouse models of allergic airway disease. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **51**, 1361–1373.

Barnes P. J. (2011). Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological Reviews*, **242**, 31–50.

Beamer, C. A., Girtsman, T. A., Seaver, B. P., Finsaas, K. J., Migliaccio, C. T., Perry ve ark. (2013). IL-33 mediates multi-walled carbon nanotube (MWCNT)-induced airway hyper-reactivity via the mobilization of innate helper cells in the lung. *Nanotoxicology*, **7**, 1070–1081.

Beasley, R., Roche, W. R., Roberts, J. A., Holgate, S. T. (1989). Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *The American Review of Respiratory Disease*, **139**, 806–817.

Bentley, A. M., Menz, G., Storz, C., Robinson, D. S., Bradley, B., Jeffery, P. K. Ve ark. (1992). Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *The American Review of Respiratory Disease*, **146**, 500–506.

Blume, C. ve Davies, D. E. (2013). In vitro and ex vivo models of human asthma. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, **84**, 394–400.

Boguniewicz, M., Martin, R. J., Martin, D., Gibson, U., Celniker, A., Williams, M., & Leung, D. Y. (1995). The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **95**, 133–135.

Bontinck, A., Maes, T. ve Joos, G. (2020). Asthma and air pollution: recent insights in pathogenesis and clinical implications. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, **26**, 10–19.

Bousquet, J., Jeffery, P. K., Busse, W. W., Johnson, M., Vignola, A. M. (2000). Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **161**, 1720–1745.

Boyce, J. A. ve Austen, K. F. (2005). No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models. *The Journal of Experimental Medicine*, **201**, 1869–1873.

Brewer, J. M., Conacher, M., Hunter, C. A., Mohrs, M., Brombacher, F. Ve Alexander, J. (1999). Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *Journal of Immunology*, **163**, 6448–6454.

Bulut T, F., Cumbul, A. ve Türksever Tetiker, A. (2022). *Aloe vera*'nın Rinitis Medikamentoza'da Nazal Mukoza Üzerine Etkisi: Deneysel Çalışma. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **48**, 71-76.

Caceres, A. I., Brackmann, M., Elia, M. D., Bessac, B. F., del Camino, D., D'Amours, M. ve ark. (2009). A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 9099–9104.

Carter, P., Rahman, S. M., ve Bhattarai, N. (2016). Facile Fabrication of *Aloe vera* Containing PCL Nanofibers for Barrier Membrane Application. *Journal of Biomaterials Science*, 27, 692–708.

Castro, M., Mathur, S., Hargreave, F., Boulet, L. P., Xie, F., Young, J. ve ark. (2011). Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: a randomized, placebo-controlled study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **184**, 1125–1132.

Celebi Sözener, Z., Cevhertas, L., Nadeau, K., Akdis, M., Akdis, C. A. (2020). Environmental factors in epithelial barrier dysfunction. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **145**, 1517–1528.

Channa, A. A., Qazi, I. H., Soomro, S. A., Shah, A. H., Gandahi, J. A., Korejo, R. A. ve ark. (2014). Effect of oral supplementation of *Aloe vera* extract on haematology indices and immune cells of blood in rabbit. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, ***8***, 497-501.

Chanput, W., Mes, J. J. ve Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, **23**, 37–45.

Chen, Q., Li, K. T., Tian, S., Yu, T. H., Yu, L. H., Lin, H. D. Ve ark. (2018). Photodynamic Therapy Mediated by Aloe-Emodin Inhibited Angiogenesis and Cell Metastasis Through Activating MAPK Signaling Pathway on HUVECs. *Technology in Cancer Research & Treatment*, **17**, 1-11.

Cheung, M. C., Spalding, P. B., Gutierrez, J. C., Balkan, W., Namias, N., Koniaris ve ark. (2009). Body surface area prediction in normal, hypermuscular, and obese mice. *The Journal of Surgical Research*, **153**, 326–331.

Chithra, P., Sajithlal, G.B. ve Chandrakasan, G. (1998). Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **59**, 179–186.

Choche, T., Shende, S., Kadu, P., 2014. Extraction and identification of bioactive components from Aloe barbadensis Miller. Research and Reviews: *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **2**, 14-23.

Cohn, L., Elias, J. A. ve Chupp, G. L. (2004). Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annual Review of Immunology*, **22**, 789–815.

Cohn, L., Homer, R. J., Marinov, A., Rankin, J. ve Bottomly, K. (1997). Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *The Journal of Experimental Medicine*, **186**, 1737–1747.

Daubeuf, F. ve Frossard, N. (2012). Performing Bronchoalveolar Lavage in the Mouse. *Current Protocols in Mouse Biology*, **2**, 167–175.

Daubeuf, F. ve Frossard, N. (2013). Acute Asthma Models to Ovalbumin in the Mouse. *Current Protocols in Mouse Biology*, **3**, 31–37.

Debeuf, N. ve Lambrecht, B. N. (2018). Eicosanoid Control Over Antigen Presenting Cells in Asthma. *Frontiers in Immunology*, **9**, 2006.

Devaney, J. M., Greene, C. M., Taggart, C. C., Carroll, T. P., O'Neill, S. J. ve McElvaney, N. G. (2003). Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS letters*, **544**, 129–132.

Duansak, D., Somboonwong, J. ve Patumraj, S. (2003). Effects of *Aloe vera* on leukocyte adhesion and TNF-alpha and IL-6 levels in burn wounded rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **29**, 239–246.

El-Shemy, H. A., Aboul-Soud, M. A., Nassr-Allah, A. A., Aboul-Enein, K. M., Kabash, A. ve Yagi, A. (2010). Antitumor properties and modulation of antioxidant enzymes' activity by *Aloe vera* leaf active principles isolated via supercritical carbon dioxide extraction. *Current Medicinal Chemistry*, **17**, 129–138.

Elieh Ali Komi, D. ve Bjermer, L. (2019). Mast Cell-Mediated Orchestration of the Immune Responses in Human Allergic Asthma: Current Insights. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, **56**, 234–247.

EMA (2017, Ekim). Propylene glycol used as an excipient October 2017.EMA

Erdem Kuruca S., Çandöken E., Akev N.,(2020). Investigation of aloe-emodin and *Aloe vera* Gel Extract on apoptosis dependent pathways in leukemia and lymphoma cell lines. *İstanbul Journal of Pharmacy*, **50**, 1-7.

Fallahi H.R., Hamadzade H., Nezhad A.M., Zandian D., Taghizadeh M. (2016). Effect of *Aloe vera* Mouthwash on Postoperative Complications After İmpacted Third Molar Surgery: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, **28**, 392-396.

Felton, J. M., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Dransfield, I. (2014). Eosinophils in the lung - modulating apoptosis and efferocytosis in airway inflammation. *Frontiers in Immunology*, **5**, 302.

Feng, Y., Qiao, H., Liu, H., Wang, J. ve Tang, H. (2023). Exploration of the mechanism of aloin ameliorates of combined allergic rhinitis and asthma syndrome based on network pharmacology and experimental validation. *Frontiers in Pharmacology*, **14**, 1218030.

Finotto, S., Neurath, M. F., Glickman, J. N., Qin, S., Lehr, H. A., Green ve ark. (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*, **295**, 336–338.

Fonseca, W., Rasky, A. J., Ptaschinski, C., Morris, S. H., Best, S. K. K., Phillips, M. Ve ark. (2019). Group 2 innate lymphoid cells (ILC2) are regulated by stem cell factor during chronic asthmatic disease. *Mucosal Immunology*, **12**, 445–456.

Garcia-Orue, I., Gainza, G., Gutierrez, F. B., Aguirre, J. J., Evora, C., Pedraz, J. L. ve ark. (2017). Novel nanofibrous dressings containing rhEGF and for wound healing applications. *International Journal of Pharmaceutics*, **523**, 556–566.

Gasparik, V., Daubeuf, F., Hachet-Haas, M., Rohmer, F., Gizzi, P., Haiech, J. ve ark. (2011). Prodrugs of a CXC Chemokine-12 (CXCL12) Neutraligand Prevent Inflammatory Reactions in an Asthma Model in Vivo. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **3**, 10–14.

GINA (2023). The *Global Strategy for Asthma Management and Prevention, https://ginasthma.org/reports/*

Gour, N., Smole, U., Yong, H. M., Lewkowich, I. P., Yao, N., Singh, A. ve ark. (2018). C3a is required for ILC2 function in allergic airway inflammation. *Mucosal Immunology*, **11**, 1653–1662.

Grandel, U., Heygster, D., Sibelius, U., Fink, L., Sigel, S., Seeger, W. Ve ark. (2009). Amplification of lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis in non-small cell lung cancer/neutrophil cocultures. *Molecular Cancer Research: MCR*, **7**, 1729–1735.

Habeeb, F., Stables, G., Bradbury, F., Nong, S., Cameron, P., Plevin, R. ve Ferro, V. A. (2007). The inner gel component of *Aloe vera* suppresses bacterial-induced pro-inflammatory cytokines from human immune cells. *Methods*, **42**, 388–393.

Hachet-Haas, M., Balabanian, K., Rohmer, F., Pons, F., Franchet, C., Lecat, S., ve ark. (2008). Small neutralizing molecules to inhibit actions of the chemokine CXCL12. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 23189–23199.

Haldar, P., Brightling, C. E., Hargadon, B., Gupta, S., Monteiro, W., Sousa, A. ve ark. (2009). Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *The New England Journal of Medicine*, **360**, 973–984.

Hamid, Q. ve Tulic, M. (2009). Immunobiology of asthma. *Annual Review of Physiology*, **71**, 489–507.

Hammad, H. ve Lambrecht, B. N. (2021). The basic immunology of asthma. *Cell*, **184**, 1469–1485.

Heggers JP, Pelley RP, Robson MC. 1993. Beneficial effects of Aloe in wound healing. *Phytotherapy Research*, **7**, S48–S52.

Heggers, J.P., Kucukcelebi, A., Stabenau, C.J., Ko, F., Broemeling, L.D., Robson, M.C., Winters, W.D. (1995). Wound healing effects of Aloe gel and other topical antibacterial agents on rat skin. *Phytotherapy Research*, **9**, 455–457.

Hekmatpou, D., Mehrabi, F., Rahzani, K., Aminiyan, A. (2018). The effect of *Aloe vera* Gel on Prevention of Pressure Ulcers in Patients Hospitalized in the Orthopedic Wards: A Randomized Triple-Blind Clinical Trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **18**, 264.

Hirose, K., Iwata, A., Tamachi, T., Nakajima, H. (2017). Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. *Immunological Reviews*, **278**, 145–161.

Holgate S. T. (2010). A brief history of asthma and its mechanisms to modern concepts of disease pathogenesis. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, **2**, 165–171.

Holgate, S. T. ve Davies, D. E. (2009). Rethinking the pathogenesis of asthma. *Immunity*, **31**, 362–367.

Holgate, S. T., Wenzel, S., Postma, D. S., Weiss, S. T., Renz, H. ve Sly, P. D. (2015). Asthma. *Nature Reviews. Disease primers*, **1**, 15025.

Humbles, A. A., Lloyd, C. M., McMillan, S. J., Friend, D. S., Xanthou, G., McKenna ve ark. (2004). A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science*, **305**, 1776–1779.

Hussain, A., Sharma, C., Khan, S., Shah, K., Haque, S. (2015). *Aloe vera* Inhibits Proliferation of Human Breast and Cervical Cancer Cells and Acts Synergistically with Cisplatin. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **16**, 2939–2946.

Ibeagha-Awemu, E. M., Lee, J. W., Ibeagha, A. E., Bannerman, D. D., Paape, M. J. ve Zhao, X. (2008). Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary research*, **39**, 11.

Imanishi, K. (1993). Aloctin A, an active substance of Aloe arborescens Miller as an immunomodulator. *Phytotherapy Research*, **7**, S20–S22.

Iwasaki, M., Saito, K., Takemura, M., Sekikawa, K., Fujii, H., Yamada, Y., Wada, H., Mizuta, K., Seishima, M., & Ito, Y. (2003). TNF-alpha contributes to the development of allergic rhinitis in mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **112**, 134–140.

Ji, H., Liu, Y., He, F., An, R. ve Du, Z. (2018). LC-MS based urinary metabolomics study of the intervention effect of aloe-emodin on hyperlipidemia rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **156**, 104–115.

Ji, H., Liu, Y., He, F., An, R., Du, Z. (2018). LC-MS based urinary metabolomics study of the intervention effect of aloe-emodin on hyperlipidemia rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **156**, 104–115.

Jiang, S., Wang, Q., Wang, Y., Song, X. ve Zhang, Y. (2019). Blockade of CCL2/CCR2 signaling pathway prevents inflammatory monocyte recruitment and attenuates OVA-Induced allergic asthma in mice. *Immunology letters*, **214**, 30–36.

Keuper, M., Dzyakanchuk, A., Amrein, K. E., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P. (2011). THP-1 Macrophages and SGBS Adipocytes - A New Human in vitro Model System of Inflamed Adipose Tissue. *Frontiers in Endocrinology*, **2**, 89.

Khan, A. W., Kotta, S., Ansari, S. H., Sharma, R. K., Kumar, A., Ali, J. (2013). Formulation Development, Optimization and Evaluation of *Aloe vera* Gel for Wound Healing. *Pharmacognosy Magazine*, **9**, S6–S10.

Kim, D. I., Song, M. K. ve Lee, K. (2019). Comparison of asthma phenotypes in OVA-induced mice challenged via inhaled and intranasal routes. *BMC Pulmonary Medicine*, ***19***, 241.

Ko, F. W. S. ve Salvi, S. (2023). Minimize systemic oral corticosteroids use and reduce harm for patients with asthma. *Respirology*, **28**, 694–695.

Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I. ve Chlubek, D. (2014). Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochimica Polonica*, **61**, 639–649.

Ku, C. M. ve Lin, J. Y. (2015). Farnesol, a sesquiterpene alcohol in herbal plants, exerts anti-inflammatory and antiallergic effects on ovalbumin-sensitized and -challenged asthmatic mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*: eCAM, 387357.

Kumar, R. K., Herbert, C. ve Foster, P. S. (2008). The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Current Drug Targets*, **9**, 485–494.

Kurt, E., Metintas, S., Basyigit, I., Bulut, I., Coskun, E., Dabak ve ark. PARFAIT Study of the Turkish Thoracic Society Asthma and Allergy Working Group (2009). Prevalence and Risk Factors of Allergies in Turkey (PARFAIT): results of a multicentre cross-sectional study in adults. *The European Respiratory Journal*, **33**, 724–733.

Lambrecht, B. N. ve Hammad, H. (2015). The immunology of asthma. *Nature Immunology*, **16**, 45–56.

Lambrecht, B. N., Hammad, H. ve Fahy, J. V. (2019). The Cytokines of Asthma. *Immunity*, **50**, 975–991.

Larché M., Robinson S. D. ve A. Barry Kay B. A. (2003). Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **111**, 450-463.

Lee, D., Kim, H. S., Shin, E., Do, S. G., Lee, C. K., Kim, Y. M. ve ark. (2018). Polysaccharide isolated from *Aloe vera* gel suppresses ovalbumin-induced food allergy through inhibition of Th2 immunity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie,* **101**, 201–210.

Lee, H. Z., Hsu, S. L., Liu, M. C. ve Wu, C. H. (2001). Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *European Journal of Pharmacology*, **431**, 287–295.

Lee, J. H., Del Sorbo, L., Uhlig, S., Porro, G. A., Whitehead, T., Voglis, S. ve ark. (2004). Intercellular adhesion molecule-1 mediates cellular cross-talk between parenchymal and immune cells after lipopolysaccharide neutralization. *Journal of Immunology*, **172**, 608–616.

Lee, J. J., Dimina, D., Macias, M. P., Ochkur, S. I., McGarry, M. P., O'Neill, K. R. Ve ark. (2004). Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science*, **305**, 1773–1776.

Lee, S.K. (Ed.). (2006). New Perspectives on Aloe. New York, NY: Springer

Leister, K. P., Huang, R., Goodwin, B. L., Chen, A., Austin, C. P., ve Xia, M. (2011). Two High Throughput Screen Assays for Measurement of TNF-α in THP-1 Cells. *Current Chemical Genomics*, **5**, 21–29.

Leng, H., Pu, L., Xu, L., Shi, X., Ji, J., Chen, K. (2018). Effects of aloe polysaccharide, a polysaccharide extracted from *Aloe vera*, on TNF-α-induced HaCaT cell proliferation and the underlying mechanism in psoriasis. *Molecular Medicine Reports*, **18**, 3537–3543.

Lewis, R. A., Soter, N. A., Diamond, P. T., Austen, K. F., Oates, J. A., Roberts, L. J. ve ark. (1982). Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *Journal of Immunology, **129***, 1627–1631.

Li, J., Qin, Y., Chen, Y., Zhao, P., Liu, X., Dong, H. Ve ark. (2020). Mechanisms of the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in alveolar epithelial cell/macrophage co-culture. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **20**, 76.

Lin, C. C., Chuang, K. C., Chen, S. W., Chao, Y. H., Yen, C. C., Yang, S. H. Ve ark. (2022). Lactoferrin Ameliorates Ovalbumin-Induced Asthma in Mice through

Reducing Dendritic-Cell-Derived Th2 Cell Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 14185.

Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Method*, **25**, 402–408.

Lloyd, C. M. ve Hessel, E. M. (2010). Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature reviews. Immunology*, **10**, 838–848.

Lötvall, J., Akdis, C. A., Bacharier, L. B., Bjermer, L., Casale, T. B., Custovic, ve ark. (2011). Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **127**, 355–360.

Lukacs, N. W., John, A., Berlin, A., Bullard, D. C., Knibbs, R. ve Stoolman, L. M. (2002). E- and P-selectins are essential for the development of cockroach allergen-induced airway responses. *Journal of Immunology*, **169**, 2120–2125.

Ma, Y., Tang, T., Sheng, L., Wang, Z., Tao, H., Zhang, Q. Ve ark.(2018). Aloin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting JAK1-STAT1/3 activation and ROS production in RAW264.7 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, **42**, 1925–1934.

Madhyastha, R., Madhyastha, H., Pengjam, Y., Nurrahmah, Q. I., Nakajima, Y. ve Maruyama, M. (2019). The pivotal role of microRNA-21 in osteoclastogenesis inhibition by anthracycline glycoside aloin. *Journal of Natural Medicines*, **73**, 59–66.

Mattes, J., Yang, M., Mahalingam, S., Kuehr, J., Webb, D. C., Simson, L., Hogan, S. P. ve ark. (2002). Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *The Journal of Experimental Medicine*, **195**, 1433–1444.

McMillan, S. J. ve Lloyd, C. M. (2004). Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **34**, 497–507.

Miller, R. L. ve Peden, D. B. (2014). Environmental effects on immune responses in patients with atopy and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical immunology*, **134**, 1001–1008.

Mills, P. R., Davies, R. J. ve Devalia, J. L. (1999). Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **160**, S38–S43.

Misawa, E., Tanaka, M., Nomaguchi, K., Nabeshima, K., Yamada, M., Toida, T. ve ark. Iwatsuki, K. (2012). Oral ingestion of *Aloe vera* phytosterols alters hepatic gene expression profiles and ameliorates obesity-associated metabolic disorders in zucker diabetic fatty rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 2799–2806.

Monick, M. M., Yarovinsky, T. O., Powers, L. S., Butler, N. S., Carter, A. B., Gudmundsson, G. ve ark. (2003). Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 53035–53044.

Moriyama, M., Moriyama, H., Uda, J., Kubo, H., Nakajima, Y., Goto, ve ark. (2016). Beneficial effects of the genus aloe on wound healing, cell proliferation, and differentiation of epidermal keratinocytes. *PloS One*, **11**, 1-15.

Mukherjee, P.K., Nema, N. K., Maity, N., Mukherjee, K., Harwansh, R.K. 2014. Phytochemical and therapeutic profile of *Aloe vera*, *Journal of Natural Remedies*, **14**, 1-26.

Na, H. S., Song, Y. R., Kim, S., Heo, J. Y., Chung, H. Y., Chung, J. (2016). Aloin Inhibits Interleukin (IL)-1β-Stimulated IL-8 Production in KB Cells. *Journal of periodontology*, **87**, 108-115.

Naghi Shokri, A., Ghasemi, H. A. ve Taherpour, K. (2017). Evaluation of *Aloe vera* and synbiotic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, gut morphology, immune responses and blood constitutes of broiler chickens. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, ***88***, 306–313.

Nakae, S., Lunderius, C., Ho, L. H., Schäfer, B., Tsai, M. ve Galli, S. J. (2007). TNF can contribute to multiple features of ovalbumin-induced allergic inflammation of the airways in mice. *The Journal of Allergy and Clinical immunology*, **119**, 680–686.

Narayanan, B., Prabhu, S., 2017. A review on biological properties of *Aloe vera* plant. *International Journal for Innovative Research in Science & Technology*, **3**, ISSN (online): 2349-6010.

Netuveli, G., Hurwitz, B. ve Sheikh, A. (2007). Lineages of language and the diagnosis of asthma. *Journal of the Royal Society of Medicine*, ***100***, 19–24.

Ni Y., Turner . Yates K.M., Tizard I. (2004). Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *International Immunopharmacology*, **4**, 1745-1755.

Nials, A. T. ve Uddin, S. (2008). Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease models & Mechanisms*, **1**, 213–220.

Oettgen, H. C. ve Geha, R. S. (2001). IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **107**, 429–440.

Okyar, A., Can, A., Akev, N., Baktır G., Sütlüpınar, N. (2001). Effect of *Aloe vera* leaves on blood glucose level in Type I and II diabetic rat models. *Phytotherapy Research*, **15**, 157–161.

Ozsoy, N., Candoken, E., Akev, N., (2009). Implications for degenerative disorders. Antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, β-carotene, α-tocopherol in *Aloe vera*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2**, 1-8.

Park, C. H., Son, H. U., Yoo, C. Y., ve Lee, S. H. (2017). Low molecular-weight gel fraction of *Aloe vera* exhibits gastroprotection by inducing matrix metalloproteinase-9 inhibitory activity in alcohol-induced acute gastric lesion tissues. *Pharmaceutical Biology*, **55**, 2110–2115.

Park, Y.I. ve Lee, S.K. (2006). (Eds). New Perspectives on Aloe. US: Springer Science + Business Media, LLC.

Paul, W. E., & Zhu, J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified ? *Nature reviews. Immunology*, **10**, 225–235.

Pelaia, C., Pelaia, G., Maglio, A., Tinello, C., Gallelli, L., Lombardo, N. ve ark. (2023). Pathobiology of Type 2 Inflammation in Asthma and Nasal Polyposis. *Journal of Clinical Medicine*, ***12***, 3371.

Pengjam, Y., Madhyastha, H., Madhyastha, R., Yamaguchi, Y., Nakajima, Y., Maruyama, M. (2016). NF-κB pathway inhibition by anthrocyclic glycoside aloin is key event in preventing osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Phytomedicine*, 23, 417–428.

Possa, S. S., Leick, E. A., Prado, C. M., Martins, M. A. ve Tibério, I. F. (2013). Eosinophilic inflammation in allergic asthma. *Frontiers in Pharmacology*, **4**, 46.

Pradeep, A. R., Garg, V., Raju, A., ve Singh, P. (2016). Adjunctive Local Delivery of *Aloe vera* Gel in Patients With Type 2 Diabetes and Chronic Periodontitis: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *Journal of Periodontology*, **87**, 268–274.

Pressman, P., Clemens, R., Hayes, A.W., 2019. *Aloe vera* at the frontier of glycobiology and integrative medicine: Health implications of an ancient plant. *SAGE Open Medicine,***7**, 2050312119875921.

Rahman, S., Carter, P., ve Bhattarai, N. (2017). *Aloe vera* for Tissue Engineering Applications. *Journal of Functional Biomaterials*, **8**, 2-17.

Renz H, Bachert C, Berek C, et al. Physiology and pathology of eosinophils: recent developments: summary of the focus workshop organized by DGAKI. (2021). *Scandinavian Journal of Immunology,* **93**,e13032.

Rincón, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., & Flavell, R. A. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **185**, 461–469.

Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M. ve ark. (1992). Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *The New England Journal of Medicine*, **326**, 298–304.

Rowe-Jones J. M. (1997). The link between the nose and lung, perennial rhinitis and asthma--is it the same disease? *Allergy*, **52**, 20–28.

Sahiner U., Akdis M., Akdis A. C. (2022). Allergy Essentials. Armsterdam: Elsevier.

Sahu P.K., Giri D.D., Singh R., Pandey P., Gupta S., Atul Kumar Shrivastava A.K. ve ark. (2013). Therapeutic and medicinal uses of *Aloe vera*: A Review. *Pharmacology & Pharmacy*, **4**, 599-610.

Sakula A. (1985). Henry Hyde Salter (1823-71): a biographical sketch. *Thorax*, **40**, 887–888.

Salama A: R., Magdy M. M., Abd Elwahab M. B. Ve ark. Shakweer M. M. (2016). Assessment Effect Of *Aloe vera*, Azadırachta Indıca And Morınga Oleıfera Aqueous Extracts On Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxıcıty In Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **8**, 83-89.

Salvi, S., Semper, A., Blomberg, A., Holloway, J., Jaffar, Z., Papi, A. ve ark. (1999). Interleukin-5 production by human airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell And Molecular Biology*, **20**, 984–991.

Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., Sendón, R., Sanches-Silva, A., 2017. *Aloe vera*: Ancient knowledge with new frontiers. *Trends in Food Science & Technology,* **61**, 94-102.

Saulyte, J., Regueira, C., Montes-Martínez, A., Khudyakov, P., Takkouche, B. (2014). Active or passive exposure to tobacco smoking and allergic rhinitis, allergic dermatitis, and food allergy in adults and children: a systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*, **11**, e1001611.

Shafaie, S., Andalib, S., Shafaei, H., Montaseri, A. ve Tavakolizadeh, M. (2020). Differential biological behavior of fibroblasts and endothelial cells under *Aloe vera* gel culturing. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, **9**, 234–246.

Shi, H. Z., Humbles, A., Gerard, C., Jin, Z., Weller, P. F. (2000). Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *The Journal of Clinical İnvestigation*, **105**, 945–953.

Shirali, S., Barari, A., Hosseini, S. A., Khodadi, E. (2017). Effects of six weeks endurance training and *Aloe vera* supplementation on COX-2 and VEGF levels in mice with breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **18**, 31–36.

Sitara U., Hassan N. ve Naseem J. (2011). Antifungal activity of *Aloe vera* against plant pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Botany*, **43**, 2231-2233.

Spacova, I., Petrova, M. I., Fremau, A., Pollaris, L., Vanoirbeek, J., Ceuppens, J. L. Ve ark. (2019). Intranasal administration of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents birch pollen-induced allergic asthma in a murine model. *Allergy,* **74**, 100–110.

Sridhar, R., Ravanan, S., Venugopal, J. R., Sundarrajan, S., Pliszka, D., Sivasubramanian ve ark. (2014). Curcumin- and natural extract-loaded nanofibres for potential treatment of lung and breast cancer: in vitro efficacy evaluation. *Journal of Biomaterials Science*, **25**, 985–998.

Strachan D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ (Clinical research ed.)*, **299**, 1259–1260.

Su, H. H., Cheng, C. M., Yang, Y. N., Chang, Y. W., Li, C. Y., Wu, S. T. ve ark. (2023). Acrylamide, an air pollutant, enhances allergen-induced eosinophilic lung inflammation via group 2 innate lymphoid cells. *Mucosal Immunology*, S1933-0219(23)00073-9. Advance online publication.

Subhashini, Chauhan, P. S., Kumari, S., Kumar, J. P., Chawla, R., Dash, D. Ve ark. (2013). Intranasal curcumin and its evaluation in murine model of asthma. *International Immunopharmacology*, **17**, 733–743.

Suganya, S., Venugopal, J., Agnes Mary, S., Ramakrishna S., Lakshmi B. S., Giri Dev V. R. (2014). *Aloe vera* incorporated biomimetic nanofibrous scaffold: A regenerative approach for skin tissue engineering. *Iranian Polymer Journal*, **23**, 237–248.

To, T., Stanojevic, S., Moores, G., Gershon, A. S., Bateman, E. D., Cruz, A. A., & Boulet, L. P. (2012). Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*, **12**, 204.

Tracey, K. J. ve Cerami, A. (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual Review of Medicine*, **45**, 491–503.

Ulrich, K., Hincks, J. S., Walsh, R., Wetterstrand, E. M., Fidock, M. D., Sreckovic, S. ve ark. (2008). Anti-inflammatory modulation of chronic airway inflammation in the murine house dust mite model. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, **21**, 637–647.

Upton R (2012) American Herbal Pharmacopeia, *Aloe vera* Leaf, *Aloe vera* Leaf Juice, *Aloe vera* Inner Leaf Juice, *Aloe vera* (L.) Burm. f. Standarts of Identitiy, Analysis and Quality Control. www.herbal-ahp.org.

Vázquez B., Avila G., Segura D. ve Escalante B. (1996). Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. *Journal of Ethnopharmacology*, **55**, 69–75.

Walter, M. J. ve Holtzman, M. J. (2005). A centennial history of research on asthma pathogenesis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **32**, 483–489.

Wang, F., Li, W., Liu, Z., Yu, R. ve Wang, D. (2021). LPS-induced inflammatory response and apoptosis are mediated by Fra-1 upregulation and binding to YKL-40 in A549 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **22**, 1474.

Wills-Karp M. (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annual review of Immunology*, **17**, 255–281.

Wong, T. H., Lee, C. L., Su, H. H., Lee, C. L., Wu, C. C., Wang, C. C. ve ark. (2018). A prominent air pollutant, Indeno[1,2,3-cd]pyrene, enhances allergic lung inflammation via aryl hydrocarbon receptor. *Scientific Reports*, **8**, 5198.

Xue, L., Gyles, S. L., Wettey, F. R., Gazi, L., Townsend, E., Hunter ve ark. (2005). Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells. *Journal of Immunology*, **175**, 6531–6536.

Yang, Q., Ge, M. Q., Kokalari, B., Redai, I. G., Wang, X., Kemeny, D. M. ve ark. (2016). Group 2 innate lymphoid cells mediate ozone-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **137**, 571–578.

Zhang, J., Xu, X., Liang, Y., Wu, X., Qian, Z., Zhang, L. ve ark. (2023). Particulate matter promotes the epithelial to mesenchymal transition in human lung epithelial cells via the ROS pathway. *American Journal of Translational Research*, **15**, 5159–5167.

Zhang, L. Q., Lv, R. W., Qu, X. D., Chen, X. J., Lu, H. S., & Wang, Y. (2017). Aloesin suppresses cell growth and metastasis in ovarian cancer SKOV3 cells through the ınhibition of the MAPK signaling pathway. *Analytical Cellular Pathology*, 1-9.

Zhang, P., Liu, X., Huang, G., Bai, C., Zhang, Z., Li, H. (2017). Barbaloin pretreatment attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via activation of AMPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **490**, 1215–1220.

Zhao, Y., Usatyuk, P. V., Gorshkova, I. A., He, D., Wang, T., Moreno-Vinasco ve ark. (2009). Regulation of COX-2 expression and IL-6 release by particulate matter in airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **40**, 19–30.

Zosky, G. R. ve Sly, P. D. (2007). Animal models of asthma. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of The British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **37**, 973–988.

İNTİHAL RAPORU

ALOE VERA L. BURM. F. JELİNİN VE NANOTEKNOLOJİK FORMÜLASYONLARININ AKCİĞER HASARINDA İN VİTRO VE İN VİVO ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%8	%8	%2	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
2	openaccess.bezmialem.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
4	doi.org İnternet Kaynağı	<%1
5	9lib.net İnternet Kaynağı	<%1
6	Schuerer, Douglas J. E., Patrick D. Brophy, Norma J. Maxvold, Timothy Kudelka, Timothy E. Bunchman, and Timothy Bunchman. "High-Efficiency Dialysis for Carbamazepine Overdose", Journal of Toxicology Clinical Toxicology, 2000. Yayın	<%1

neu.edu.tr