



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**İCARIİNİN VASKÜLER GEVŞETİCİ ETKİSİNDE
SFİNGOZİN-1-FOSFAT RESEPTÖR 1(S1PR1)'İN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Ozan MERT

Farmakoloji Ana Bilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**İCARIİNİN VASKÜLER GEVŞETİCİ ETKİSİNDE
SFİNGOZİN-1-FOSFAT RESEPTÖR 1(S1PR1)'İN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Ozan MERT

Danışman
Doç. Dr. Gülnur SEVİN

Farmakoloji Ana Bilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2023

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç.Dr. Gülnur SEVİN

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Yasemin ERAÇ

Üye : Prof.Dr. Nergiz Durmuş

Sütpideler

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 25.08.2023

Önsöz

Sfingozin sinyal yolağı, hücre sel sinyal iletiminde önemli bir rol oynar. Bu yolak, vasküler tonun düzenlenmesi, hücre ölümü (apoptoz), hücre farklılaşması ve immün yanıtın düzenlenmesi gibi bir dizi biyolojik süreçte önemli fonksiyonlar üstlenir. İcariin düz kas gevşetici, afrodisyak, nöroprotektif, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu, anti-oksidan, anti-enflamatuvar ve anti-kanser etkileri bilinen bir flavanoiddir. Tüm bu olumlu etkilerine rağmen icariinin etki mekanizması hala tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmanın temel amacı icariinin düz kas gevşetici etkisinin sfingozin-1-fosfat reseptörleri ile bağlantılı olup olmadığını tanımlamaktır. İcariin ve sfingozin sinyal yolağı birçok benzer farmakolojik etkilere sahiptir. Bununla birlikte icariin ve sfingozin-1-fosfat(S1P) benzer sinyal yolaklar üzerinden etki gösterebilmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarının icariinin, sfingozin-1-fosfat sinyal yolağı ile olası ilişkisini ortaya koyması, icariin'in S1P metabolizmasının bozulduğu hastalıklarda farmakolojik bir ajan olarak kullanılabilmesi ve literatüre ilk kez kazandırılacak bir bilgi olması nedeniyle son derece heyecan vericidir. Bu projeyi gerçekleştirirken sfingozin sinyal yolağının tümünü araştırmak istesek de, bütçe bazlı düşündüğümüzde sfingomiyelinaz ve S1P liyaz gibi önemli enzimleri bu araştırmanın dışında tutmak zorunda kaldık. Bununla birlikte, icariinin, S1P sinyal yolağındaki olası etkisi, organ banyosu deneyleri ve western blot deneyleri ile aydınlatılmaya çalışıldı. Bu tezin bana çok fazla değer kattığını da söz etmeden geçemeyeceğim, bu çalışma süresince farmakoloji hakkında çok fazla bilgi edindim ve bu alanda kendimi geliştirdim. Tabi bu süreçte hem laboratuvar çalışma arkadaşlarımdan hem de değerli hocalarımdan deneyimlerinden oldukça yararlandım. Bu yüzden, tez çalışmam boyunca öğrendiklerim, yaşadıklarım ve çektiğim zorlukların güzel bir hatırasıyla birlikte sözlerimi bitiriyorum. Tez sürecim boyunca her türlü bilimsel ve manevi destekleri nedeniyle başta danışman hocam Doç. Dr. Gülnur Sevin olmak üzere herkese teşekkürü borç bilirim.

İzmir, 25.08.2023

Ozan MERT

Özet

İcariinin Vasküler Gevşetici Etkisinde Sfingozin-1-fosfat Reseptör 1(S1PR1)'in Rolünün Araştırılması

Sfingozin-1-Fosfat (S1P), sfingozin kinaz (SK) enzimleri aracılığıyla, sfingozinin fosforilasyonu ile üretilen biyoaktif bir sfingolipit metabolitidir. S1P'nin birçok fizyolojik süreçte görevli olduğu ve S1P sinyal yolağındaki bozuklukların, ateroskleroz, diyabet, hipertansiyon gibi hastalıkların patolojisinde yer aldığı bildirilmektedir. S1P, özellikle vasküler gelişim ve stabilite, anjiyogenez ve vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. S1P'nin, G proteinine kenetli sfingozin-1-fosfat 1-5 reseptörleri(S1PR1-5) olarak adlandırılan beş farklı reseptörü bulunmaktadır. SK enzimleri tarafından sfingozinin fosforillenmesiyle oluşan S1P; vazodilatasyon ve vasküler geçirgenlik üzerinden etkilerini S1PR1 ve S1PR3'leri aracılığıyla göstermektedir. Düz kas gevşetici, nöroprotektif, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu, anti-oksidan, anti-enflamatuvar etkileri olan icariin; düz kas gevşetici ve anti-aterosklerotik etkilerini S1P ile benzer şekilde PI3K/Akt-eNOS-NO yolağını aktive ederek göstermektedir. İcariinin (İCA), S1PR1 ve S1PR3 agonistlerinin santral sinir sistemi hastalıklarında NF-κB, AKT, ERK1/2, p38, c-Jun ve MEK gibi ortak alt-mekanizmalar üzerinden tedavi edici etki gösterdikleri bildirilmektedir. Literatürde İCA ve S1PR1 agonistlerinin miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarı ve Parkinson-Alzheimer gibi inflamatuvar tabanlı nörodejeneratif hastalıklarda ortak etki mekanizmalarını paylaşması nedeniyle "İcariin vasküler gevşetici etkisini S1PR1 ve/veya S1PR3 aracılığıyla gösterebilir mi?" sorusunu aklımıza getirmiş ve bu tez kapsamında, **ilk kez** icariinin aorta üzerindeki gevşetici etkisine S1PR1 ve S1PR3'ün katkısını biyokimyasal ve farmakolojik çalışmalar ile araştırmak amaçlanmıştır.

İCA'nın vasküler gevşetici etkisinde, S1P sinyal yolağına rolünün aydınlatılması için her cinsiyetten sprague dawley sıçanların aorta dokuları izole organ banyosu deneyleri kullanılarak ve western blot deneyleri ile araştırılmıştır. İCA'nın gevşetici etkilerinin endotele bağlı ve/veya NO aracılı olduğunu kanıtlamak üzere çalışmamızda endoteli sıyrılmış aortalar ve nitrik oksit sentaz inhibitörü olan L-NAME (100 µM, 30dk.) inkübasyonu varlığında yanıtlar alınmıştır. Bunun yanı sıra, İCA'nın sfingozin yolağı ile ilişkisi yolak üzerinde yer alan enzim ve reseptör inhibitörleri kullanılarak

fonksiyonel çalışmalarla incelenmiştir. İcariinin, seramidaz enzimi ile ilişkisi, seramidaz enzim inhibitörü olan D-erythro-MAPP (MAPP) (3-10 μ M, 30dk.) ile, sfingozin kinaz enzimiyle ilişkisi, sfingozin kinaz enzim inhibitörü olan N,N-Dimethylsphingosine (DMS) (10-30 μ M, 30dk.) ile, S1PR1 ile ilişkisi, S1PR1 reseptör antagonisti olan W146 (1-3 μ M, 30dk.) ile ve S1PR3 ile ilişkisi, S1PR3 reseptör antagonisti olan CAY10444 (10-30 μ M, 30dk.) aracılığıyla araştırılmıştır. İnhibitörler varlığında/yokluğunda aorta dokularından fenilefrin (10^{-7} M) ile ön kastırma sonrası kümülatif İCA (3×10^{-7} M - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları alınmıştır. Fonksiyonel yanıtlarda, İCA'nın SK-1, S1PR1 ve S1PR3 üzerindeki etkisi belirlendikten sonra bu proteinlerin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisini araştırmak üzere western blot deneyleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan izole organ banyosu deneylerinde elde edilen İCA'nın EC_{50} değeri (3 μ M); doku kültürün de inkübasyon konsantrasyonu olarak kullanılmış ve aorta dokuları 3 μ M İCA ve İCA'nın çözücüsü olan DMSO ile 24 saat, 37 °C' %5 CO₂ ile gazlandırılan inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra dokular CryoMill ile homojenize edilmiş ve homojenatlardaki protein miktarı BCA ile belirlenerek, western blot deneylerinde SK-1, S1PR1 ve S1PR3 protein ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Bunun yanında İCA'nın nitrik oksit (NO) miktarı üzerindeki etkileri griess reaksiyonu ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu amaçla homojenatlar kit protokülüne uygun şekilde, İCA, L-NAME, W146 ve DMS ile 30 dk. süreyle inkübe edilmişlerdir. Sonuç olarak çalışmamızda İCA gevşeme yanıtları endotele bağlıdır ve NO aracılı olarak gerçekleşmektedir. Aortadaki İCA gevşeme yanıtları DMS ve W146 varlığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalırken, MAPP ve CAY10444 varlığında ise herhangi bir değişiklik görülmemiştir. SK-1 ve S1PR1 protein ekspresyon düzeyleri İCA inkübasyonu varlığında artarken, S1PR3 ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. İCA, toplam nitrat ve nitrit düzeylerini arttırırken, bu artış inhibitörler (W146, DMS, L-NAME) varlığında bu artış geri dönmüştür. Bu çalışmanın sonucunda, İCA'nın sıçan aortasında S1P üretiminden sorumlu SK enzimlerinin ve/veya S1PR1, S1PR3leri aracılığıyla gevşetici etki oluşturduğu gösterilmiştir. Erektile disfonksiyon tedavisinde olduğu gibi NO yetmezlik durumlarında, fosfodiesteraz inhibitörleri (örn:sildenafil) gibi NO biyoyararlanımını artıran ajanlarla tedavide klinikte yeterli sonuçlar alınamamaktadır. Bu durum, NO ilişki patolojik koşullarda NO üretiminden hangi sinyal yolağının sorumlu olduğunu ve tedavide seçilecek ajanın bozulan bu sinyal

yolağı ile ilişkisinin 3nemli olacağını aklımıza getirmiştir. Dolayısıyla sfingozin sinyal yolağının bozulduğu ve bu yolak ilişkili NO yetmezlik durumlarında 3zellikle endotel disfonksiyonuyla ilişkili hipertansiyon ve ateroskleroz gibi vask3ler hastalıkların tedavisinde İCA'nın kullanılması yeni ve etkili bir ilaç adayı olma potansiyeli klinik olarak 3nem taşıyacaktır.

Anahtar Kelimeler; İcariin; Sfingozin-1-Fosfat; Aorta; Nitrik Oksit



Abstract

Investigation Of The Role of Sphingosine-1-Phosphate 1 (S1P1) Receptors in The Vascular Relaxant Effect of Icariin

Sphingosine-1-Phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid metabolite produced through the phosphorylation of sphingosine via the enzymes sphingosine kinases (SK). S1P is reported to be involved in numerous physiological processes, and disruptions in the S1P signaling pathway have been implicated in the pathogenesis of diseases such as atherosclerosis, diabetes, and hypertension. S1P plays a particularly significant role in vascular development and stability, angiogenesis, and regulation of vascular tone. S1P has five different receptors known as G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors (S1PR1-5). S1P, generated through the phosphorylation of sphingosine by SK enzymes, exerts its effects primarily via S1PR1 and S1PR3 receptors, leading to vasodilation and regulation of vascular permeability. Icariin, which has smooth muscle relaxant, neuroprotective, cardiovascular protective, antioxidant, and anti-inflammatory effects, demonstrates its smooth muscle relaxant and anti-atherosclerotic effects similar to S1P by activating the PI3K/Akt-eNOS-NO pathway. It has been reported that icariin, S1PR1, and S1PR3 agonists exhibit therapeutic effects in central nervous system diseases through common sub-mechanisms such as NF- κ B, AKT, ERK1/2, p38, c-Jun, and MEK. The aim of our study is to investigate, for the first time, the relationship between the vascular relaxant beneficial effect of icariin and the S1P signaling pathway. To elucidate the role of the S1P signaling pathway in the vascular relaxant effect of ICA, experiments were conducted using isolated organ bath assays on aortic tissues from Sprague Dawley rats of both genders. Additionally, Western blot experiments were performed. In our study, responses were obtained from aortas with endothelium removed and in the presence of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (100 μ M, 30 minutes) incubation to demonstrate that ICA's relaxing effects are endothelium-dependent and/or mediated by NO. Furthermore, the relationship of ICA with the sphingosine pathway was investigated through functional studies using enzyme and receptor inhibitors present along the pathway. The interaction of icariin with the seramidase enzyme was examined using D-erythro-MAPP (MAPP), a seramidase enzyme inhibitor (3-10 μ M, 30 minutes). Its relationship with the sphingosine kinase enzyme was investigated using N,N-Dimethylsphingosine (DMS), a sphingosine kinase enzyme inhibitor (10-

30 μM , 30 minutes). The interaction with S1PR1 was explored using W146, an S1PR1 receptor antagonist (1-3 μM , 30 minutes), and its relationship with S1PR3 was studied using CAY10444, an S1PR3 receptor antagonist (10-30 μM , 30 minutes). In the presence/absence of inhibitors, cumulative relaxation responses to icariin (3×10^{-7} M - 10^{-4} M) were obtained from aortic tissues following pre-contraction with phenylephrine (10^{-7} M). After determining the effect of ICA on SK-1, S1PR1, and S1PR3 in functional responses, Western blot experiments were conducted to investigate the impact on the expression levels of these proteins. The EC_{50} value of ICA obtained from isolated organ bath experiments (3 μM) was used as the incubation concentration in tissue culture. Aortic tissues were incubated with 3 μM ICA and the solvent of ICA, DMSO, for 24 hours at 37°C in a 5% CO_2 -gassed incubator. After incubation, the tissues were homogenized using a CryoMill, and the protein content in the homogenates was determined using the BCA assay. In Western blot experiments, the protein expression levels of SK-1, S1PR1, and S1PR3 were investigated. Additionally, the effects of ICA on nitric oxide (NO) levels were measured spectrophotometrically using the Griess reaction. For this purpose, homogenates were incubated with ICA, L-NAME, W146, and DMSO for 30 minutes according to kit protocols. In conclusion, our study demonstrates that ICA relaxation responses are endothelium-dependent and mediated through NO. The aortic relaxation responses to ICA are significantly reduced in the presence of DMS and W146, while no changes were observed in the presence of MAPP and CAY10444. SK-1 and S1PR1 protein expression levels increase in the presence of ICA incubation, while there is no statistically significant change in S1PR3 expression levels. ICA increases total nitrate and nitrite levels, but this increase is reversed in the presence of inhibitors (W146, DMS, L-NAME). As a result of this study, it has been demonstrated that ICA generates a relaxing effect in rat aortas through the SK enzymes responsible for S1P production and/or via S1PR1 and S1PR3 receptors. In conditions of insufficient nitric oxide (NO), such as in the treatment of erectile dysfunction, clinical results with agents that enhance NO bioavailability, like phosphodiesterase inhibitors (e.g., sildenafil), may not always be sufficient. This situation highlights the importance of identifying which signaling pathway is responsible for NO production under specific pathological conditions and how the chosen therapeutic agent interacts with the compromised signaling pathway. Therefore, the use of ICA as a novel and effective drug candidate

holds significant clinical potential in the treatment of vascular diseases such as hypertension and atherosclerosis, particularly those associated with endothelial dysfunction, where the sphingosine signaling pathway is impaired and NO deficiency is prevalent.

Keywords; Icariin; Sphingosine-1-Phosphate; Aorta; Nitric Oxide



İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	VI
İçindekiler	IX
Tablolar Dizini	XII
Şekiller Dizini.....	XIV
Kısaltma Listesi.....	XVII
Giriş.....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	1
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	1
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı.....	2
Genel Bilgiler	3
2.1. Nitrik Oksit (NO) ve Sentezinde Görevli Enzimler	3
2.1.1. Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS/NOS1)	4
2.1.2. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS/NOS2)	4
2.1.3. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS/NOS3).....	4
2.2. Sfingozin-1-Fosfat (S1P).....	5
2.3. Sfingozin-1-Fosfat Reseptörleri (S1PR).....	6
2.3.1. Sfingozin-1-Fosfat 1 Reseptörü (S1PR1).....	7
2.3.2. Sfingozin-1-Fosfat 2 Reseptörü (S1PR2).....	9
2.3.3. Sfingozin-1-Fosfat 3 Reseptörü (S1PR3).....	9
2.3.4. Sfingozin-1-Fosfat 4 Reseptörü (S1PR4).....	10
2.3.5. Sfingozin-1-Fosfat 5 Reseptörü (S1PR5).....	10
2.3.6. S1P'nin Kardiyovasküler Sistemdeki Fonksiyonları.....	11
2.3.7. S1P'nin Kan Damarlarındaki Etkisi.....	11
2.3.8. S1P'nin Kalpteki Etkisi	12
2.4. Sfingozin Kinaz Enzimleri (SK)	13
2.4.1. Sfingozin Kinaz 1 (SK-1)	14
2.4.2. Sfingozin Kinaz 2 (SK-2)	15

2.5.	Seramidaz Enzimi.....	16
2.6.	İcariin	16
	Gereç ve Yöntem.....	20
3.1.	Deneyde Kullanılan Hayvanlar	20
3.2.	İzole Organ Banyosunda Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması	22
3.1.	Krebs Çözeltisinin Hazırlanması.....	22
3.1.1.	Konsantre Krebs (20X) Hazırlanması.....	22
3.1.2.	Normal Krebs Hazırlanması	23
3.2.	İzole Organ Banyosu Deneyleri.....	23
3.2.1.	Protokol 1: İCA gevşemelerinin NO sentezi ve S1PR1, S1PR3, SK-1, SK-2, Ser ile ilişkisinin araştırılması	25
3.2.2.	Protokol 2: İCA'nın vasküler endotele bağlı gevşeme yanıtları üzerindeki etkisi ve bunun S1PR1, SK-1, SK-2 ile ilişkisinin araştırılması.....	26
3.2.3.	Protokol 3: İCA'nın vasküler düz kas gevşemeleri üzerindeki etkisinin NO alt mekanizmaları ile ilişkisinin araştırılması.....	26
3.3.	Doku Kültürü.....	27
3.4.	Homojenizasyon.....	27
3.5.	Bikinkoninik Asit Yöntemi (Bicinchoninic Acid Assay, BCA).....	28
3.5.1.	Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	28
3.6.	Western Blot Deneyleri.....	28
3.6.1.	SDS Jel Elektroforezi.....	28
3.6.2.	Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Transferi.....	29
3.6.3.	Membranın Bloke Edilmesi ve Antikorlar ile İnkübasyonu	29
3.7.	Griess Reaksiyonu Yöntemi	30
3.8.	İstatistiksel analiz.....	30
	Bulgular.....	32
4.1.	İzole Organ Banyosu Deneyleri.....	32
4.1.1.	İCA Gevşeme Yanıtlarında Endotel Etkisi.....	32
4.1.2.	İCA Gevşeme Yanıtlarında Nitrik Oksidin Rolü	33
4.1.3.	DMSO'nun İCA Gevşeme Yanıtlarına Katkısı	35
4.1.4.	İCA'nın gevşetici yanıtlarında sfingozin-1-fosfat (S1P) biyosentezinin rolü	36
4.1.4.1	İCA'nın Gevşeme Yanıtlarında Seramidaz Enziminin Etkisi.....	36

4.1.4.2	İCA Gevşeme Yanıtlarında Sfingozin Kinaz Enziminin Etkisi.....	39
4.1.4.3	İCA Gevşeme Yanıtlarında S1P1 Reseptörlerinin Etkisi	41
4.1.4.4	İCA Gevşeme Yanıtlarında S1P3 Reseptörlerinin Etkisi	43
4.1.5	İCA'nin ACh Gevşemelerine Etkisi ve Bu Etkinin Sfingozin Kinaz Enzimiyle İlişkisi.....	49
4.1.6	İCA'nin SNP Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkisi.	52
4.2	Western Blot Deneyleri.....	54
4.3	Griess Reaksiyonu Deneyleri.....	57
	Tartışma	59
5.1.	İcariinin Vazodilatör Etkisinde NO ve Endotel Tabakasının Rolü	59
5.2.	İcariinin Vazodilatör Etkisinde Çözücü (DMSO)'nun Rolü.....	60
5.3.1.	Seramidaz Enziminin Rolü.....	60
5.3.2.	Sfingozin Kinaz Enziminin Rolü	61
5.3.	3. Sfingozin-1-Fosfat Reseptör 1(S1PR1)'in Rolü.....	65
5.3.4.	Sfingozin-1-Fosfat Reseptör 3 (S1PR3)'ün Rolü	67
	Sonuç ve Öneriler.....	68
	Kaynaklar	70
	Ekler	93
	Teşekkürler	95
	Özgeçmiş	96

Tablolar Dizini

Tablo 1. Deneyde Kullanılan Cihazlar	20
Tablo 2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
Tablo 3. Konsantre Krebs Hazırlanmasında Kullanılan Maddeler.....	23
Tablo 4. Normal Krebs Hazırlamada Kullanılan Maddeler	23
Tablo 5. Western Blot antikör dilüsyon oranları.....	29
Tablo 6. Sıçan aortasında, endotel varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).	33
Tablo 7. Sıçan aortasında, L-NAME varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).	35
Tablo 8. Sıçan aortasında, fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA ve çözücü gevşeme yanıtları (E_{maks}).	36
Tablo 9. Sıçan aortasında, MAPP varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).	38
Tablo 10. Sıçan aortasında, MAPP varlığında/yokluğunda İCA pD_2 değerleri. 39	
Tablo 11. Sıçan aortasında, DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).	40
Tablo 12. Sıçan aortasında, DMS varlığında/yokluğunda İCA pD_2 değerleri....	41
Tablo 13. Sıçan aortasında, W146 varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).	43
Tablo 14. Sıçan aortasında, W146 varlığında/yokluğunda İCA pD_2 değerleri...43	
Tablo 15. Sıçan aortasında CAY10444 varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA gevşeme yanıtları.....	45
Tablo 16. Sıçan Aorta Halkalarında, CAY10444 varlığında/yokluğunda İCA pD_2 değerleri.....	46
Tablo 17. Sıçan aortasında, sfingozin yolak inhibitörlerinin maksimum İCA gevşeme yanıtlarına etkisi (E_{maks}).	47
Tablo 18. Sıçan aortasında, sfingozin yolak inhibitörlerinin İCA pD_2 değerleri üzerine etkisi.	48
Tablo 19. Sıçan aortasında, İCA ve $10 \mu M$ DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum ACh gevşeme yanıtları (E_{maks}).	50
Tablo 20. Sıçan aortasında İCA ve $10 \mu M$ DMS varlığında/yokluğunda ACh pD_2 değerleri.....	51

Tablo 21. Sıçan aortasında, İCA varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum SNP gevşeme yanıtları (E_{maks}).53
Tablo 22. Sıçan aortasında, İCA varlığında/yokluğunda SNP pD_2 değerleri.54



Şekiller Dizini

Şekil 1. NO biyosentezi ve NO'in kardiyovasküler, böbrek ve metabolizmadaki olası etkileri (Carlström, 2021).....	3
Şekil 2. eNOS-NO Sinyal Yolağının Damar Düz Kasını Gevşetici Etkisi (Stoltenberg ve diğerleri, 2012).....	5
Şekil 3. S1P biyosentezi ve degradasyonu.....	6
Şekil 4. Sfingosin 1-fosfat sinyalizasyonu (Mendelson ve diğerleri, 2014).....	7
Şekil 5. S1PR1 ve S1PR3'lerinin olası vazodilatasyon mekanizması (Watterson ve diğerleri, 2005).	8
Şekil 6. İcariin	17
Şekil 7. Sprague-Dawley	20
Şekil 8. Aorta Doku İzolasyonu.....	24
Şekil 9. PanLab	25
Şekil 10. Sıçan aortasında fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA gevşeme yanıtları.....	32
Şekil 11: Sıçan aortasında, endotel varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).	33
Şekil 12. Sıçan aortasında L-NAME varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA gevşeme yanıtları.....	34
Şekil 13. Sıçan aortasında, L-NAME varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).	34
Şekil 14. Sıçan aortasında fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA ve çözücü (DMSO) gevşeme yanıtları.....	35
Şekil 15. Sıçan aortasında, fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA ve çözücü gevşeme yanıtları (E_{maks}).	36
Şekil 16. Sıçan aortasında MAPP varlığında/yokluğunda Fenilefrin Ön kastırma (10^{-7} M) Sonrası Kümülatif İCA Gevşeme Yanıtları	37
Şekil 17. Sıçan aortasında, MAPP varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).	37
Şekil 18. Sıçan aortasında, MAPP varlığında/yokluğunda İCA pD_2 değerleri...38	
Şekil 19. Sıçan aortasında DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA gevşeme yanıtları	39

Şekil 20. Sıçan aortasında, DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).....	40
Şekil 21. Sıçan aortasında, DMS varlığında/yokluğunda İCA pD_2 değerleri.	41
Şekil 22. Sıçan aortasında W146 varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA Gevşeme Yanıtları.....	42
Şekil 23. Sıçan aortasında, W146 varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).....	42
Şekil 24. Sıçan aortasında, W146 varlığında/yokluğunda İCA pD_2 değerleri. ...	43
Şekil 25. Sıçan aortasında CAY10444 varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA gevşeme yanıtları.....	44
Şekil 26. Sıçan aortasında, CAY10444 varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).	44
Şekil 27. Sıçan aortasında, CAY10444 varlığında/yokluğunda İCA pD_2 değerleri.	45
Şekil 28. Sıçan aortasında, sfingozin yolak inhibitörlerinin kümülatif İCA gevşeme yanıtları üzerine etkisi.....	46
Şekil 29. Sıçan aortasında, sfingozin yolak inhibitörlerinin maksimum İCA gevşeme yanıtları üzerine etkisi (E_{maks}).....	47
Şekil 30. Sıçan aortasında, sfingozin yolak inhibitörlerinin İCA pD_2 değerleri üzerine etkisi.	48
Şekil 31. Sıçan aortasında, İCA ve $10 \mu M$ DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif ACh gevşeme yanıtları	49
Şekil 32. Sıçan aortasında, İCA ve $10 \mu M$ DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum ACh gevşeme yanıtları (E_{maks}).	50
Şekil 33. Sıçan aortasında İCA ve $10 \mu M$ DMS varlığında/yokluğunda ACh pD_2 değerleri.....	51
Şekil 34. Sıçan aortasında, İCA varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif SNP gevşeme yanıtları	52
Şekil 35. Sıçan aortasında, İCA varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum SNP gevşeme yanıtları (E_{maks}).	53
Şekil 36. Sıçan aortasında, İCA varlığında/yokluğunda SNP pD_2 değerleri.....	53
Şekil 37. $3 \mu M$ icariinin S1P1 reseptörünün ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisi.	54

Şekil 38. S1P1 reseptör proteinlerinin temsili bant görüntüleri.....	55
Şekil 39. 3 µM icariinin S1P3 reseptörünün ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisi.	55
Şekil 40. S1P3 reseptör proteinlerinin temsili bant görüntüleri.....	56
Şekil 41. 3 µM icariinin SK-1 enziminin ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisi. ..	56
Şekil 42. SK-1 enzim proteinlerinin temsili bant görüntüleri.	57
Şekil 43. İcariinin inhibitörler varlığında/yokluğunda toplam nitrat ve nitrit konsantrasyonuna etkisi.	58



Kısaltma Listesi

ICA	: İcariin
SK	: Sfingozin Kinaz
S1PR1	: Sfingozin-1-fosfat 1 Reseptörü
S1PR3	: Sfingozin-1-fosfat 3 Reseptörü
Ser	: Seramidaz
MAPP	: D-erythro-MAPP
DMS	: N,N-Dimethylsphingosine
ACh	: Asetilkolin
Fen	: Fenilefrin
NO	: Nitrik Oksit
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
ROT	: Reaktif oksijen türleri
PKC	: Protein kinaz C
ERK	: Ekstraselüler sinyal düzenlenmiş kinaz
PI3K	: Fosfatidilinozitol 3-kinaz
S1P	: Sfingozin-1-fosfat
SK-1	: Sfingozin kinaz-1
SK-2	: Sfingozin kinaz-2
GTP	: Guanozin trifosfat

GS	: Guanilil siklaz
sGMP	: Siklik guanozin monofosfat
PKG	: Protein kinaz G
NOS	: Nitrik oksit sentaz
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
S1P2R	: Sfingozin-1-fosfat 2 Reseptörü
S1P4R	: Sfingozin-1-fosfat 4 Reseptörü
S1P5R	: Sfingozin-1-fosfat 5 Reseptörü
ROCK	: Rho Kinaz
PBS	: Fosfat Buffered Saline
SNP	: Sodyum nitroprussid
ET-1	: Endotelin-1
Ang-II	: Anjiyotensin II
MAPK	: Mitojen-aktive protein kinaz
L-NAME	: N ω -Nitro-L-arjinin metil ester
MS	: Multipl skleroz
CaM	: Kalmodulin
KCl	: Potasyum Klorür

Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Kalp ve damar hastalıkları sadece ülkemizde değil tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur. Mevcut ilaçların yetersiz kaldığı durumlarda yeni ilaçlara ve yeni ilaç hedeflerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, ilaçların farmakolojik etki mekanizmalarının aydınlatılması, etkili ilaç hedeflerinin belirlenmesi ve bu hedeflere yönelik yeni ilaçların araştırılmasına ve/veya geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Çalışmamızda, S1PR agonisti fingolimod'a (FTY720) benzer şekilde multipl skleroza karşı etkili olduğu gösterilen icariinin, vasküler tonusun homeostazında rol oynadığı düşünülen sfingozin yolağı (S1PRleri ve S1P üretiminde görev alan seramidaz ve sfingosin kinaz enzimleri) üzerindeki potansiyel etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

İcariinin aortada NO aracılı gevşetici etkisinin, S1PR1 ve S1PR3 ile ilişkisi var mıdır? İcariinin aortada NO aracılı gevşetici etkisinin, SK ve seramidaz enzimleri ile ilişkisi var mıdır?

Sorularına izole organ banyosu ve western blot deneyleri aracılığıyla yanıt aranacaktır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

İcariinin S1PR1 ve/veya S1PR3'lerini aktive ederek/ekspresyonlarını arttırarak vasküler dokuda NO üzerinden gevşemeye katkı sağlaması ve icariin SK ve seramidaz enzimlerini aktive ederek/ekspresyonlarını arttırarak S1P düzeylerini arttırması beklenmektedir. İcariin aracılı artan S1P düzeyleri S1PR'lerini aktive ederek gevşemeye katkı sağlayabilir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

İcariin, S1P1 ve S1P3 reseptörlerine doğrudan bağlanarak bu reseptör aktivasyonu aracılığıyla endotelial nitrik oksit sentazı (eNOS) aktive eder ve nitrik oksit (NO) üretimini artırır sonuç olarak vazodilatasyon sağlanır. Ya da S1P1 ve S1P3 reseptörlerinin ekspresyon düzeylerini artırarak S1P'ler aracılığıyla NO üretimini sağlar ve vasküler gevşetici etki gösterir. Bunlara ek olarak icariin, SK ve/veya seramidaz enzimlerinin aktivasyonunu veya ekspresyonunu arttırarak S1P üretiminde

artıŖa neden olabilir ve artan S1P reseptörüne baēlanarak vasküler gevŖetici yanıtlar oluŖturabilir.

1.5.AraŖtırmanın Sınırlılıkları

Projemizde kullanılan kimyasalların temin edilmesinde aksaklıklar yaŖanmıŖ ve beklenilenden uzun sürmüŖtür. Kimyasalların neredeyse tamamında çözünlük problemleri yaŖanmıŖtır. Sıçan dokularının izolasyonunda veya dokuların organ banyosuna takılmasında çok hassas davranılmasına raēmen, projenin baŖlangıç dönemlerinde hayvan kaynaklı ya da el manipölasyonlarına baēlı olarak kontrol gevŖeme yanıtlarının alınmasında zaman zaman zorluklar yaŖanmıŖtır. ÇalıŖmamızda S1P miktar tayini yapılabilmesi için gerekli olan ELISA kitinin fiyatı proje bütçemizin çok üstünde kalması nedeniyle alınamamıŖ S1P miktar tayini yapılamamıŖtır. Bu projemizin sınırlılıēıdır ancak indirekt te olsa griess reaksiyonu aracılıēıyla NO miktar tayini yapılarak İCA'nın NO aracılı oluŖturduēu etki doērulanmıŖtır.

1.6.AraŖtırmanın Amacı

Tezin amacı; **ilk kez** icariinin aorta dokusunu gevŖetici yararlı etkisinde S1P sinyal yolaēındaki etkisi araŖtırılmasıdır. Bu kapsamda tezin baŖlıca hedefleri, İcariinin, aortadaki gevŖetici etkisine sfingozin sinyal yolaēının katkısını göstermek için; S1P1, S1P3 reseptörleri ile SK ve seramidaz enzimleri üzerinden izole organ banyosu çalıŖmalarının, S1P1 ve S1P3 reseptörleri ile SK-1 enziminin ekspresyonlarını artırıp artırmadıēının western blot deneyleri ile deēerlendirilmesini kapsar.

2.1.1. Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS/NOS1)

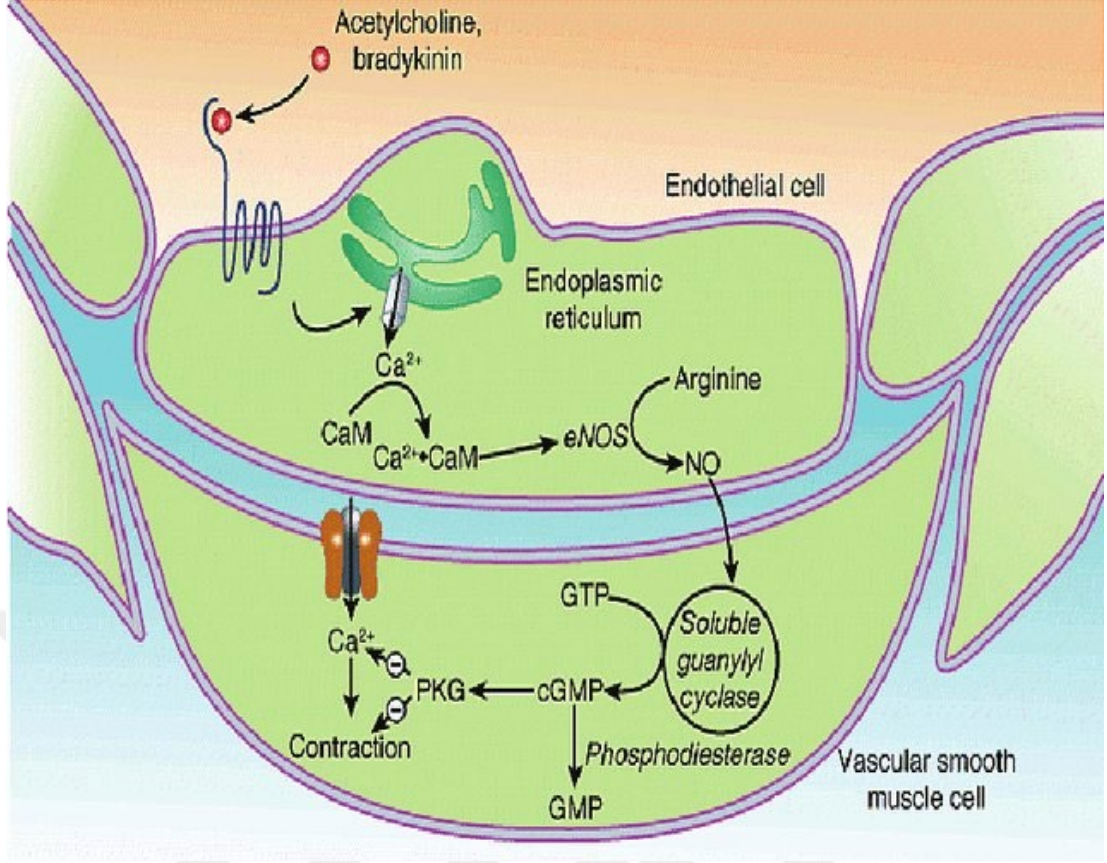
Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS/NOS1), üç nitrik oksit enziminden biridir. Genellikle periferel ve merkezi sinir sisteminde yer alan nNOS, NO üretiminin büyük bir kısmından sorumludur (Kourosh-Arami, Hosseini, Mohsenzadegan, Komaki ve Joghataei, 2020). nNOS kaynaklı NO, kardiyovasküler ve gastrointestinal sistemde, insülin regülasyonunda, nöroenez ve kolinerjik sinir uçlarından nörotransmitter salınımından görevli önemli bir nörotransmitterdir (Kourosh-Arami ve diğerleri, 2020).

2.1.2. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS/NOS2)

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS/NOS2) diğer NOS'lardan farklı olarak sağlıklı durumlarda hücrelerde düzenli olarak sentezlenmez. iNOS'un ekspresyonu proinflatuvar peptidler ve/veya proteinler tarafında indüklenmesiyle gerçekleşir (Cinelli, Do, Miley ve Silverman, 2020). iNOS kaynaklı NO, inflamasyon, enfeksiyon, septik şok ve kan basıncının düzenlenmesi gibi fonksiyonlarda görev almaktadır (Kourosh-Arami ve diğerleri, 2020).

2.1.3. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS/NOS3)

Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS/NOS3) başlıca vasküler endotelyal hücrelerde sentezlenir. eNOS kaynaklı NO, özellikle vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Qiang Li, Youn ve Cai, 2015). İlgili reseptörlerin aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} düzeylerini artmasına neden olur. Ca^{+2} düzeylerini artmasına bağlı olarak, Ca^{+2} -kalmodulin kompleksi oluşur ve bu kompleks eNOS'yi aktive ederek, arjininden NO üretimini tetikler. Üretilen NO, vasküler düz kas hücrelerine geçer ve guanilat siklaz (GS)'a bağlanır. GS, guanozin trifosfat (GTP)dan siklik guanozin monofosfat (sGMP)'ı katalizler. sGMP, protein kinaz G (PKG)'yi aktive ederek, hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin azalmasına buna bağlı olarak da vazodilatasyona sebep olur (**Şekil 2**) (Stoltenberg, A., E. ve Lang Jr., 2012).

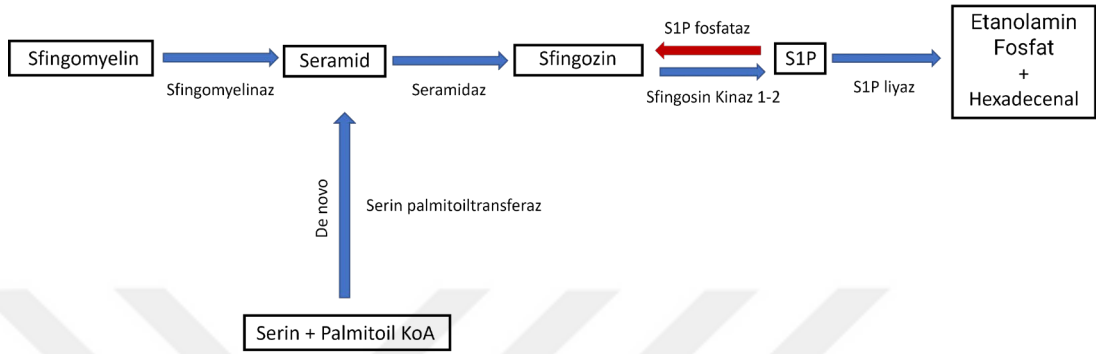


Şekil 2. eNOS-NO Sinyal Yolağının Damar Düz Kasını Gevşetici Etkisi (Stoltenberg ve diğerleri, 2012).

2.2.Sfingozin-1-Fosfat (S1P)

Sfingozin-1-Fosfat (S1P), biyoaktif bir sfingolipit metabolitidir (Pyne ve Pyne, 2010). S1P molekülü, sfingomiyelinin, sfingomyelinaz tarafından parçalanmasıyla oluşan seramitten üretilir (Kurano ve Yatomi, 2017). Seramid, seramidaz enzimiyle sfingozine dönüştürülür ve sfingozin, sfingozin kinaz 1 ve/veya sfingozin kinaz 2 (SK-1 ve/veya SK-2) enzimleri tarafından fosforillenerek S1P üretimi gerçekleşir (Mendelson, Evans ve Hla, 2014). S1P'nin hücre içi düzeyleri ise S1P fosfataz ve S1P liyaz enzimleri aracılığıyla düzenlenmektedir. (Şekil 3) (Pyne ve Pyne, 2010). SK-1 ve SK-2, farklı genler tarafından kodlanmakta ve hücre içi lokalizasyonları farklılık göstermektedir (Diaz Escarcega, McCullough ve Tsvetkov, 2021). S1P'nin birçok fizyolojik süreçte görevli olduğu ve S1P sinyal yolağındaki bozuklukların kanser (Pyne ve Pyne, 2010), ateroskleroz (Kurano ve Yatomi, 2017), diyabet (Wigger,

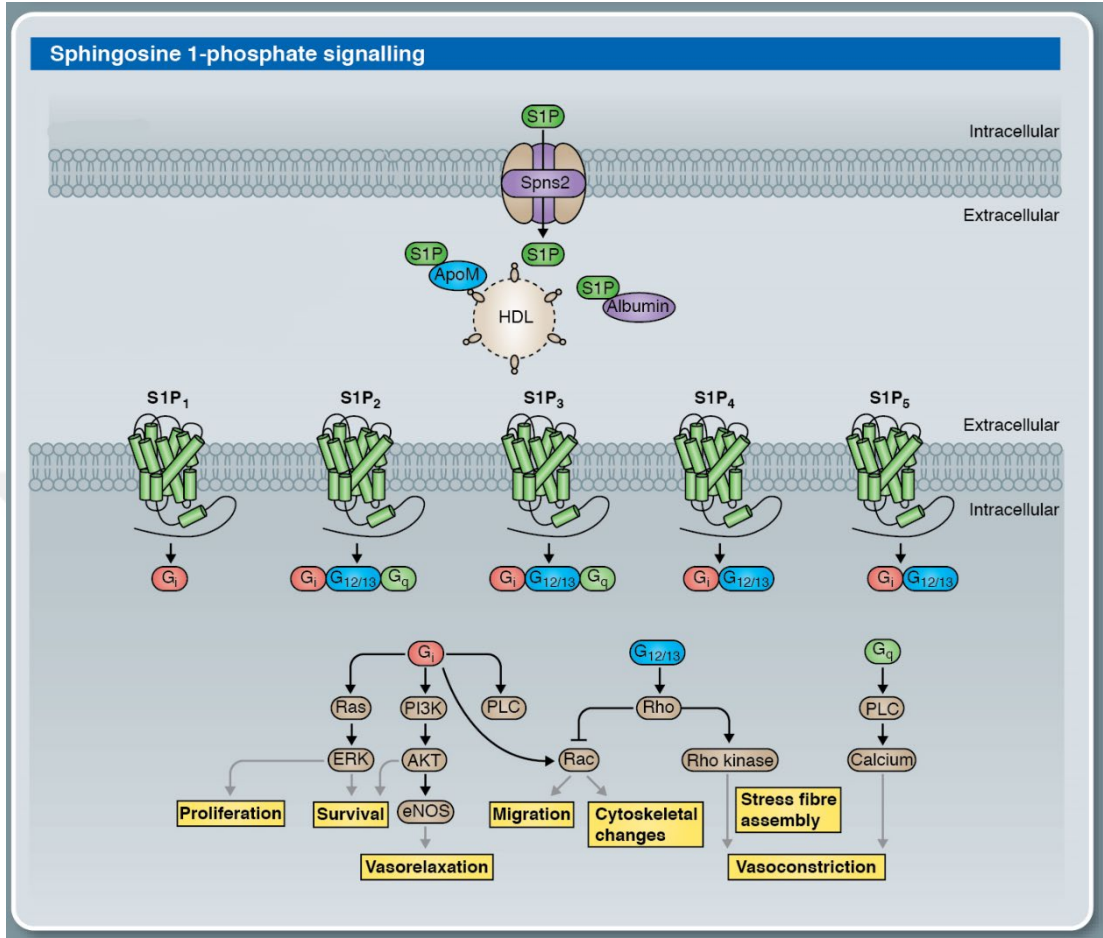
Schumacher, Schneider-Schaulies ve Kleuser, 2021), hipertansiyon gibi bir çok hastalıkların patogenezinde yer aldığı bildirilmektedir (Jozefczuk, Guzik ve Siedlinski, 2020).



Şekil 3. S1P biyosentezi ve degradasyonu.

2.3.Sfingozin-1-Fosfat Reseptörleri (S1PR)

S1P'nin, G protein-kenetli sfingozin-1-fosfat 1-5 reseptörleri (S1PR1-5) olarak adlandırılan beş farklı reseptörü bulunmaktadır (Mendelson ve diğerleri, 2014). S1PR1 ve S1PR3'leri, vazodilatasyon, vasküler geçirgenlik ve proliferasyon süreçlerinde görevlidir (Qian Li, Li, Lei, Tan ve Yi, 2021; Mair ve diğerleri, 2010). S1PR2, hücre göçü, proliferasyon, adezyon moleküllerinin salıverilmesi ve vazokonstriksiyonda (Adada, Canals, Hannun ve Obeid, 2013), S1PR4 ve S1PR5 ise immün yanıtta etki göstermektedirler (Adada ve diğerleri, 2013; Olesch, Ringel, Brüne ve Weigert, 2017). S1P'nin endotelde yer alan S1PR1 ve S1PR3'ne bağlanmasıyla PI3K/AKT/eNOS/NO sinyal yolağı aktive olmakta ve vazodilatasyon görülmektedir (Dantas, Igarashi ve Michel, 2003; Tölle ve diğerleri, 2005). S1P'nin düz kas hücrelerinde yer alan S1PR2 ve S1PR3 ile doğrudan etkileşimi ise vazokonstriksiyon ile sonuçlanmaktadır. Bu durumun S1P konsantrasyonu ile ilişkili olduğu; düşük konsantrasyonun endoteldeki reseptörler üzerinden vazodilatasyona, yüksek konsantrasyonun ise düz kastaki reseptörler üzerinden vazokonstriksiyona neden olduğu öne sürülmektedir (Şekil 4) (Kerage, Gombos, Wang, Brown ve Hemmings, 2021).

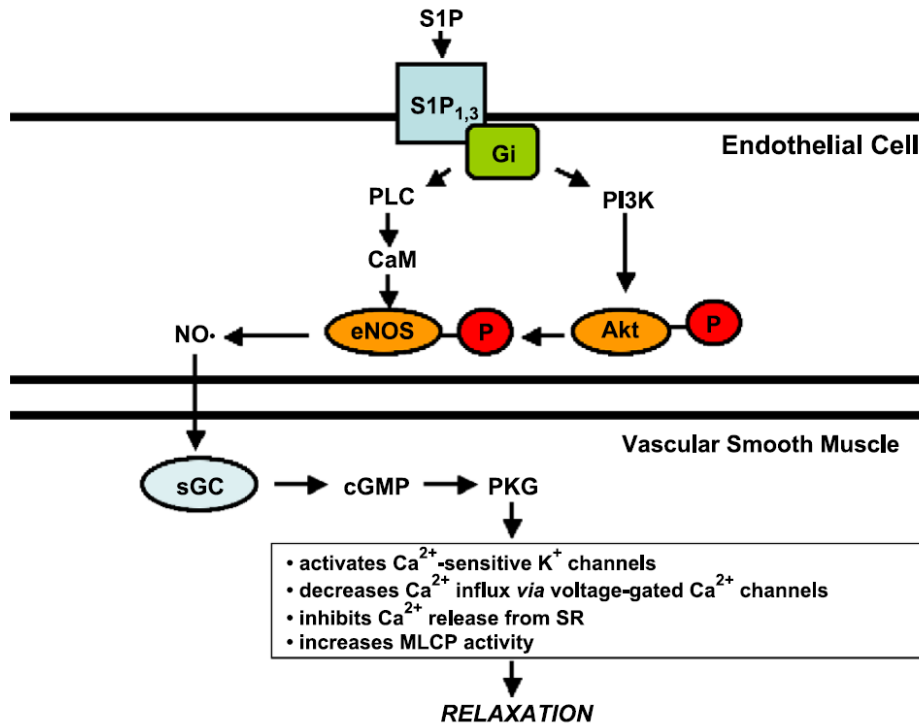


Şekil 4. Sfingozin 1-fosfat sinyalizasyonu (Mendelson ve diğeri, 2014).

2.3.1. Sfingozin-1-Fosfat 1 Reseptörü (S1PR1)

Sfingozin-1-fosfat reseptör 1'in (S1PR1) aktivasyonu, makrofajlar, mast hücreleri, dendritik hücreler ve doğal katil hücreleri (Natural Killer) olmak üzere birçok bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını ve göçünü düzenleyerek bağışıklık sistemi için önemli bir mekanizmayı oluşturmaktadır. (Spiegel ve Milstien, 2011). Özellikle T ve B lenfositlerinin farklılaşması ve göçü, multipl skleroz gibi otoimmün hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar ve S1P'nin etkisiyle S1PR1'lerini çok önemli bir farmakolojik hedef haline getirir (Marciniak, Camp, Garcia ve Polt, 2018). Ek olarak S1P1 reseptörlerinin S1PR1/PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden, proliferasyonu ve

apoptozu düzenlediği de bildirilmiştir (H. Wang, Huang ve Ding, 2018). S1PR1lerinin tüm bu etkilerinin yanı sıra endotel vasküler tonusun homeostazında da rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. (Levkau, 2008). S1P'nin vasküler tonus üzerindeki mekanizması, endotel ve düz kas hücrelerinde bulunan farklı reseptörlere bağlanması, üzerinden belirlenir. Damarda bulunan S1P, lokal olarak endotel ve düz kas hücreleri tarafından sentezlenebilir (Kurano ve Yatomi, 2018). S1P'in S1PR1 ve/veya S1PR3'ne bağlanması; AKT'nin, PI3K'yi aktive etmesine bağlı olarak eNOS'un fosforilasyonunu ve NO üretiminin artmasını sağlamaktadır. Ek olarak, S1P kaynaklı NOS aktivasyonunun kısmi olarak Ca²⁺/CaM'ye bağlı olduğu gösterilmiştir. NO, GS aktivasyonuna bağlı olarak sGMP üretimini katalizler. sGMP ise, PKG aktivasyonuna neden olur. PKG, Ca²⁺'yi azaltır ve bu sayede vazodilatasyon gerçekleşir (Şekil 5) (Watterson, Ratz ve Spiegel, 2005).



Şekil 5. S1PR1 ve S1PR3'lerinin olası vazodilatasyon mekanizması (Watterson ve diğerleri, 2005).

2.3.2. Sfingozin-1-Fosfat 2 Reseptörü (S1PR2)

Sfingosin-1-fosfat reseptör 2 (S1PR2)'lerin fonksiyonel birçok görevi vardır. S1PR2'lerin metabolik olarak hem pankreatik hücrelerde hem de karaciğer hücrelerinde işlevi olduğu bildirilmiştir. S1PR2 -/- farelerde yapılan çalışmalarda pankreatik hücrelerin hayatta kalış süresi daha yüksek insülin ve daha düşük glukoz seviyeleri bildirilmiştir (Imasawa, Koike, Ishii, Chun ve Yatomi, 2010). Bu reseptör üzerinden, AKT ve ERK1/2 yolağının aktivasyona bağlı olarak gelişen glukoz kontrolü, safra asidi sentezi ve lipit metabolizması dahil olmak üzere birçok hepatik metabolik yolağı düzenlediği gösterilmiştir (Studer ve diğerleri, y.y.). S1PR2'lerinin bu etkilerinin yanı sıra vazokonstriksiyon etkileri de vardır. Bu etkilerin, sinyal yolları dokudan dokuya farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, bronşiyal düz kas hücrelerinde, S1P/S1PR2 aracılı bronkokonstriksiyon, Rho/ROCK sinyal yolağı üzerinden (Chiba ve diğerleri, 2010) gerçekleşirken, mezenterik vasküler düz kaslarda, S1P/S1PR2 aracılı vazokonstriksiyon, Rho Kinazdan bağımsız, p38-MAPKinaz yolağının aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşir (Hofer ve diğerleri, 2010).

2.3.3. Sfingozin-1-Fosfat 3 Reseptörü (S1PR3)

Sfingosin-1-fosfat reseptör 3 (S1PR3)'lerinin endotel bariyerde (endotel tabakası), vasküler tonusta, kardiyak ve pulmoner fibroziste görev aldığı gösterilmiştir. Dolaşım ve çevre doku arasında bulunan endotel bariyeri, fonksiyonel olarak oldukça önemlidir. Zarar görmesi vasküler sızıntının artmasına, enfeksiyonlara ve kanser hücrelerinin istilasıyla sonuçlanır (Qian Li ve diğerleri, 2021). Yapılan çalışmalarda, S1P'nin yüksek konsantrasyonunun, S1PR3/RhoA/Rho kinaz (ROCK) sinyal yolağı üzerinden endotel bariyeri, G_i/Rac sinyallerine karşı koruduğunu ve vasküler geçirgenliği arttırdığı gösterilmiştir (Garcia ve diğerleri, 2001). S1PR3'lernin vasküler tonus üzerindeki etkileri ise iki türlü gerçekleşir. Endotel hücrelerinde bulunan S1PR3ler, NO üretimini başlatarak vazodilatasyonu tetiklerken (Nofer ve diğerleri, 2004), vasküler düz kas hücrelerinde lokalize S1PR3'ler hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunu arttırırlar ve vazokonstriksiyona sebep olurlar (Murakami ve diğerleri, 2010).

2.3.4. Sfingozin-1-Fosfat 4 Reseptörü (S1PR4)

S1P4 reseptörünün, immün sistem başta olmak üzere sinir sisteminde de bulunduğu söylenmektedir (Langeslag ve Kress, 2020). S1P4 reseptörü, immün hücre yanıtı, lenfosit olgunlaşması ve tümör ilerlemesi gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynamaktadır. Özellikle immün hücrelerin göçünde kritik bir rol oynadığı ve immün yanıtların düzenlenmesinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Olesch ve diğerleri, 2017). Bununla birlikte S1P4 reseptörü, Multiple Skleroz gibi otoimmün hastalıkların gelişiminde (Sic ve diğerleri, 2014) ve kanserde de rol oynadığı çalışmalarda bildirilmiştir (Furuya, 2017). S1P4 reseptörünün farmakolojik olarak hedeflenmesi, otoimmün hastalıklar ve kanser tedavisi için yeni terapötiklerin geliştirilmesinde umut verici sonuçlar göstermiş olup, S1P4 reseptörü, immün ilişkili hastalıklar ve kanser için yeni terapötiklerin geliştirilmesi için önemli bir hedeftir.

2.3.5. Sfingozin-1-Fosfat 5 Reseptörü (S1PR5)

S1PR5'leri, hücre göçü (Miron, Schubart ve Antel, 2008), proliferasyon (W. M. Hu ve diğerleri, 2010), hayatta kalma ve farklılaşma gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alır (Jaillard ve diğerleri, 2005). S1P5 reseptörü, sfingosin-1-fosfat (S1P) ile aktive olur ve S1P bağlanması reseptörde konformasyonel bir değişikliğe neden olarak, hücre içi sinyal yollarını aktive eder. S1P5 reseptörü aktive olduktan sonra, adenilat siklazı inhibe ederek siklik AMP (cAMP) seviyelerini azaltan G α i/o yolu (Niedernberg, Blaukat, Schöneberg ve Kostenis, 2003) ve Rho GTPaz'ları aktive eder ve hücre iskeletinde değişikliklere yol açan G α 12/13 yolu dahil birçok hücre sel sinyal yolağının aktivasyonunu sağlar (Novgorodov, El-Awani, Bielawski, Obeid ve Gudz, 2007). S1P5 reseptörü, bağışıklık sistemi, kardiyovasküler sistem, merkezi sinir sistemi (Langeslag ve Kress, 2020) ve üreme sistemi (Guo, Ou, Li ve Han, 2014) de dahil olmak üzere düz kas hücreleri, oligodendrositler (Jaillard ve diğerleri, 2005), astrositler (Langeslag ve Kress, 2020) ve prostat gibi birçok dokuda bulunur (Chang ve diğerleri, 2009). S1P5 reseptörlerinin lenfositlerin düzenlenmesi gibi süreçlerde de rol oynadığı gösterilmiştir (Mayol, Biajoux, Marvel, Balabanian ve Walzer, 2011). Son çalışmalar, S1P5 reseptörünün Multiple Skleroz (Scott ve diğerleri, 2016) ve kanser gibi çeşitli hastalıkların gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynayabileceğini öne sürmüştür (P. Wang ve diğerleri, 2019). S1P5 reseptörü, özellikle otoimmün

hastalıklar ve kanser tedavisi için ilaç geliştirme açısından umut verici bir hedef olarak ortaya çıkmıştır.

2.3.6. S1P'nin Kardiyovasküler Sistemdeki Fonksiyonları

S1P'nin kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri, S1PR1, S1PR2 ve S1PR3 reseptörleri ile bu reseptörlerin aktivasyonu ile başlayan alt mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca, S1P'nin taşınmasında görevli albümin ve HDL ile S1P üretiminden görevli enzimlerin de S1P'nin fonksiyonlarını etkilediği bildirilmektedir.

2.3.7. S1P'nin Kan Damarlarındaki Etkisi

Endotel hücrelerde (EC'lerde) S1P; S1PR1 ve S1PR3 reseptörleri aracılığıyla endotel bariyerin korunmasında, vasküler tonusta, inflamasyonda, lenfosit ilişkili olaylarda, kemotaksis ve bağışıklıkta önemli bir rol oynar (Anwar ve Mehta, 2020; Qiu ve diğerleri, 2022). Bu hücrel süreçlerin meydana gelmesi, S1P'nin konsantrasyonuna, dokulardaki S1PR ekspresyon düzeylerine ve kenetli oldukları G-proteinlerinin çeşitliliğine bağlıdır (N. Li ve Zhang, 2016). Çoğu EC'de, S1PR1 yüksek düzeyde eksprese edilirken, bunu S1PR3 ve daha az ölçüde S1PR2 izler. (Du ve diğerleri, 2012). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar, S1PR1'nin, Gαi aracılığıyla, PI3K/ERK yollarını aktive ettiğini ve bu sinyal yolları üzerinden EC'lerde endotel bariyer fonksiyonunu koruduğunu bildirmiştir (Anwar ve Mehta, 2020). Farelerle yapılan bir çalışma S1PR1'nün, EC yaralanması sırasında SK1'in transkripsiyonunu artırarak S1P üretimini ve endotel hücre geçişini arttırdığını ve vasküler onarıma katkı sağladığı bulunmuştur (Akhter ve diğerleri, 2021). S1PR1'in aksine, S1PR2'nin GTPaz Rho/ROCK ve fosfataz yollarını aktive ettiği ve paraselüler geçirgenliği artırmak için AKT fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Winkler ve diğerleri, 2017). Liu ve ark. (H. Liu ve diğerleri, 2017) yüksek glukozun; insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC'lerde) S1PR2 ekspresyonunu arttırdığını ve yüksek glukozla indüklenen mitokondriyal apoptoz, p-AKT and p-GSK3β ekspresyonlarındaki azalma ve EC hasarına karşı, S1PR2 antagonistinin Akt/GSK-3β (PI3K/AKT/glikojen sentetik kinaz 3β (GSK-3β) sinyal yolağının aktivasyonu aracılığıyla endotel hücrelerini yüksek glukozun neden olduğu mitokondriyal apoptoza karşı koruduğunu bildirmişlerdir. S1P'nin ayrıca *in vivo* olarak endotel bariyer bütünlüğünü artırdığı, sıçanlarda aşırı mikrovasküler geçirgenliği önlediği ve hemorajik şok sonrası hastalarda koruyucu etkiler gösterdiği doğrulanmıştır (Alves, Trujillo, Breslin ve

Yuan, 2019; Diebel, Diebel ve Liberati, 2019). Ayrıca, EC'lerde S1PR1 eksikliğinde, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü 2'nin (VEGFR2) inhibisyonunun yetersiz kaldığı bu nedenle vasküler bariyer fonksiyonunun bozulduğu ve anormal anjiyogenez olduğu bulunmuştur (Gaengel ve diğerleri, 2012). Yakın zamanda, EC'ler tarafından üretilen S1P'nin, S1P1-transporter Spns2 aracılığıyla salıverilmesinin yapısal EC bariyerin sürdürülmesine önemli katkıda bulunduğu ve S1P'nin EC bariyerini stabilize eden en etkili sinyal moleküllerinden biri olduğu ve stabilizasyonun esas olarak S1PR1 aracılığıyla iletildiği gösterilmiştir (Jeya Paul ve diğerleri, 2020). S1P'nin vasküler tonus düzenlenmesindeki rolü araştırılmış ve EC'lerdeki S1P/S1PR1/3 sinyalinin, AKT/endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivasyonunu ve NO üretimini aktive ederek, endotel bağımlı vazodilatasyonu teşvik ettiği doğrulanmıştır (Lee ve diğerleri, 2018). Son yıllarda yapılan çalışmalar, S1P/S1PR1-3 sinyalinin genellikle VSMC proliferasyonu, göçü ve VSMC bağımlı vasküler tonus düzenlenmesinde rolü olduğunu göstermektedir (Jozefczuk ve diğerleri, 2020). Ancak aynı zamanda S1P'nin, Rho kinazlarının aktivasyonu ile VSMC'lerde metalloproteinaz inhibitörleri-2 (TIMP-2) salıverilmesini indüklediği ve bu durumun anjiyogenezin inhibisyonunu sağladığı da gösterilmiştir (Mascall, Small, Gibson ve Nixon, 2012).

2.3.8. S1P'nin Kalpteki Etkisi

S1P'nin; kalp kası kontraksiyonu, kalp hızı ve kardiyak fibroblastlar üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. S1PR1-3, kalpte eksprese edilen S1PR alt izoformlarının başlıcalarıdır ve bu reseptör alt tiplerinin farklı kalp hücre tiplerinde ekspresyonları, farklı düzenleyici etkileri ve kardiyak performansa etkileri bulunmaktadır (Christopher K. Means ve Brown, 2009). S1PR1'in öncelikle kardiyomiyositlerde eksprese edildiği, S1PR3'ün fibroblastlarda en yaygın alt tip olduğu ve S1PR2'nin her ikisinde de eksprese edildiği kabul edilmektedir. S1P-S1PR1 sinyalleme ile, G α i'nin aktive olduğu ve bunun miyosit kılmasını azalttığı ve negatif inotropik etkilerin ortaya çıktığı gösterilmiştir (Landeem ve diğerleri, 2008). Başka bir çalışma, S1P-S1PR2/3-G α i yolaklarının erişkin fare ventriküler miyositlerinde, izoproterenol-stimülasyonlu cAMP birikimini inhibe etmek için AKT ve ERK'yi aktive ettiğini ve negatif inotropik yanıtı neden olduğunu göstermiştir (Christopher Kable Means, Miyamoto, Chun ve Brown, 2008). S1PR1 knock-out farelerde, kardiyomiyopati,

dobutamin yanıtlarında bozulmalara ve erken ölüme neden olmuştur. Bu durum S1P'nin kalp kası kontraksiyonunun gerçekleşmesinde iletimdeki rolünü doğrulamıştır (Keul ve diğerleri, 2016). S1P aynı zamanda kalp hızını inhibe eder, bunun temel nedeni S1PR1'i aktive etmesidir. Birçok çalışma, S1PR modülatörleri ile uzun süreli tedavinin, kardiyak miyositlerde S1PR'lerin potasyum kanallarını uyararak kalbin otonom aktivasyonunu azaltabileceğini rapor etmektedir (Constantinescu, Haase, Akgün ve Ziemssen, 2022; Hwang ve diğerleri, 2022). Bu nedenle, S1P, kalp ritmini düzenlemedeki önemli rolü nedeniyle aritmi tedavisi için potansiyel bir hedef olarak kabul edilmektedir.

2.4.Sfingozin Kinaz Enzimleri (SK)

Sfingozin kinaz (SK), çeşitli hücrel süreçlerde rol oynayan biyoaktif bir lipit olan sfingozini, sfingozin-1-fosfata (S1P) dönüştüren bir lipit kinaz enzimidir (Maceyka, Payne, Milstien ve Spiegel, 2002). SK'nın SK-1 ve SK-2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır (Hait, Oskeritzian, Paugh, Milstien ve Spiegel, 2006). SK-1 çoğunlukla sitozolde bulunurken, SK-2 çekirdekte de bulunur (Heffernan-Stroud ve Obeid, 2013). SK ve SK/S1P yolu, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynar. Hücre proliferasyonu, farklılaşması, migrasyonu, anjiyogenez (Kohno ve diğerleri, 2006) hayatta kalma (Olivera ve diğerleri, 2003), ayrıca inflamasyon (C. Wang ve diğerleri, 2021), ve kanser gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte etkin olduğu düşünülmektedir (Heffernan-Stroud ve Obeid, 2013). Bu yolak, kardiyovasküler hastalıklar (D. D. Song, Zhou ve Sheng, 2018), nörodejeneratif bozukluklar (Motyl ve Strosznajder, 2018) ve metabolik bozukluklarla da ilişkilendirilmiştir (Kwong, Li, Hylemon ve Zhou, 2017). SK/S1P yolağı farmakolojik olarak hedef alındığında, kanser (Beljanski, Knaak ve Smith, 2010), inflamasyon ve otoimmün bozukluklar gibi birkaç hastalığın tedavisinde umut verici sonuçlar vermiştir (O. A. Sukocheva ve diğerleri, 2020). SK inhibitörleri geliştirilmiş ve bu koşullar için potansiyel tedaviler olarak ön klinik ve klinik çalışmaların konusu olmuştur. Özetle, SK, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde kritik bir rol oynayan biyoaktif bir lipit olan S1P'nin oluşumunda görev alan önemli bir enzimdir.

2.4.1. Sfingozin Kinaz 1 (SK-1)

SK1, biyoaktif bir lipit olan sfingozin-1-fosfat (S1P) sentezini katalize eden bir enzimdir ve hücre içi sinyal yollarında kritik bir rol oynar (Kawamori ve diğerleri, 2009). SK1, immün hücreleri, kanser hücreleri (Tsuchida ve diğerleri, 2020) ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere farklı dokularda ve hücre tiplerinde yaygın olarak görülür (Tauseef ve diğerleri, 2008). SK1; protein kinaz C (PKC) (Nakade ve diğerleri, 2003), ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) (O. Sukocheva, Wang, Verrier, Vadas ve Xia, 2009) ve fosfatidil inozitol 3-kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolları dahil olmak üzere bir çok sinyal yolağı tarafından düzenlenir (Libing Song ve diğerleri, 2011). Bununla birlikte, reaktif oksijen türleri (ROT) (Takuwa ve diğerleri, 2010), sitokinler (Nayak ve diğerleri, 2010) ve büyüme faktörleri gibi diğer faktörler de SK-1 aktivitesini düzenleyebilir/değiştirebilirler (Miller, Alvarez, Spiegel ve Leberman, 2008). Ayrıca, fosforilasyon ve asetilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlara tabidir, bu da aktivitesini etkileyebilir. SK-1/S1P yolu, hücre proliferasyonu, migrasyonu, hayatta kalma, anjiyogenez ve inflamasyon dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer almaktadır (Chan ve Pitson, 2013). SK-1; kanser (Heffernan-Stroud ve Obeid, 2013), kardiyovasküler hastalık (Józefczuk ve diğerleri, 2019) ve otoimmün bozuklukların gelişimi ve ilerlemesi ile de ilişkilendirilmiştir (Ashley J Snider, 2014). SK-1'nin farmakolojik olarak hedeflenmesi, çeşitli hastalıklar için potansiyel bir tedavi stratejisi olarak umut verici sonuçlar göstermiştir. SK-1 inhibitörleri, kanser (Pchejetski ve diğerleri, 2008), inflamatuvar hastalıklar ve otoimmün bozuklukların potansiyel tedavileri olarak prelinik ve klinik çalışmalarda geliştirilmiş ve test edilmiştir (Michaud, Kohno, Proia ve Hla, 2006). SK-1 aktivatörleri, osteoporoz için potansiyel tedaviler olarak araştırılmaktadır (Ji ve diğerleri, 2015). Tüm bu etkilerinin yanı sıra SK-1/S1P yolağı, kan basıncı ve kan akımının düzenlenmesi (korunması) için kritik olan vasküler tonusun düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar (Spijkers, Alewijnse ve Peters, 2012). Ayrıca, SK-1'in farmakolojik inhibisyonunun, hayvan ve insan çalışmalarında endotele bağılı vazodilatasyonu bozduğu gösterilmiştir (Roviezzo ve diğerleri, 2006). SK-1, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivasyonu (Roviezzo ve diğerleri, 2006), Rho kinaz (ROCK) inhibisyonu (Bolz ve diğerleri, 2003) ve Ca²⁺ aktive olan K⁺ (SKCa) kanallarının aktivasyonu gibi birden fazla mekanizma aracılığıyla vasküler tonusun düzenlenmesini sağlar (Dantas ve diğerleri, 2003). S1P aracılı eNOS

aktivasyonu, nitrik oksit (NO) üretimine neden olur. Ayrıca, S1P aracılı ROCK inhibisyonu, vasküler düz kas hücrelerinde kasılmanın azalmasına neden olur ve bu da vazodilatasyonu teşvik eder. Son olarak, S1P aracılı SKCa kanallarının aktivasyonu, vasküler düz kas hücrelerinin hiperpolarizasyonuna neden olarak vazodilatasyonu sağlar. Sonuç olarak, SK-1; S1P üretimi ve eNOS aktivasyonu, ROCK inhibisyonu ve SKCa kanallarının aktivasyonu yoluyla vasküler tonusun düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Ancak SK-1 ve vasküler tonusun düzenlenmesi üzerine daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

2.4.2. Sfingozin Kinaz 2 (SK-2)

Sphingosine kinaz 2 (SK-2), lipit kinaz ailesine ait olan ve hücre içi sinyalleme düzenlenmesinde kritik rol oynayan bir enzimdir (Diaz Escarcega ve diğerleri, 2021). SK-2 de, SK-1 gibi sfingozini sfingozin-1-fosfata (S1P) dönüştürür ve çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçleri düzenlemede görev alır (Neubauer ve Pitson, 2013). SK-2, beyin (Dominguez ve diğerleri, 2018), kalp (Vessey ve diğerleri, 2007), karaciğer (Kwong ve diğerleri, 2019) ve bağışıklık hücreleri gibi çeşitli dokularda ve hücre tiplerinde yaygın olarak görülür (Kharel ve diğerleri, 2005). Çekirdekte (Heffernan-Stroud ve Obeid, 2013), mitokondri (Shi ve diğerleri, 2012) ve sitozol de bulunmaktadır (Igarashi ve diğerleri, 2003). SK-1 ve SK-2, aynı fonksiyonlara sahip olmalarına ve aynı reaksiyonu katalizlemelerine rağmen, farklı fizyolojik işlevlere ve düzenleyici etkilere sahiptir (Pitson, 2011). Büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından aktive edilen SK-1'in aksine, SK-2, konstitütif olarak aktiftir ve aktivitesi intrasellüler lokalizasyon, protein-protein etkileşimleri ve post-translasyonel modifikasyonlar tarafından düzenlenir (Chan ve Pitson, 2013). SK-2, hayatta kalma (Neubauer ve Pitson, 2013), apoptoz (Venkata ve diğerleri, 2014; Weigert ve diğerleri, 2010), otofaji (R. Sheng ve diğerleri, 2014) ve inflamasyon gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynar (Pyne, Adams ve Pyne, 2017). Ayrıca, lipit metabolizması (Kwong ve diğerleri, 2019) ve metabolizma homeostazında kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (W. E. I. Chen, Lu, Yang, Xiang ve Peng, 2016). Hastalık patogenezi ve terapötik hedefleme bağlamında yaygın olarak çalışılan SK1'in aksine, SK-2'nin rolü daha az anlaşılmıştır. Özetlemek gerekirse, SK2, hücre içi sinyalleme düzenlenmesinde ve çeşitli fizyolojik süreçlerde kritik rol oynayan önemli bir enzimdir. SK-2 enziminin

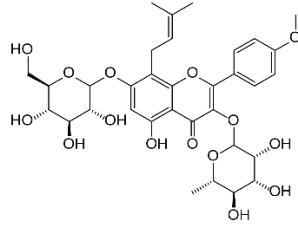
anlaşılması ve fonksiyonel yanıtlarının tanımlanması için daha fazla araştırmaya gerek vardır.

2.5.Seramidaz Enzimi

Seramidaz, seramidin sfingozin ve yağ asidine hidrolizini katalizleyerek, sfingolipit metabolizmasında kritik rolü olan önemli bir enzimdir (Park ve Schuchman, 2006). Bu reaksiyon, seramidin hücre sel sinyalizasyonu ve metabolik düzenleyici etkisi için, oldukça önemli bir mekanizmadır (Ga ve diğerleri, 1996). Asit seramidaz, öncelikle lizozomlarda bulunur ve hücre tarafından endositoz veya otofaji yoluyla alınan seramidin parçalanmasından sorumludur (Okino ve diğerleri, 2003). Nötr seramidaz, Golgi aygıtında bulunur ve kompleks sfingolipitlerin sentezinde rol oynar (Coant ve Hannun, 2019). Alkalin seramidaz, plazma membranında bulunur ve hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli roller oynar (R. Xu, Antwi ve Mao, 2021). Seramidaz aktivitesinin inhibisyonu, bazı kanser türleri ve diğer hastalıklar için potansiyel bir terapötik strateji olarak önerilmiştir (Dong, El-zawahry, Guo, Hannun ve Holman, 2008). Seramidazın bu önemli etkilerinin yanı sıra vasküler tonusun düzenlenmesindeki etkileri de tartışılmaktadır. Seramidaz'ın, güçlü bir vazokonstriktör ve vazodilatör olan sfingosin-1-fosfat (S1P) seviyelerini düzenleyerek vasküler tonusun düzenlenmesinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Cogolludo, Villamor, Perez-vizcaino ve Moreno, 2019). Sıçan aortasında yapılan bir çalışmada, seramidaz inhibisyonunun vasküler tonus üzerindeki etkileri araştırılmış, seramidaz inhibisyonunun, asetilkolinin vazodilatör yanıtını azalttığını gözlemlenmiştir. Tüm bunlar seramidaz'ın vasküler tonusun düzenlenmesinde bir rol oynama olasılığını daha da güçlendirmektedir (Roviezzo ve diğerleri, 2006). Ancak bu düzenleyici sürecin altında yatan mekanizmaları tam olarak aydınlatmak ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde seramidaz inhibisyonunun potansiyel terapötik uygulamalarını keşfetmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

2.6.İcariin

İcariin (**Şekil 6**), antioksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser ve nöroprotektif etkiler de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinen bir flavonoidtir (He, Wang ve Shi, 2020).



Şekil 6. İcariin

Bunların yanı sıra icariin'in hayvan modellerinde erektil disfonksiyona sahip hayvanlarda ereksiyon fonksiyonunu iyileştirebileceği gösterilmiştir (W. J. Liu ve diğerleri, 2005). Ayrıca, icariin'in erkek sıçanlarda testosteron seviyelerini artırdığı ve dişi sıçanlarda östrojenik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Yang ve diğerleri, 2013; Z. Zhang ve Yang, 2006). Cinsel fonksiyon üzerindeki etkilerinin yanı sıra, icariin'in çeşitli diğer durumlarda potansiyel terapötik faydaları için de çalışılmıştır. Örneğin, icariin, romatoid artrit hayvan modellerinde anti-inflamatuar etkilere sahip olduğu (Z. Wu ve diğerleri, 2022) ve parkinson hastalığı hayvan modellerinde nörodejenerasyona karşı koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Rafi, Morteza ve Berenji, 2022). İcariinin, akciğer kanseri (Zhu ve Ren, 2022), meme kanseri (Linjiang Song ve diğerleri, 2020) ve karaciğer kanseri gibi çeşitli kanser hücrelerinin de büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (W. Li, Wang ve Wang, 2014). Yapılan çalışmalarda, pro-enflamatuvar sitokin üretimini inhibe ettiği gösterilerek, icariinin vücuttaki enflamasyonu azaltma potansiyeline sahip olduğunu öne sürülmektedir (Luo, Dong ve Wu, 2022). Başka bir çalışmada ise, icariinin farelerde enflamasyonu azalttığı bulunmuş ve bu da iltihabi barsak hastalığı için terapötik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir (H. Zhang ve diğerleri, 2021). Ayrıca, icariinin, anti-enflamatuvar etkilerini çeşitli deneysel modellerde değerlendirerek, osteoartrit ve ateroskleroz modelleri de dahil olmak üzere çeşitli modellerde enflamasyonu azaltmada etkili olduğu bulunmuştur (Bi, Zhang ve Yan, 2022). Bu etkilerinin yanı sıra icariin antioksidan etkileri de araştırılmaktadır. Çalışmada icariin'in güçlü bir serbest radikal tutucu aktiviteye sahip olduğu ve insan karaciğer hücrelerinde oksidatif hasara karşı koruma sağlayabildiği bulunmuştur (Q. P. Chen ve Wei, 2013). Başka bir çalışmada ise icariinin antioksidan aktivitesini değerlendiren Algardaby ve arkadaşları, icariinin güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve sıçan karaciğer hücrelerinde oksidatif stresle indüklenen hasara karşı koruma sağlayabildiğini bulmuşlardır (Algardaby ve diğerleri, 2017). İcariinin antioksidan

etkileriyle ilgili mevcut kanıtlar, icariinin güçlü antioksidan aktivitesine sahip olduğunu ve bu etkilerin serbest radikalleri yok etme, lipid peroksidasyonunu engelleme ve antioksidan enzimlerin aktivitesini artırma yeteneğiyle ilişkilidir. Genel olarak, bu ve diğer çalışmalar, icariinin önemli bir antioksidan aktivitesine sahip olduğunu ve oksidatif stresle ilişkili durumlar için terapötik bir ajan olarak potansiyel kullanımının önemli sonuçları olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu etkilerin mekanizmalarını tam olarak anlamak ve klinik kullanım için optimal dozları ve uygulama yollarını belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Q. P. Chen ve Wei, 2013). İcariin'in multipl skleroz (MS) üzerindeki potansiyel etkilerini araştıran bilimsel çalışmalar da mevcuttur. MS fare modelinde icariin'in potansiyel nöroprotektif etkileri araştırılmış, çalışmada, icariin ile tedavi edilen farelerin klinik semptomların şiddetinde azalmalar ve merkezi sinir sistemindeki inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (Cong ve diğerleri, 2020). Mevcut kanıtlar icariin'in MS'de potansiyel terapötik etkilere sahip olabileceğini, muhtemelen inflamasyonu azaltarak ve nörodejenerasyona karşı koruyarak bu etkiyi gösterebileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu etkilerin doğrulanması ve klinik kullanım için optimal dozlar ve uygulama yollarının belirlenmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Gao, Zheng, Hao, Yang ve Hu, 2023). İcariin'in etki mekanizmalarından biri de, vazodilatasyon, nörotransmisyon ve immün yanıt dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan nitrik oksit (NO) üretimini artırma yeteneğidir (H. Bin Xu ve Huang, 2007a). İcariin, NOS aktivitesini ve buna bağlı olarak vücutta NO üretimini artırarak vazodilatasyon sağlar (W. J. Liu ve diğerleri, 2005). Çeşitli çalışmalar icariin ile NO arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Yapılan bir çalışma, icariin'in HUVEC'lerde NO üretimini önemli ölçüde artırdığını ve endotel fonksiyonunu iyileştirdiğini bildirmiştir (Koizumi, Yu, Hashimoto, Ouchi ve Okabe, 2010). Başka bir çalışma da ise, icariin'in sıçanlarda NO üretimini ve düz kas gevşemesini artırarak ereksiyon fonksiyonunu iyileştirdiğini bulmuştur (W. J. Liu ve diğerleri, 2005). Tüm bunlar icariinin, nitrik oksit (NO) sentezini artırarak, vazoaaktif faktörlerin inhibisyonunu ve hücrel sinyal yollarının modülasyonunu da içeren birkaç mekanizma aracılığıyla vasküler tonusu düzenleyebileceğini gösterilmiştir.

NO sentezi üzerindeki etkilerinin yanı sıra, icariin aynı zamanda endotelin-1 (ET-1) (L. Hu ve diğerleri, 2019) ve anjiyotensin II (Ang II) gibi vazoaaktif vazokonstriktör faktörlerin aktivitesini de inhibe edebilir (W. Zhang, Yuan, Xu, Li ve Chang, 2017).

Ayrıca, icariin, vasküler tonusu düzenleyen protein kinaz C (PKC) (Y. Zhang ve diğerleri, 2021) ve mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) gibi hücresel sinyal yollarını da düzenleyebilir (Shao-Rui ve diğerleri, 2010). Bu bulgular, icariinin, NO sentezini artırdığını, vazokonstriktif faktörleri inhibe ettiğini ve intraselüler sinyal yollarının modülasyonu gibi birden fazla mekanizma aracılığıyla vasküler tonusun düzenlenmesine yardımcı olabileceğini göstermektedir. Genel olarak, icariin ve nitrik oksit arasındaki ilişki önemli bir araştırma alanıdır ve icariin'in etki mekanizmalarını ve potansiyel terapötik uygulamalarının ve etki mekanizmalarının tam olarak anlamak ve vasküler tonusun düzenlenmesindeki potansiyel terapötik uygulamalarının belirlenmesi için daha fazla çalışma gerekmektedir.



Gereç ve Yöntem

3.1.Deneyde Kullanılan Hayvanlar

Çalışmalarda 250-300 g ağırlığında yetişkin erkek (21) ve dişi (18) Sprague-Dawley (Şekil 7) sıçanları kullanılmıştır. Sıçanlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık döngüsünde 20-24 °C sıcaklıktaki havalandırılmalı odalarda barındırıldı ve ad libitum beslenmeleri sağlandı. Tez süresince yapılan tüm deneyler Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı alındıktan sonra Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.



Şekil 7. Sprague-Dawley

Tablo 1. Deneyde Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihaz	Üretici Firma / Ülke
Analitik Terazisi AS 220 R2 (220g/0.0001 g)	Radwag / Polonya
Hassas Terazisi L4202i (4200g/0.01 g)	Bel Engineering / İtalya
Su Banyosu	Memmert / Almanya
pH indikatör strip (0-14)	Merck / Almanya

İzole Organ Banyosu Sistemi	DanishMyograph / Danimarka
Powerlab 8/30	AD Instruments / Avustralya
PowerlabOctal Bridge Amp	AD Instruments / Avustralya
Reusable BP Transducer	AD Instruments / Avustralya

Tablo 2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan Kimyasal Madde	Üretici Firma / Ülke
Ketamin (Alfamine® %10)	Alfasan / Hollanda
Ksilazin (Alfazyne® %2)	Alfasan / Hollanda
KCl	Riedel de Haen
NaCl	AppliChem
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
NaHCO ₃	Riedel de Haen
D-(+)-glukoz monohidrat	Sigma
Fenilefrin	Sigma
Asetilkolin	Sigma
Sodyum nitroprussid dihidrat	Sigma
İcariin	Cayman Chemical

W146	Cayman Chemical
CAY10444	Cayman Chemical
D-erythro-MAPP (MAPP)	Cayman Chemical
N,N-Dimethylsphingosine (DMS)	Cayman Chemical

3.2. İzole Organ Banyosunda Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması

Potasyum Klorür (KCl): Stok çözeltisi (2M) krebeste çözülerek taze hazırlanmıştır.

Asetilkolin (ACh): Stok çözelti (10^{-1} M) %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile taze hazırlanmış, ileri seyreltmeler %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile yapılmıştır.

Fenilefrin (Fen): Stok çözelti (10^{-1} M) %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile taze hazırlanmış, ileri seyreltmeler %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile yapılmıştır.

Icariin (ICA): Stok çözeltisi (10^{-2} M) DMSO da çözülerek taze hazırlanmış, ileri seyreltmeler DMSO ile yapılmıştır.

W146: Stok çözeltisi ($1,23 \times 10^{-3}$) metanolde çözülerek taze hazırlanmıştır.

CAY10444: Stok çözeltisi (10^{-2} M) DMSOda çözülerek taze hazırlanmıştır.

D-erythro-MAPP (MAPP): Stok çözeltisi (5×10^{-3} M) etanolde çözülerek taze hazırlanmıştır.

N,N-Dimethylsphingosine (DMS): Stok çözeltisi ($7,6 \times 10^{-2}$ M) etanolde çözülmüş bir şekilde satın alındı.

3.1. Krebs Çözeltisinin Hazırlanması

3.1.1. Konsantre Krebs (20X) Hazırlanması

Tablo 3'te verilen maddeler hassas terazide tartılarak bir miktar distile su içerisinde çözüldürüldükten sonra distile su ile hacim 2 litreye tamamlandı.

Madde	Miktar (g)
KCl	14
MgSO ₄ .7H ₂ O	11.9
KH ₂ PO ₄	6.4
NaCl	276

Tablo 3. Konsantre Krebs Hazırlanmasında Kullanılan Maddeler

3.1.2. Normal Krebs Hazırlanması

Konsantre krebs çözeltilisinin 100 ml'si bir miktar distile su içerisine alındı. Ardından **tablo 4** de verilen maddeler hassas terazide tartılarak üzerine eklendi ve distile su ile hacim 2 litreye tamamlandı.

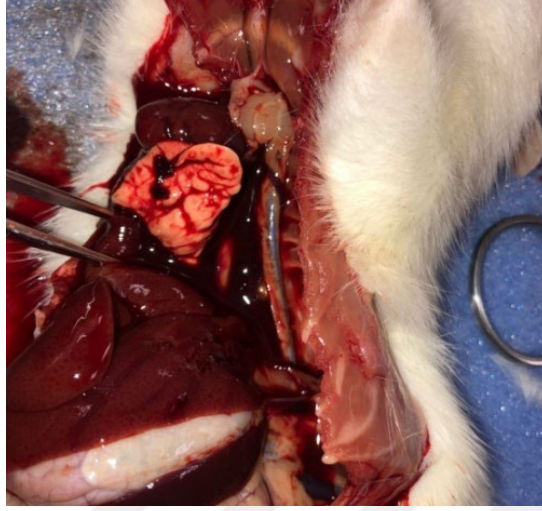
Madde	Miktar (g)
NaHCO ₃	4.2
D-(+)-glukoz monohidrat	4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.74

Tablo 4. Normal Krebs Hazırlamada Kullanılan Maddeler

3.2. İzole Organ Banyosu Deneyleri

Her gün bir sıçan kurbanı edildi (**Şekil 8**) ve elde edilen aortaların dokuları 4 mm halka halinde kesilerek 8 banyolu PanLab'a (ADInstruments) asıldı (**Şekil 9**). 10 mL'lik organ banyoları %95 O₂, %5 CO₂ karışımıyla sürekli olarak gazlandırılmış

37°C’de pH’sı 7,4 olan Krebs solüsyonu (mM olarak NaCl 118; KCl 4,8; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 24; glikoz 11; MgSO₄ 1,2) ile dolduruldu.



Şekil 8. Aorta Doku İzolasyonu

Aortalar 2 g ön gerilime tabi tutuldu ve banyo içerisindeki Krebs solüsyonu 15 dakikalık aralıklar ile değiştirilerek 60 dakika stabilizasyon için beklenildi. Her konsantrasyon-yanıt arasında 10 dakikalık aralıklarla 30 dakikalık yıkama periyodu uygulanarak dokular agonistlerden uzaklaştırıldı. Sonuncu yıkamada banyo hacmi 10 ml’ye ayarlanarak dokunun önceki bazal düzeyine gelmesi beklendi. İzometrik gerilimdeki değişiklikler Powerlab kayıt sistemi ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Dokuların endotel düzeylerinin tespiti ve canlılıklarını test etme amacıyla önce dokular bir kez 10^{-7} M Fenilefrin (fen) ile kastırılıp ardından Asetilkolin (ACh, 10^{-5} M) ile gevşetildi. Dokunun asetilkoline karşı verdiği gevşeme yanıtı %60’tan az ise değerlendirme dışı bırakıldı (Ozsarlak-Sozer, Sevin, Ozgur, Yetik-Anacak ve Kerry, 2016; Yetik-Anacak ve diğerleri, 2015). İcariinin inkübasyon konsantrasyonuna, gevşeme yanıtları üzerinden EC₅₀ (3×10^{-6} M) değeri hesaplanarak karar verildi. Deney boyunca aşağıdaki protokoller izlendi;



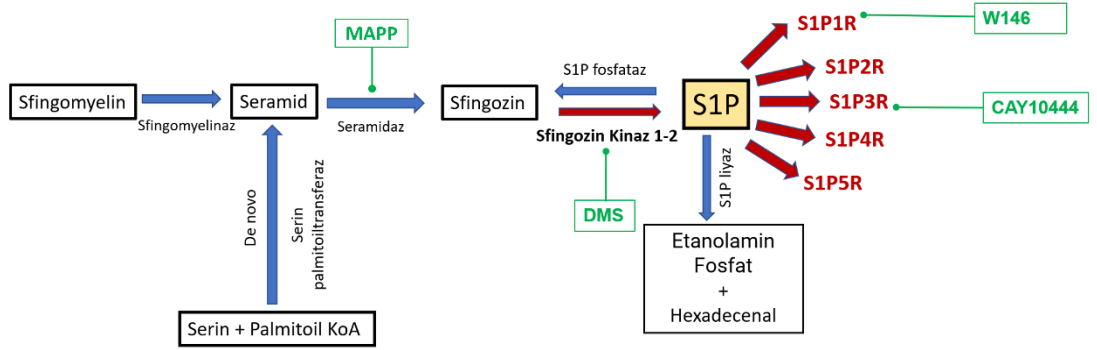
Şekil 9. PanLab

3.2.1. Protokol 1: İCA gevşemelerinin NO sentezi ve S1PR1, S1PR3, SK-1, SK-2, Ser ile ilişkisinin araştırılması

- Fen (10^{-7} M) ile kastırılıp İcariin (İCA, 3×10^{-7} M - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları,
- İCA'nın gevşeme yanıtlarında endotelin etkisinin araştırılması için endotelsiz aorta halkarında fen (10^{-7} M) ile kastırılıp İCA (3×10^{-7} M - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları alındı.
- L-NAME (100 μ M, 30 dk.) (Aras-López ve diğerleri, 2008) varlığında fen (10^{-7} M) ile kastırılıp İCA (3×10^{-7} M - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları,
- W146 (S1PR1 selektif antagonisti, (1-3 μ M, 30 dk.) (Greig ve diğerleri, 2019) varlığında fen (10^{-7} M) ile kastırılıp İCA (3×10^{-7} M - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları.
- CAY10444 (S1PR3 selektif antagonisti, (10-30 μ M, 30 dk.) (Mair ve diğerleri, 2010) varlığında fen (10^{-7} M) ile kastırılıp İCA (3×10^{-7} M - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları,
- DMS (SK-1 ve SK-2 antagonisti, (10-30 μ M, 30 dk.) (Mulders ve diğerleri, 2009) varlığında fen (10^{-7} M) ile kastırılıp İCA (3×10^{-7} M - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları,
- Çözücü (DMSO)'nun gevşeme yanıtlarına etkisinin araştırılması için fen (10^{-7} M) ile kastırılıp DMSO gevşeme yanıtları,
- MAPP (Seramidaz inhibitörü, (3-10 μ M, 30 dk.) (Roviezzo ve diğerleri, 2006) varlığında fen (10^{-7} M) ile kastırılıp İCA (3×10^{-7} M - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları,

3.2.2. Protokol 2: İCA'nın vasküler endotele bağlı gevşeme yanıtları üzerindeki etkisi ve bunun S1PR1, SK-1, SK-2 ile ilişkisinin araştırılması

- Fen (10^{-7} M) ile kastırılıp asetilkolin (ACh, 10^{-9} M- 10^{-4} M) gevşeme yanıtları,
- İCA (3×10^{-6} M, 30 dk.) inkübasyonu varlığında fen (10^{-7} M) ile kastırılıp ACh (10^{-9} M- 10^{-4} M) gevşeme yanıtları,
- DMS (10μ M, 30 dk.) (Mulders ve diğerleri, 2009) inkübasyonu varlığında fen (10^{-7} M) ile kastırılıp ACh (10^{-9} M- 10^{-4} M) gevşeme yanıtları,
- DMS (10μ M, 30 dk.) (Mulders ve diğerleri, 2009) ve İCA (3×10^{-6} M, 30 dk.) inkübasyonu varlığında fen (10^{-7} M) ile kastırılıp ACh (10^{-9} M- 10^{-4} M) gevşeme yanıtları alındı.



Şekil 10. Sfingozin sinyal yolağı ve tez süresince kullanılan inhibitörler

3.2.3. Protokol 3: İCA'nın vasküler düz kas gevşemeleri üzerindeki etkisinin NO alt mekanizmaları ile ilişkisinin araştırılması

- Fen (10^{-7} M) ile kastırılıp sodyum nitroprussid (SNP, NO donörü, 10^{-9} M- 10^{-4} M) gevşeme yanıtları,
- İCA (3×10^{-7} M, 30 dk.) inkübasyonu varlığında fen (10^{-7} M) ile kastırılıp SNP (10^{-9} M- 10^{-4} M) gevşeme yanıtları alındı.

3.3.Doku Kültürü

- Doku izolasyonundan sonra dokular 3 parçaya bölündü.
- Ayrılan dokular 12-kuyucuklu petriye dizildi.
- Dokularının üstüne 500 µL %10 FBS içeren antibiyotikli (penisilin, streptamin) DMEM ortamı eklendi.
- Dokulara, gruplar halinde 5 µL 3×10^{-4} M İCA (final konsantrasyonu: 3×10^{-6} M) ve 5 µL DMSO eklendi
- Dokular 24 saat inkübasyonun ardından -80°C 'de saklandı.

3.4.Homojenizasyon

- Aortalar, soğuk Krebs çözeltisi içinde yıkandıktan sonra doku kültürüne alındı.
- Doku kültüründe İCA ve çözücü (DMSO) ile 24 saat inkübe edildi.
- İnkübe edilen dokular sıvı azot içinde donduruldu.
- Dokular homojenizasyona kadar -80°C 'de saklandı.
- Dokular ufak parçalara bölünerek metal tüpler içerisine her bir örnek 20-35 mg olacak şekilde tartıldı.
- Dokular, sıvı azot ve metal bilyeler yardımıyla kriyojenik öğütme yapan Retsch marka CryoMill cihazında toz haline getirildi.
- Toz haline geldikten sonra dokular, proteaz-fosfataz inhibitörleri, 50 mM Tris HCl, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, %1 NP40 (IGEPAL), %0.1 SDS ve %0.1 Deoksikolik asit içeren Fosfat Buffered Saline (PBS) homojenizasyon solüsyonu içerisinde homojenize edildi.
- Örnekler, homojenizasyon solüsyonu ile 1 saat, 4°C 'de rotatörde döndürüldükten sonra 10000 rpm de, 4°C 'de, 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Ependorf tüplerden süpernatantlar (homojenat) alınarak protein konsantrasyonu ölçüldü (Yetik-Anacak ve diğerleri, 2015).
- Homojenatlar, ileri deneyler için -80°C 'de saklandı.

3.5. Bikinkoninik Asit Yöntemi (Bicinchoninic Acid Assay, BCA)

3.5.1. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Homojenizasyon ile izole edilen proteinlerin miktar tayini için “BCA Protein Assay Kit (BioVision)” kullanıldı.

- Farklı konsantrasyonlarda (250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 0 µg/ml) sığır serum albümin (Bovine Serum Album, BSA) standartı referans olarak kullanıldı. Her bir standart 96-kuyucuklu petriye 50 µl eklendi.
- 1/10 oranında seyreltilen sıçan aortası protein örneklerinden 50 µl kuyucuklara eklendi.
- Protein örneklerinin üstüne 100 µl “Working Solution” eklendikten sonra 60°C’de 60 dakika inkübe edildi.
- 562 nm dalga boyundaki emilim değerleri Thermo-Varioskan mikropilaya okutucuda okutuldu.
- BSA standartlarıyla çizilen standart grafikten elde edilen doğrusal denklem kullanılarak protein miktar tayini yapıldı.

3.6. Western Blot DeneYeri

Doku kültüründen alınan aorta dokularındaki S1P1 protein düzeyleri Western Blot yöntemiyle belirlendi. Aorta dokularından izole edilen proteinler SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile yürütüldü. Jeldeki proteinler nitroselüloz membrana transfer edildikten sonra spesifik antikorlar ile inkübe edildi ve membran görüntüledi.

3.6.1. SDS Jel Elektroforezi

- 30 µg protein için gerekli miktar hesaplandıktan sonra toplam hacim 60 µl’ye tamamlandı. 10 µl 6X örnek yükleme tamponu eklendi.
- Hazırlanan protein örnekleri 95°C’de 5 dk inkübe edildikten sonra 1 dk buzda soğutuldu.
- Protein örneklerinin molekül ağırlıklarına göre sıralanması için %8 SDS-PAGE (SDS- poliakrilamid jel elektroforezi) jeline yüklendi.
- Jel tankın içine yerleştirildikten sonra yürütme tamponuyla (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS) 60-120 V koşullarında yürütüldü.

3.6.2. Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Transferi

- Transfer için kullanılan tüm materyaller, transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %20 metanol) ile ıslatıldı.
- Nitroselüloz membran 10 saniye metanolde aktifleştirildi.
- Jel taşıyıcı kaset üzerine sırasıyla sünger, filtre kâğıdı, jel, membran, filtre kâğıdı ve sünger koyulduktan sonra kaset elektrot modülüne yerleştirilip transfer tankına yerleştirildi.
- Transfer tankı transfer tamponuyla doldurulduktan sonra +4°C, 400 mA'de 90 dakika süreyle transfer işlemi gerçekleştirildi.
- Hızlı kuru transfer aparatı (Rapid dry blotting system, Iblot, Invitrogen) kullanılarak proteinler jelden nitroselüloz membrana aktarıldı.

3.6.3. Membranın Bloke Edilmesi ve Antikorlar ile İnkübasyonu

- Membran %5 yağsız süt içeren bloklama tamponuyla (0,1 M Tris, 150 mM NaCl, %0,1 Tween 20) oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek bloklandı.
- Primer S1P1 antikoruna ile +4°C'de gece boyu ve GAPDH antikoruna ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon sonrasında membran yıkama tamponuyla 1 kez 15 dakika ve 3 kez 5'er dakika aralıklarla yıkandıktan sonra sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ve yıkama tamponuyla 1 kez 15 dakika ve 3 kez 5'er dakika aralıklarla yıkandı.

Antikor	Seyreltme Oranı	Marka
S1P1	1:500	BOSS
GAPDH	1:1000	Sigma
Rabbit Sekonder	1:15000	LI-COR
Goat Sekonder	1:15000	LI-COR

Tablo 5. Western Blot antikor dilüsyon oranları

3.7.Griess Reaksiyonu Yöntemi

- Gruplar, Kontrol, Çözücü, İcariin, İcariin+W146, İcariin+DMS, İcariin+L-NAME olarak belirlendi.
- Homojenatlar ilk olarak inhibitörler ile inkübe edildi (3 μ M, 30dk, W146; 10 μ M, 30dk, DMS; 100 μ M, 30dk, L-NAME)
- İnhibitörlerin ardından, icariin (3 μ M, 30dk) inkübe edildi.
- Farklı konsantrasyonlarda (35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 0 μ g/ml) nitrik oksit standartı referans olarak kullanıldı. Her bir standart 96-kuyucuklu petriye 80 μ l eklendi.
- İnkübe edilen sıçan aortası protein örneklerinden 40 μ l kuyucuklara eklendi ve assay tamponu kullanılarak 80 μ l'e tamamlandı.
- Standart ve örneklerin üzerine 10 μ l nitrik oksit enzim kofaktör karışımı ve 10 μ l nitrat redüktaz karışımı eklendi ve 3 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından, standart ve örneklere 50 μ l griess reaksiyon R1 ve 50 μ l griess reaksiyon R2 reaktifleri eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 540 nm dalga boyundaki emilim değerleri Thermo-Varioskan mikropilaya okutuldu.
- Nitrik oksit standartlarıyla çizilen standart grafikten elde edilen doğrusal denklem kullanılarak total nitrik oksit miktar tayini yapıldı.

3.8.İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz ve grafiklerin çizimi için bilgisayar ortamında Graph-Pad Prism (CA, USA) istatistik programı kullanıldı. Tüm veriler ortalama \pm SEM olarak sunuldu. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek ve çift yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc testi olarak Bonferroni kullanıldı. Ayrıca, gerektiğinde, iki ortalama arasındaki farkı karşılaştırmak için *Student 'in t test'*inden faydalanıldı. 0.05'ten küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edildi. İzole organ banyosu deneyleri için dokuların kasılma yanıtları bazal gerilim düzeyine göre kasılmanın farkı, gevşeme yanıtları ise

maksimum kasılmanın yüzdesi olarak ifade edildi. Maksimum gevşemenin (E_{maks}) yarısını oluşturan konsantrasyonun negatif logaritması ($-\log EC_{50}$ veya pD_2) nonlineer regresyon analizi kullanılarak hesaplandı. N; çalışmada kullanılan hayvan sayısını ifade etmektedir.

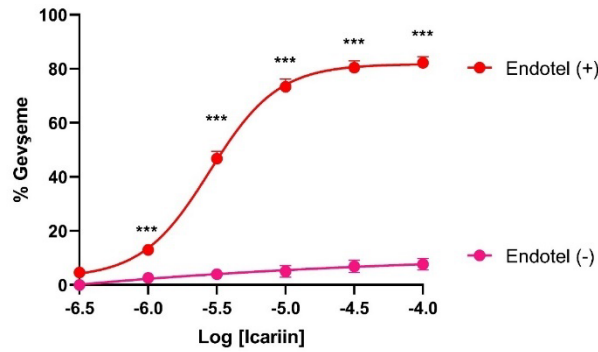


Bulgular

4.1. İzole Organ Banyosu Deneyleri

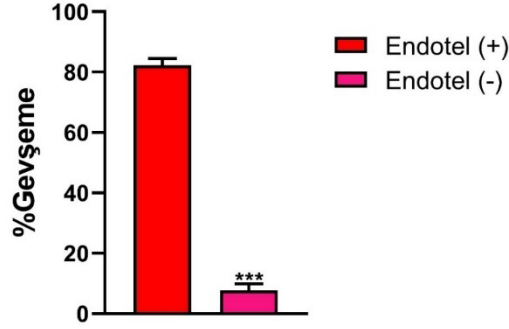
4.1.1. İCA Gevşeme Yanıtlarında Endotel Etkisi

İCA'nın endotelli dokularda oluşturduğu gevşeme yanıtının ($n=16$, $E_{maks}= 82,22 \pm 2,289$, $pD_2= 5,530 \pm 0,02472$), endotelsiz dokulardakine ($n=4$, $E_{maks}= 7,710 \pm 2,147$) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 11, Şekil 12). Endotelsiz dokularda İCA, konsantrasyona bağlı bir yanıt oluşturmadığından EC_{50} değeri ve dolayısıyla pD_2 değeri hesaplanamamış ve sonuçlara dahil edilmemiştir. Endotelli ve endotelsiz dokular arasındaki bu anlamlı fark İCA'nın gevşetici etkisini endotel üzerinden gösterdiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 11. Sıçan aortasında fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA gevşeme yanıtları

İCA endotelli aortada konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtı oluşturmuştur. Bu gevşeme yanıtları, endotelsiz aortalarda anlamlı bir şekilde azalmıştır. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *** $P < 0.001$, Endotel (+) ile Endotel (-) İki Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Endotel (+) ($n=16$), Endotel (-) ($n=4$).



Şekil 12: Sıçan aortasında, endotel varlığında/yokluğunda fenilefrin önkastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).

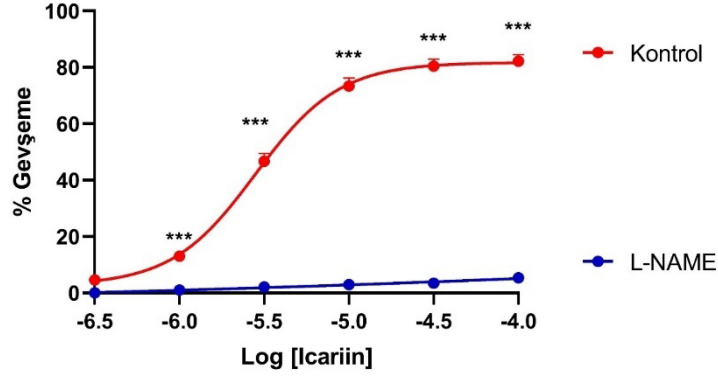
Maksimum İCA gevşemeleri endotelsiz aortalarda anlamlı bir şekilde azalmıştır. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir *** $P < 0.001$, Endotel (+) ile Endotel (-) Student t Testi. Endotel (+) (n=16), Endotel (-) (n=4).

İCA	E_{maks}
Endotel (+)	82,22 \pm 2,289
Endotel (-)	7,710 \pm 2,147 ***

Tablo 6. Sıçan aortasında, endotel varlığında/yokluğunda fenilefrin önkastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).

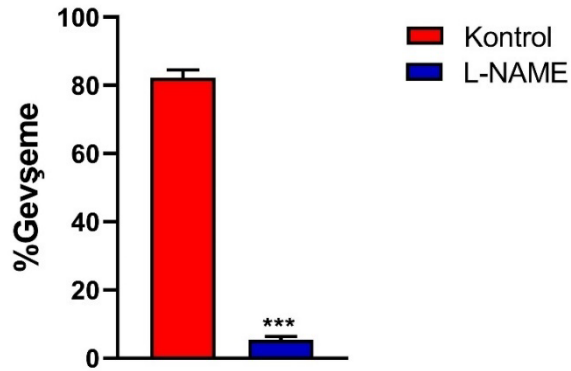
4.1.2. İCA Gevşeme Yanıtlarında Nitrik Oksidin Rolü

İCA (n=16, $E_{maks} = 82,22 \pm 2,289$, $pD_2 = 5,530 \pm 0,02472$), gevşeme yanıtları L-NAME varlığında (n=6, $E_{maks} = 5,373 \pm 1,035$) inhibe olmuştur (Şekil 13, Şekil 14). İCA gevşemelerinin L-NAME varlığında azalması, İCA yanıtlarının NO ile ilişkili olduğunu göstermektedir. L-NAME varlığında İCA, konsantrasyona bağlı bir yanıt oluşturmadığından EC_{50} değeri ve dolayısıyla pD_2 değeri hesaplanamamış ve sonuçlara dahil edilmemiştir.



Şekil 13. Sıçan aortasında L-NAME varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA gevşeme yanıtları

İCA gevşeme yanıtları L-NAME varlığında azalmıştır. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *** $P<0.001$, Kontrol ile L-NAME inkübe edilmiş aorta halkaları, İki Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), L-NAME (n=6).



Şekil 14. Sıçan aortasında, L-NAME varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).

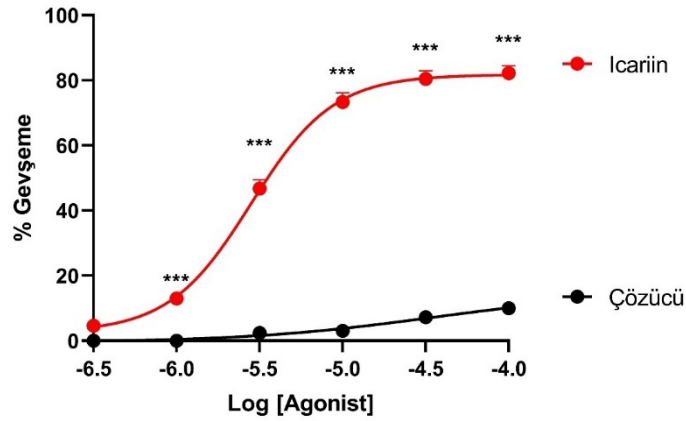
Maksimum İCA gevşeme yanıtları L-NAME varlığında azalmıştır. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *** $P<0.001$, Kontrol ile L-NAME inkübe edilmiş aorta halkaları *Student t* Testi. Kontrol (n=16), L-NAME (n=6).

İCA	E _{maks}
Kontrol	82,22 ± 2,289
L-NAME	5,373 ± 1,035 ***

Tablo 7. Sıçan aortasında, L-NAME varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).

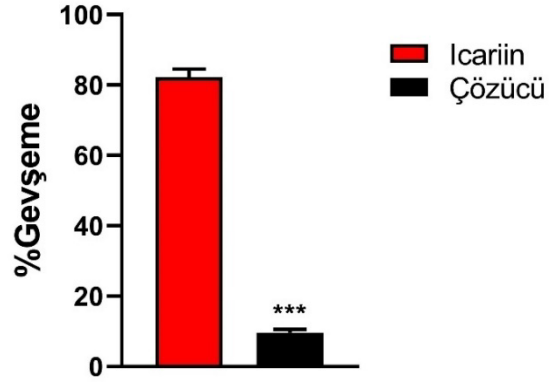
4.1.3. DMSO'nun İCA Gevşeme Yanıtlarına Katkısı

İCA (n=16, E_{maks}= 82,22 ± 2,289, pD₂= 5,530 ± 0,02472), çözücüye kıyasla (n=4, E_{maks}= 9,605 ± 0,960) istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek gevşeme yanıtları oluşturmuştur. Bu sonuç, İCA gevşeme yanıtlarını, çözücünden bağımsız olarak gerçekleştirdiğini göstermektedir. (Şekil 15, Şekil 16). Çözücünün, konsantrasyona bağlı bir gevşetici yanıt oluşturmadığından EC₅₀ değeri ve dolayısıyla pD₂ değeri hesaplanamamış ve sonuçlara dahil edilmemiştir. Bu arada dokunun İCA gevşeme yanıtları alınırken kendini salıp salmadığı da kontrol edilmiş olup zamana bağlı gevşeme yanıtı gözlenmemiştir.



Şekil 15. Sıçan aortasında fenilefrin ön-kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA ve çözücü (DMSO) gevşeme yanıtları

İCA, çözücüye kıyasla konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtı oluşturmuştur. Veriler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. ***P<0.001, Kontrol ile Çözücü İki Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), Çözücü (n=4).



Şekil 16. Sıçan aortasında, fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA ve çözücü gevşeme yanıtları (E_{maks}).

Maksimum İCA gevşemeleri, çözücüye kıyasla istatistiksel anlamlı daha yüksek bulunmuştur. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *** $P < 0.001$, Kontrol ile Çözücü inkübe edilmiş aorta halkaları *Student t* Testi. Kontrol (n=16), Çözücü (DMSO) (n=4).

İCA	E_{maks}
Kontrol	82,22 \pm 2,289
Çözücü (DMSO)	9,605 \pm 0,960 ***

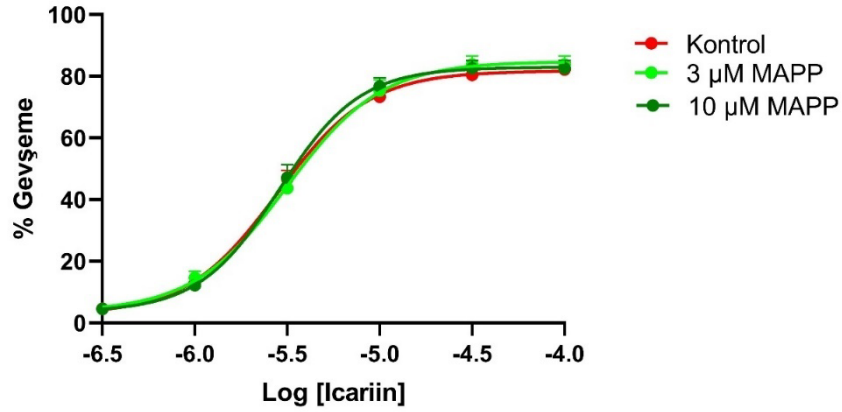
Tablo 8. Sıçan aortasında, fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA ve çözücü gevşeme yanıtları (E_{maks}).

4.1.4. İCA'nın gevşetici yanıtlarında sfingozin-1-fosfat (S1P) biyosentezinin rolü

4.1.4.1 İCA'nın Gevşeme Yanıtlarında Seramidaz Enziminin Etkisi

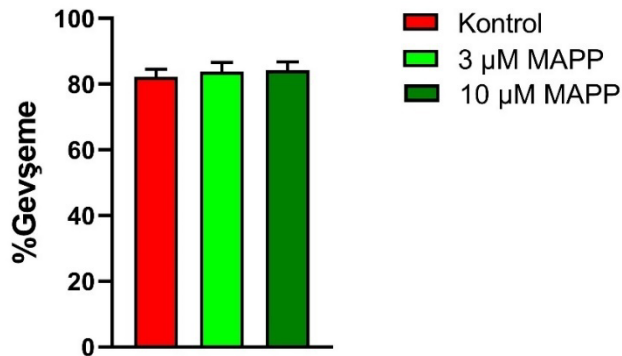
İCA (n=16, $E_{maks} = 82,22 \pm 2,289$, $pD_2 = 5,530 \pm 0,02472$), gevşeme yanıtları 3 μ M ve 10 μ M MAPP varlığında (n=4, $E_{maks} = 83,76 \pm 2,841$ ve $84,19 \pm 2,573$, $pD_2 = 5,514 \pm$

0,03760 ve $5,510 \pm 0,04029$) istatistiksel olarak anlamlı değişmemiştir (Şekil 17, Şekil 18). İCA gevşemelerinin MAPP varlığında değişmemesi, bu gevşeme yanıtlarının seramidaz enzimi ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir. İCA'nın gevşeme yanıtlarına ilişkin pD_2 değeri, 3 μ M ve 10 μ M MAPP varlığında değişmemiştir (Şekil 19).



Şekil 17. Sıçan aortasında MAPP varlığında/yokluğunda Fenilefrin Ön kastırma (10^{-7} M) Sonrası Kümülatif İCA Gevşeme Yanıtları

MAPP, İCA gevşeme yanıtlarını her iki konsantrasyonda da inhibe etmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $P > 0.05$, Kontrol ile MAPP inkübe edilmiş aorta halkaları, İki Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 3-10 μ M MAPP (n=4).

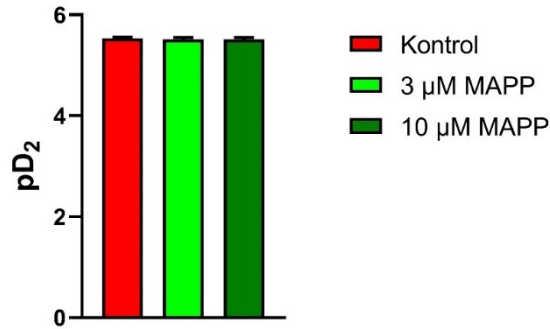


Şekil 18. Sıçan aortasında, MAPP varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).

Maksimum İCA gevşeme yanıtları, MAPP'ın her iki konsantrasyonunda da değişmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $P>0.05$, Kontrol ile MAPP inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 3-10 μ M MAPP (n=4).

İCA	E_{maks}
Kontrol	82,22 \pm 2,289
3 μ M MAPP	83,76 \pm 2,841
10 μ M MAPP	84,19 \pm 2,573

Tablo 9. Sıçan aortasında, MAPP varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).



Şekil 19. Sıçan aortasında, MAPP varlığında/yokluğunda İCA pD_2 değerleri.

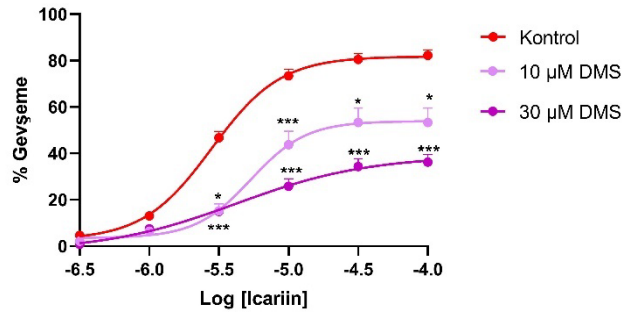
Her iki konsantrasyonda da MAPP, İCA gevşeme yanıtlarına ilişkin pD_2 değerini değiştirmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $P>0.05$, Kontrol ile MAPP inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi- Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 3-10 μ M MAPP (n=4).

İCA	pD_2
Kontrol	5,530 \pm 0,02472
3 μ M MAPP	5,514 \pm 0,03760
10 μ M MAPP	5,510 \pm 0,04029

Tablo 10. Sıçan aortasında, MAPP varlığında/yokluğunda İCA pD₂ değerleri.

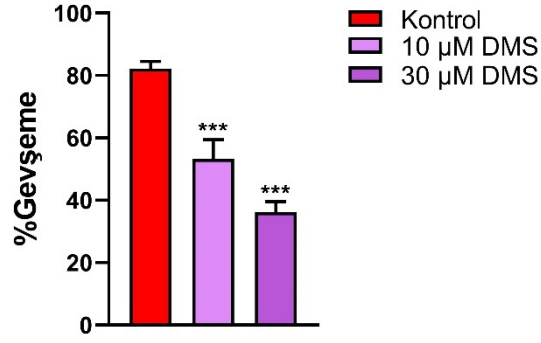
4.1.4.2 İCA Gevşeme Yanıtlarında Sfingozin Kinaz Enziminin Etkisi

10 µM ve 30 µM DMS varlığında (n=4, E_{maks}= 53,31 ± 6,160 ve 36,22 ± 3,357, pD₂= 5,270 ± 0,03468 ve 5,319 ± 0,08987) İCA gevşeme yanıtları (n=16, E_{maks}= 82,22 ± 2,289, pD₂= 5,530 ± 0,02472) alınmıştır. Her iki DMS konsantrasyonunda da İCA gevşemeleri istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır (Şekil 20, Şekil 21). Bu durum İCA gevşemelerinin sfingozin kinaz enzimi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Her iki konsantrasyonda da, DMS, İCA gevşeme yanıtlarına ilişkin pD₂ değerini değiştirmemiştir. (Şekil 22).



Şekil 20. Sıçan aortasında DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10⁻⁷ M) sonrası kümülatif İCA gevşeme yanıtları

İCA gevşeme yanıtları, 10 µM DMS ve 30 µM DMS inkübasyonu varlığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe olmuştur. Veriler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. *P<0.05, ***P<0.001 Kontrol ile DMS inkübe edilmiş aorta halkaları, İki Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 10-30 µM DMS (n=4).



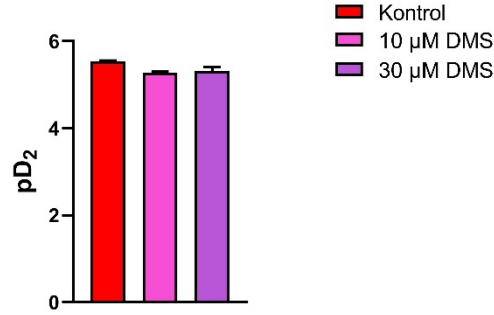
Şekil 21. Sıçan aortasında, DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).

Maksimum İCA gevşeme yanıtları 10 µM ve 30 µM DMS varlığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe olmuştur. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir.

*** $P < 0.001$ Kontrol ile DMS inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 10-30 µM DMS (n=4).

İCA	E_{maks}
Kontrol	82,22 \pm 2,28
10 µM DMS	53,31 \pm 6,160 ***
30 µM DMS	36,22 \pm 3,357 ***

Tablo 11. Sıçan aortasında, DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).



Şekil 22. Sıçan aortasında, DMS varlığında/yokluğunda İCA pD₂ değerleri.

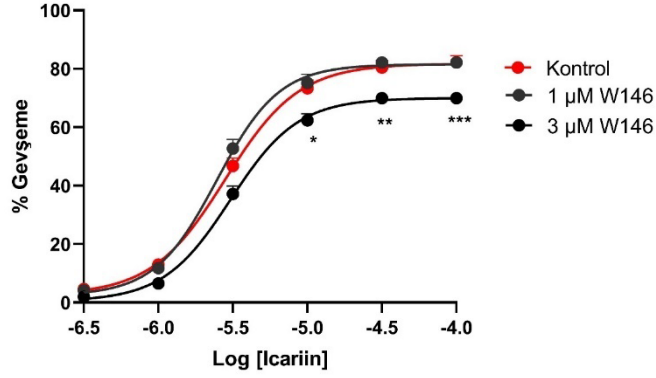
İCA gevşeme yanıtlarına ilişkin pD₂ değerleri her iki konsantrasyonda da değişmemiştir. Veriler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. $P > 0.05$, Kontrol ile DMS inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 10-30 µM DMS (n=4).

İCA	pD ₂
Kontrol	5,530 ± 0,02472
10 µM DMS	5,270 ± 0,03468
30 µM DMS	5,319 ± 0,08987

Tablo 12. Sıçan aortasında, DMS varlığında/yokluğunda İCA pD₂ değerleri.

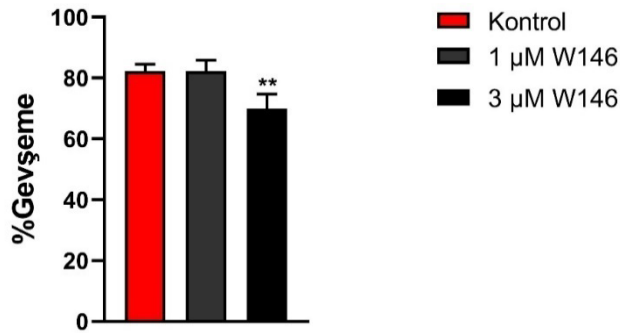
4.1.4.3 İCA Gevşeme Yanıtlarında S1P1 Reseptörlerinin Etkisi

1 µM ve 3 µM W146 varlığında (n=4, $E_{maks} = 82,18 \pm 1,518$ ve $69,99 \pm 1,678$, pD₂= $5,602 \pm 0,02973$ ve $5,518 \pm 0,029$) İCA gevşeme yanıtları (n=16, $E_{maks} = 82,22 \pm 2,289$, pD₂= $5,530 \pm 0,02472$) alınmıştır. 1 µM W146 varlığında, İCA gevşemeleri istatistiksel olarak değişmezken, 3 µM W146 varlığında İCA gevşemeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 23, Şekil 24). Bu durum İCA gevşemelerinin S1PR1'leri ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Her iki konsantrasyonda da W146, İCA gevşeme yanıtlarına ilişkin pD₂ değerini değiştirmemiştir. (Şekil 25).



Şekil 23. Sıçan aortasında W146 varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA Gevşeme Yanıtları

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ Kontrol ile W146 (3 μ M) inkübe edilmiş aorta halkaları, İki Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 1-3 μ M W146 (n=4).



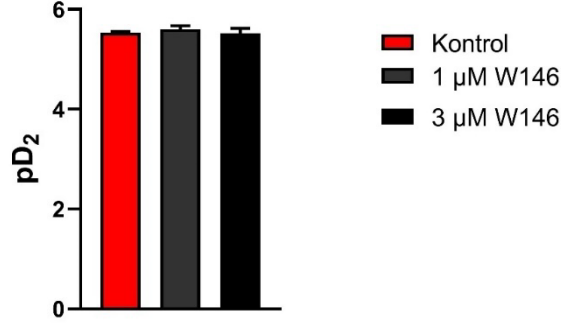
Şekil 24. Sıçan aortasında, W146 varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).

İCA gevşeme yanıtları, 1 μ M W146 varlığında değişmezken ve 3 μ M W146 varlığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe olmuştur. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ** $P < 0.01$ Kontrol ile DMS inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi- Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 1-3 μ M W146 (n=4).

İCA	E_{maks}
Kontrol	82,22 \pm 2,28
1 μM W146	82,18 \pm 1,518

3 μM W146	$69,99 \pm 1,678^{**}$
---------------------------------	------------------------

Tablo 13. Sıçan aortasında, W146 varlığında/yokluğunda fenilefrin önkastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).



Şekil 25. Sıçan aortasında, W146 varlığında/yokluğunda İCA pD_2 değeri.

İCA gevşeme yanıtlarına ilişkin pD_2 değeri her iki konsantrasyonda da değışmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $P > 0.05$, Kontrol ile W146 inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 1-3 μ M W146 (n=6-8).

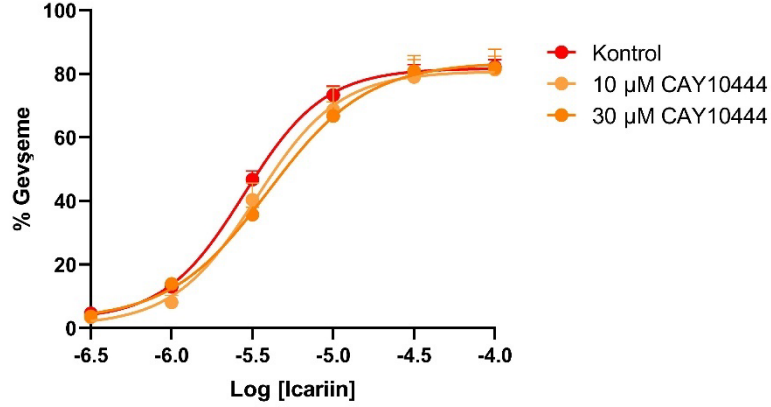
İCA	pD_2
Kontrol	$5,530 \pm 0,02472$
1 μM W146	$5,602 \pm 0,02973$
3 μM W146	$5,518 \pm 0,029$

Tablo 14. Sıçan aortasında, W146 varlığında/yokluğunda İCA pD_2 değeri.

4.1.4.4 İCA Gevşeme Yanıtlarında S1P3 Reseptörlerinin Etkisi

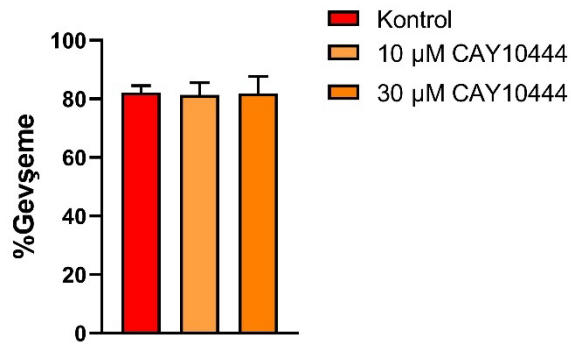
İCA (n=16, $E_{maks} = 82,22 \pm 2,289$, $pD_2 = 5,530 \pm 0,02472$), gevşeme yanıtları, 10 μ M ve 30 μ M CAY10444 varlığında (n=4, $E_{maks} = 81,40 \pm 4,170$ ve $81,91 \pm 5,824$, $pD_2 = 5,432 \pm 0,07259$ ve $5,418 \pm 0,05711$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde değışmemiştir (Şekil 26, Şekil 27). İCA gevşemelerinin CAY10444 varlığında değışmemesi, İCA

gevşeme yanıtlarının S1P3Rleri ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir. İCA'nın gevşeme yanıtlarına ilişkin pD_2 değeri, 10 μ M ve 30 μ M CAY10444 varlığında değişmemiştir (Şekil 28).



Şekil 26. Sıçan aortasında CAY10444 varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA gevşeme yanıtları.

CAY10444, her iki konsantrasyonda da İCA gevşeme yanıtlarını inhibe etmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $P>0.05$ Kontrol ile CAY10444 inkübe edilmiş aorta halkaları, İki Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 10-30 μ M CAY10444 (n=4).



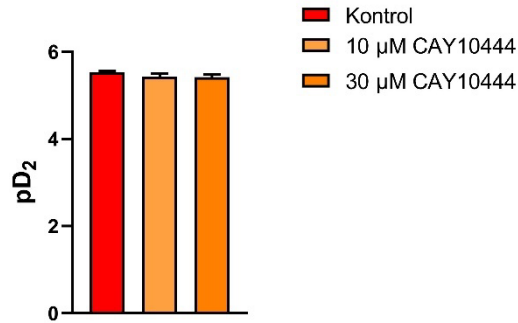
Şekil 27. Sıçan aortasında, CAY10444 varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum İCA gevşeme yanıtları (E_{maks}).

Maksimum İCA gevşeme yanıtları, CAY10444'ün her iki konsantrasyonunda da değişmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $P>0.05$ Kontrol ile

CAY10444 inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 10-30 μ M CAY10444 (n=4).

İCA	E _{maks}
Kontrol	82,22 \pm 2,28
10 μ M CAY10444	81,40 \pm 4,170
30 μ M CAY10444	81,91 \pm 5,824

Tablo 15. Sıçan aortasında CAY10444 varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif İCA gevşeme yanıtları



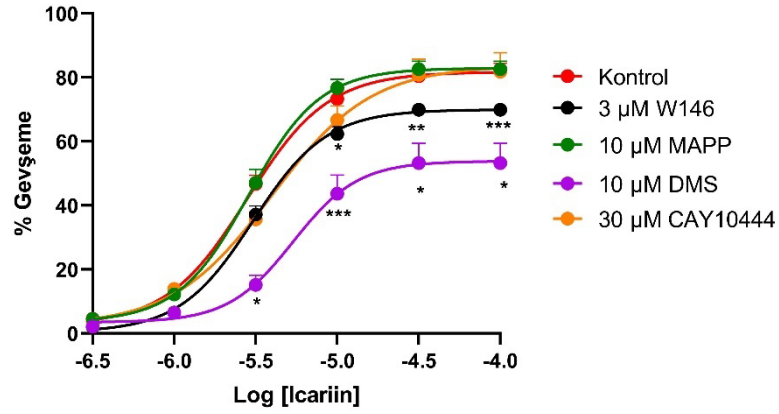
Şekil 28. Sıçan aortasında, CAY10444 varlığında/yokluğunda İCA pD₂ değerleri. CAY10444, her iki konsantrasyonda da, İCA gevşeme yanıtlarına ilişkin pD₂ değerini değiştirmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. P>0.05 Kontrol ile CAY10444 inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), 10-30 μ M CAY10444 (n=4).

İCA	pD ₂
Kontrol	5,530 \pm 0,02472

10 μM CAY10444	5,432 \pm 0,07259
30 μM CAY10444	5,418 \pm 0,05711

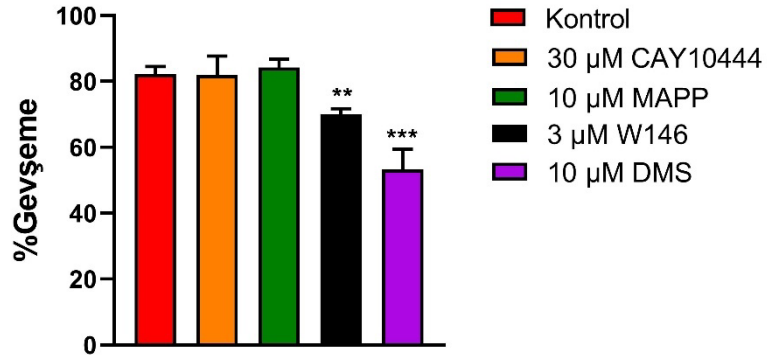
Tablo 16. Sıçan Aorta Halkalarında, CAY10444 varlığında/yokluğunda İCA pD₂ değerleri.

Tez süresince iki reseptör antagonisti ve 2 enzim inhibitörü kullanılmış olup tüm inkübasyonların yer aldığı İCA'nın doz-cevap eğrisi (Şekil 29), maksimum gevşeme yanıtları (E_{maks}) (Şekil 30) ve duyarlılığı (pD₂) (Şekil 31) özet grafikler halinde aşağıda sunulmuştur.



Şekil 29. Sıçan aortasında, sfingozin yolak inhibitörlerinin kümülatif İCA gevşeme yanıtları üzerine etkisi

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 Kontrol ile inhibitörler ile inkübe edilmiş aorta halkaları, İki Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), inhibitörler (n=4-6).

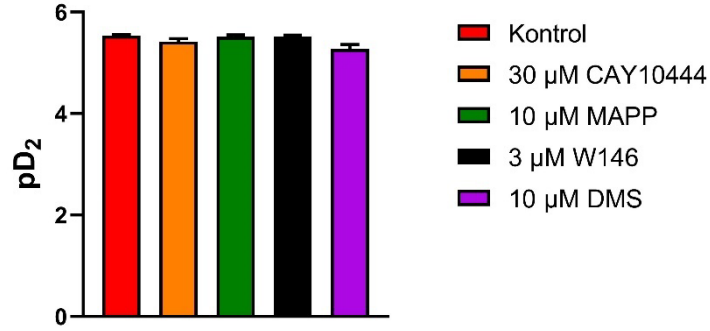


Şekil 30. Sıçan aortasında, sfingozin yolak inhibitörlerinin maksimum İCA gevşeme yanıtları üzerine etkisi (E_{maks}).

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ Kontrol ile inhibitörler ile inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi- Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), inhibitörler (n=4-6).

İCA	E_{maks}
Kontrol	82,22 \pm 2,28
30 µM CAY10444	81,91 \pm 5,824
10 µM MAPP	84,19 \pm 2,573
3 µM W146	69,99 \pm 1,678 **
10 µM DMS	53,31 \pm 6,160 ***

Tablo 17. Sıçan aortasında, sfingozin yolak inhibitörlerinin maksimum İCA gevşeme yanıtlarına etkisi (E_{maks}).



Şekil 31. Sıçan aortasında, sfingozin yolak inhibitörlerinin İCA pD₂ değerleri üzerine etkisi.

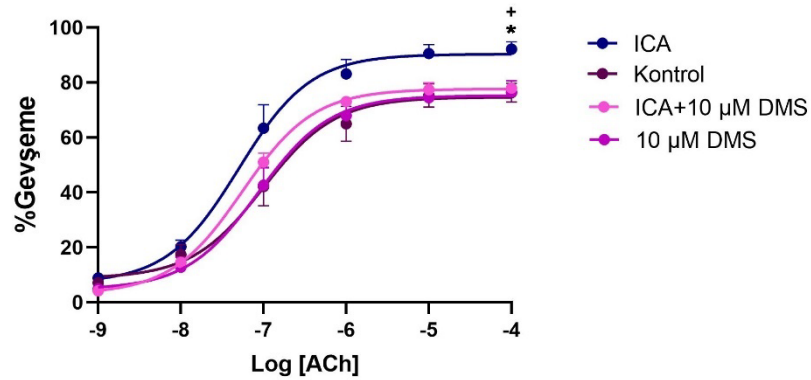
Veriler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. $P > 0.05$, Kontrol ile inhibitörler ile inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=16), inhibitörler (n=4-8).

İCA	pD ₂
Kontrol	5,530 ± 0,02472
30 µM CAY10444	5,418 ± 0,05711
10 µM MAPP	5,510 ± 0,04029
3 µM W146	5,518 ± 0,029
10 µM DMS	5,270 ± 0,03468

Tablo 18. Sıçan aortasında, sfingozin yolak inhibitörlerinin İCA pD₂ değerleri üzerine etkisi.

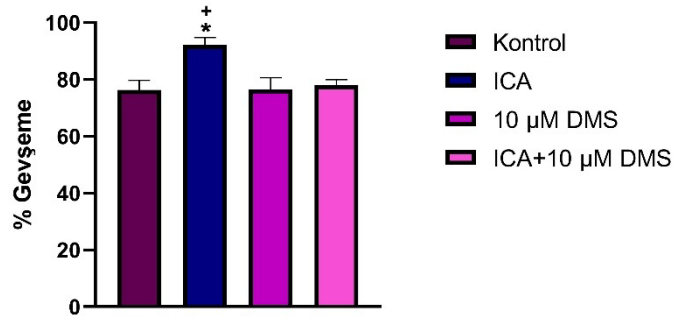
4.1.5 İCA'nin ACh Gevşemelerine Etkisi ve Bu Etkinin Sfingozin Kinaz Enzimiyle İlişkisi

Endotele bağlı gevşemenin en önemli mediyatörü NO'dur. ACh, damar endotelinde M3 reseptörlerine bağlanarak intraselüler kalsiyum girişini artırmaktadır. Böylece nitrik oksit sentaz (NOS) aktive olmakta ve NO sentezi gerçekleşmektedir. ACh (n=6, $E_{maks}= 76,26 \pm 3,492$, $pD_2= 7,023 \pm 0,2370$), gevşeme yanıtları İCA varlığında (n=4, $E_{maks}= 92,13 \pm 2,671$, $pD_2= 7,280 \pm 0,1505$) artmıştır. ACh gevşemelerindeki bu artış DMS varlığında (n=4, $E_{maks}= 81,52 \pm 3,399$, $pD_2= 7,224 \pm 0,09122$) azalmıştır. Sadece DMS inkübasyonlu (n=4, $E_{maks}= 76,58 \pm 4,067$, $pD_2= 7,057 \pm 0,1165$) aorta halkalarında ise DMS kontrole kıyasla istatistiksel bir anlamlılık göstermemiştir (Şekil 32, Şekil 33). İCA inkübasyonu ACh duyarlılığını değiştirmemiştir (Şekil 34). ACh yanıtlarının İCA varlığında artması, İCA'nın ACh aracılı NO yanıtlarını arttırdığına ve bu artışın DMS ile geri dönmesi ise İCA'nın oluşturduğu NO aracılı etkisinin sfingozin kinaz üzerinden gerçekleştiğini düşündürmektedir.



Şekil 32. Sığan aortasında, İCA ve 10 µM DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif ACh gevşeme yanıtları

ACh gevşeme yanıtları, İCA varlığında artarken bu artış DMS ile geri dönmüştür. DMS tek başına inkübe edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $P < 0,05$ Kontrol ile İCA ile inkübe edilmiş aorta halkaları $^+P < 0,05$ 10 µM DMS+ICA ile İCA ile inkübe edilmiş aorta halkaları, İki Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=6), İCA (n=4), DMS(n=4) İCA+DMS (n=4).

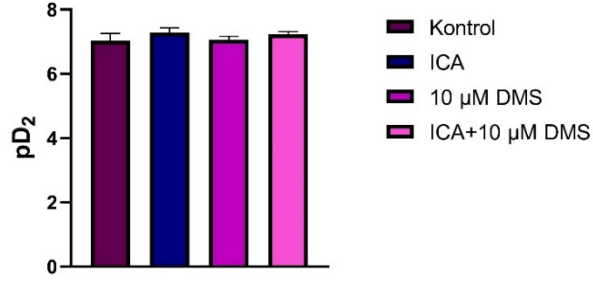


Şekil 33. Sıçan aortasında, İCA ve 10 µM DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum ACh gevşeme yanıtları (E_{maks}).

Maksimum ACh gevşeme yanıtları, İCA varlığında artarken bu artış DMS ile geri dönmüştür. DMS tek başına inkübe edildiğinde istatistiksel anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $^*P<0.05$ Kontrol ile İCA ile inkübe edilmiş aorta halkaları, $^+P<0.05$ 10 µM DMS+ICA ile İCA ile inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi- Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=6), İCA (n=4), DMS (n=4) İCA+DMS (n=4).

ACh	E_{maks}
Kontrol	76,26 \pm 3,492
İCA	92,13 \pm 2,671 ^{*,+}
10 µM DMS	76,58 \pm 4,067
İCA+10 µM DMS	81,52 \pm 3,399

Tablo 19. Sıçan aortasında, İCA ve 10 µM DMS varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum ACh gevşeme yanıtları (E_{maks}).



Şekil 34. Sıçan aortasında İCA ve 10 µM DMS varlığında/yokluğunda ACh pD₂ değerleri.

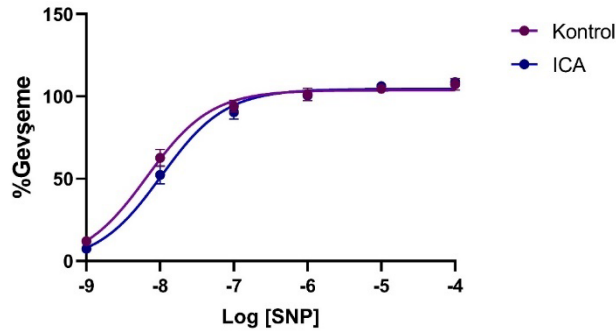
İCA, ACh duyarlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Veriler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. $P > 0.05$ Kontrol ile İCA ile inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=6), İCA (n=4), DMS (n=4) İCA+DMS (n=4).

ACh	pD ₂
Kontrol	7,023 ± 0,2370
İCA	7,280 ± 0,1505
10 µM DMS	7,057 ± 0,1165
İCA+10 µM DMS	7,224 ± 0,09122

Tablo 20. Sıçan aortasında İCA ve 10 µM DMS varlığında/yokluğunda ACh pD₂ değerleri.

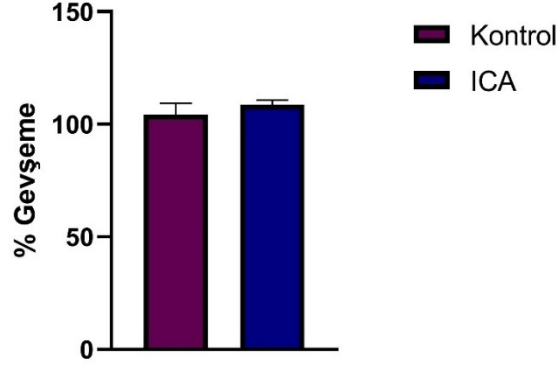
4.1.6 İCA'nin SNP Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkisi.

İCA'nın NO'in alt mekanizmalarını değiştirip değiştirmediğini anlamak amacıyla İCA varlığında SNP yanıtları alınmıştır. SNP, NO donörü gibi davranarak direkt düz kası gevşetmektedir. SNP (n=4, $E_{maks}= 104,3 \pm 5,039$, $pD_2= 8,187 \pm 0,1398$), gevşeme yanıtları İCA varlığında (n=4, $E_{maks}= 108,6 \pm 2,053$, $pD_2= 7,962 \pm 0,1410$) değişmemiştir. (Şekil 35, Şekil 36). İCA inkübasyonu SNP duyarlılığını değiştirmemiştir (Şekil 37). Yani İCA inkübasyonu, eksojen NO gevşemelerini değiştirmemiştir. SNP yanıtlarının İCA varlığında değişmemesi, aortada İCA'nın vazodilatör etkisinin, NO/cGMP yolağının alt mekanizmalarından ziyade endojen NO oluşumuyla ilişkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 35. Sıçan aortasında, İCA varlığında/yokluğunda fenilefrin ön kastırma (10^{-7} M) sonrası kümülatif SNP gevşeme yanıtları

İCA varlığında, SNP gevşeme yanıtları istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $P>0.05$ Kontrol ile İCA ile inkübe edilmiş aorta halkaları, İki Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=4), İCA (n=5).

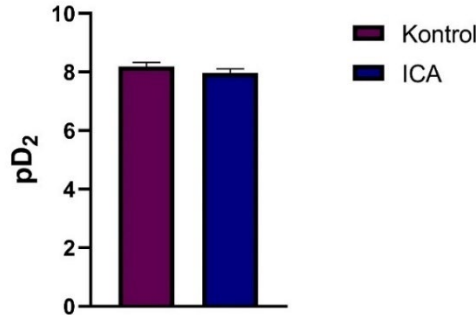


Şekil 36. Sıçan aortasında, İCA varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum SNP gevşeme yanıtları (E_{maks}).

İCA, maksimum SNP gevşeme yanıtlarını değiştirmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $P > 0.05$ Kontrol ile İCA ile inkübe edilmiş aorta halkaları, *Student t* Testi. Kontrol (n=4), İCA (n=5).

SNP	E_{maks}
Kontrol	104,3 \pm 5,039
İCA	108,6 \pm 2,053

Tablo 21. Sıçan aortasında, İCA varlığında/yokluğunda fenilefrin ön-kastırması sonrası maksimum SNP gevşeme yanıtları (E_{maks}).



Şekil 37. Sıçan aortasında, İCA varlığında/yokluğunda SNP pD₂ değerleri.

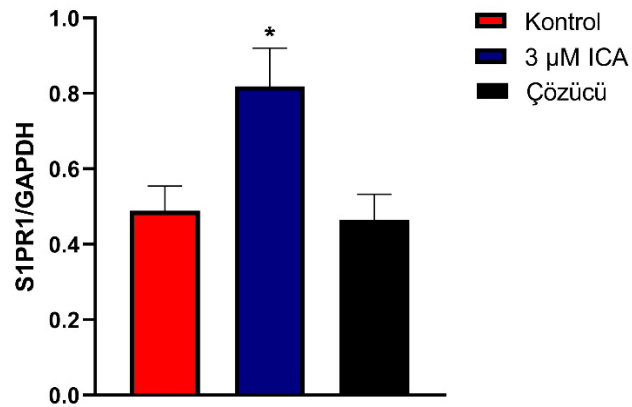
İCA varlığında, SNP duyarlılığı değişmemiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $P>0.05$ Kontrol ile İCA ile inkübe edilmiş aorta halkaları, *Student t* Testi. Kontrol (n=4), İCA (n=5).

SNP	pD ₂
Kontrol	8,187 \pm 0,1398
İCA	7,962 \pm 0,1410

Tablo 22. Sıçan aortasında, İCA varlığında/yokluğunda SNP pD₂ değerleri.

4.2 Western Blot Deneyleri

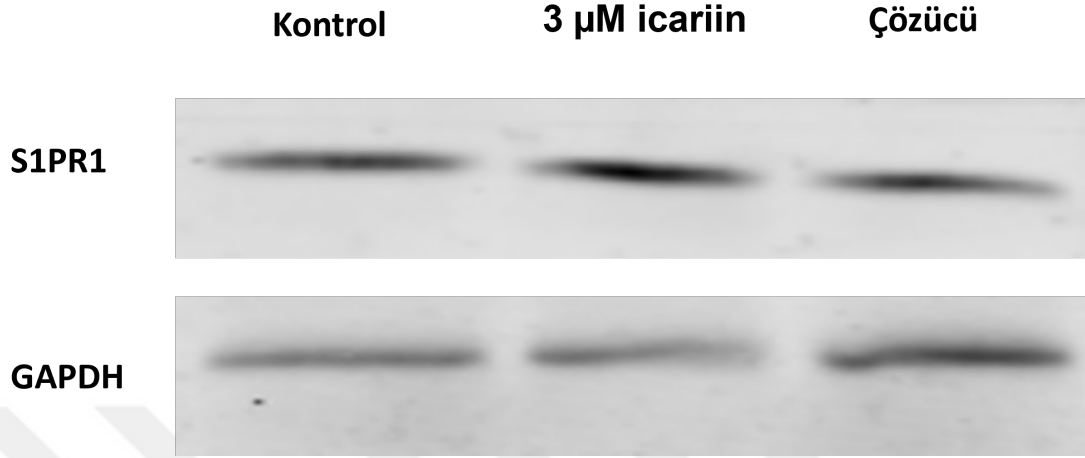
3 μ M icariin ile inkübe edilmiş sıçan aortalarında, S1P1 reseptörü (Şekil 38) ve SK-1 enziminin (Şekil 42) protein ekspresyonlarını arttırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte S1P3 reseptörünün (Şekil 40) protein ekspresyonunda ise istatistiksel anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu sonuç, İCA'nın doğrudan veya dolaylı bir şekilde S1P1 reseptörü ve SK-1 enzimiyle etkileştiğini ancak S1P3 reseptörlerini etkilemediğini göstermektedir.



Şekil 38. 3 μ M icariinin S1P1 reseptörünün ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisi.

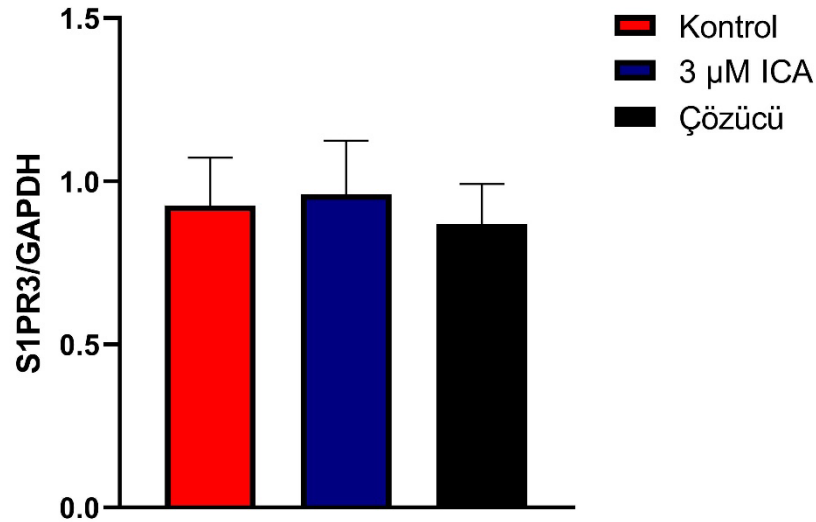
3 μ M icariin sıçan aortasında S1P1 reseptör ekspresyonunu arttırmıştır. Çözücü S1P1 reseptör ekspresyonunu değiştirmemiştir. * $P<0.05$ Kontrol ile İCA ile inkübe edilmiş

aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi.
Kontrol, n=4, Çözücü, n=4, 3 μ M icariin, n=4



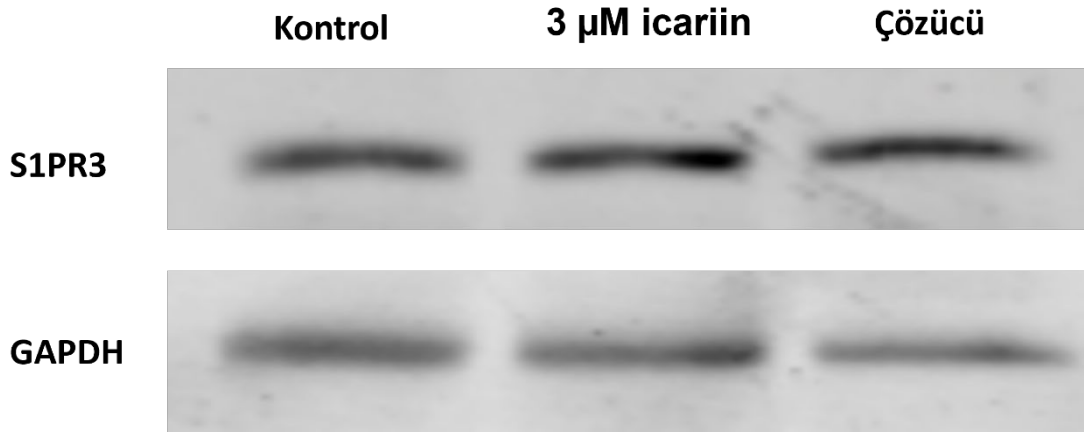
Şekil 39. S1P1 reseptör proteinlerinin temsili bant görüntüleri.

Kontrol, 3 μ M icariin ve çözücü (37°C sıcaklıkta, 24 saat) inkübe edilmiş sıçan aorta dokusu.



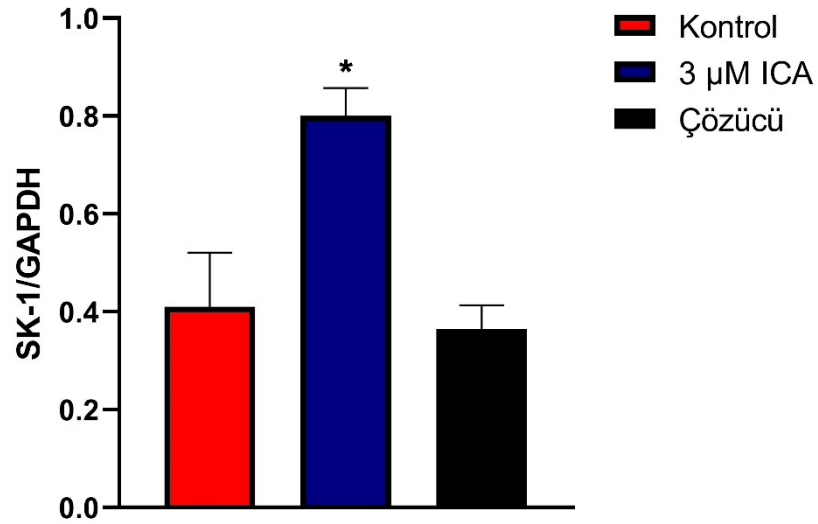
Şekil 40. 3 μ M icariinin S1P3 reseptörünün ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisi.

3 μ M icariin, ve Çözücü sıçan aortasında S1P3 reseptör ekspresyonunu değiştirmemiştir. $P>0.05$ Kontrol ile İCA ile inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol, n=3, Çözücü, n=3, 3 μ M icariin, n=3.



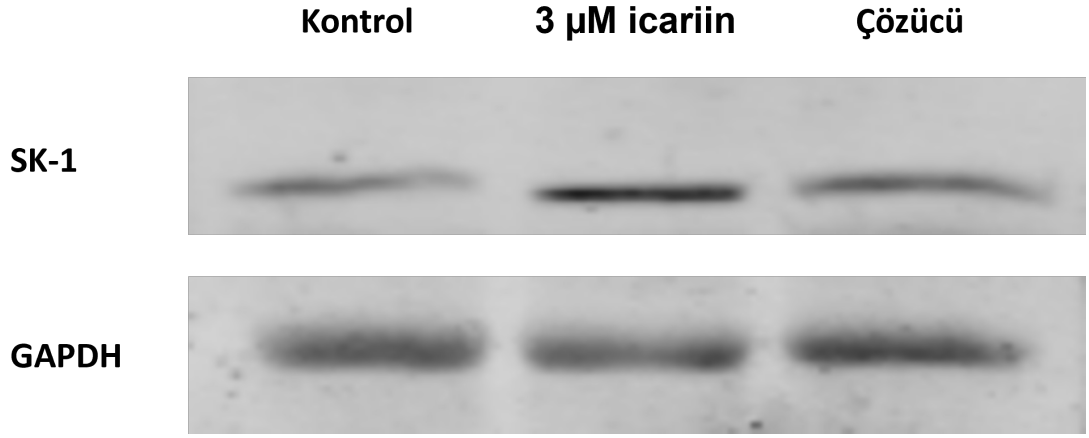
Şekil 41. S1P3 reseptör proteinlerinin temsili bant görüntüleri.

Kontrol, 3 µM icariin ve çözücü (37°C sıcaklıkta, 24 saat) inkübe edilmiş sıçan aorta dokusu.



Şekil 42. 3 µM icariinin SK-1 enziminin ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisi.

3 µM icariin sıçan aortasında SK-1 enzim ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı arttırmıştır. Çözücü SK-1 enzim ekspresyonunu değiştirmemiştir. * $P < 0.05$ Kontrol ile İCA ile inkübe edilmiş aorta halkaları, Tek Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol, n=3, Çözücü, n=3, 3 µM icariin, n=3.

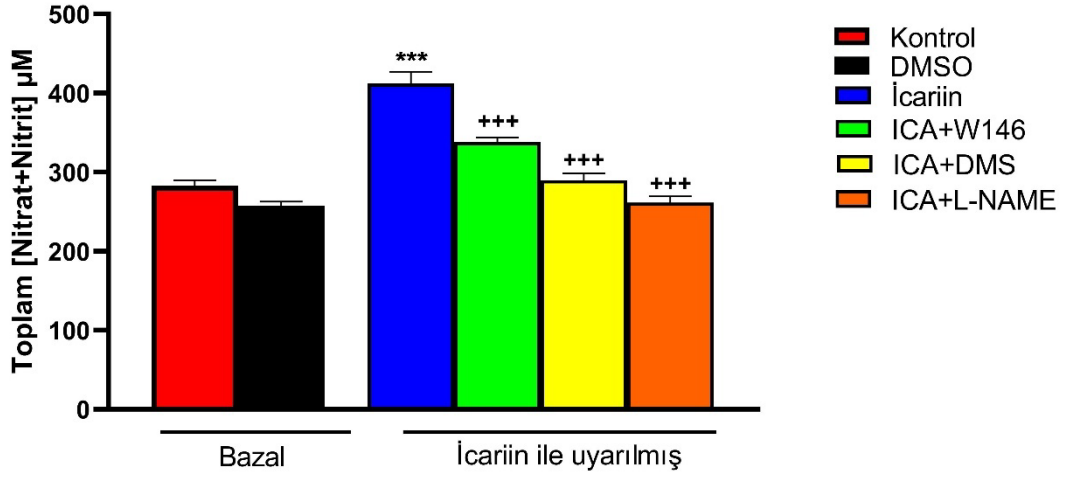


Şekil 43. SK-1 enzim proteinlerinin temsili bant görüntüleri.

Kontrol, 3 μ M icariin ve çözücü (37°C sıcaklıkta, 24 saat) inkübe edilmiş sıçan aorta dokusu.

4.3 Griess Reaksiyonu Deneylei

Tezde gerçekleştirdiğimiz griess reaksiyonu deneylerinde, 3 μ M icariin ile inkübe edilmiş homojenatların, SK inhibitörü olan DMS (10 μ M, 30dk.) S1PR1 inhibitörü olan W146 (3 μ M, 30dk.) ve NOS inhibitörü olan L-NAME (100 μ M, 30dk.) varlığında/yokluğunda toplam nitrat ve nitrit konsantrasyonlarını nasıl değiştirdiği incelenmiştir (**Şekil 43**). Yapılan çalışmalarda İCA'nın toplam nitrat ve nitrit seviyelerini istatistiksel olarak arttırdığı ve inhibitörler varlığında bu yükselişin geri döndüğü gösterilmiştir.



Şekil 44. İcariinin inhibitörler varlığında/yokluğunda toplam nitrat ve nitrit konsantrasyonuna etkisi.

3 µM icariin inkübasyonu, sıçan aorta homojenatlarında toplam nitrat ve nitrit miktarını arttırmıştır. Bu artırma inhibitörler varlığında geri dönmüştür. *** $P < 0.001$ Kontrol ile İCA ile inkübe edilmiş aorta homojenatları, *** $P < 0.001$ İCA ile inhibitörler ile inkübe edilmiş aorta homojenatları. Tek Yönlü ANOVA Testi-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol, n=5, Çözücü, n=5, 3 µM icariin, n=5, İCA+W146, n=5, İCA+DMS, n=5, İCA+L-NAME, n=5

Tartışma

5.1.İcariinin Vazodilatör Etkisinde NO ve Endotel Tabakasının Rolü

İcariin, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser ve nöroprotektif etkiler de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinen bir flavonoiddir (He ve diğerleri, 2020). Bunların yanı sıra İCA ereksiyon fonksiyonunu iyileştirir ve testosteron seviyelerini artırır (Yang ve diğerleri, 2013; Z. Zhang ve Yang, 2006). Anti-inflamatuar etkileri ile birlikte romatoid artrit olumsuz etkilerini azaltır.(Z. Wu ve diğerleri, 2022) Parkinson hastalığı gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarında nörodejenerasyona karşı koruyucu etkilere sahiptir (Rafi ve diğerleri, 2022). İCA, akciğer kanseri (Zhu ve Ren, 2022), meme kanseri (Linjiang Song ve diğerleri, 2020) ve karaciğer kanseri gibi çeşitli kanser hücrelerinin de büyüme ve çoğalmasını da inhibe eder. (W. Li ve diğerleri, 2014). İCA, sitokin üretimini inhibe ederek enflamasyonu azaltır (Luo ve diğerleri, 2022). Güçlü bir antioksidan olan İCA, güçlü bir serbest radikal tutucu olarak görev alır. (Q. P. Chen ve Wei, 2013). İcariin'in Multipl Skleroz (MS) üzerinde potansiyel etkileri mevcuttur. İCA'nin potansiyel nöroprotektif etkileri MS'in, klinik semptomlarını azaltır. (Cong ve diğerleri, 2020). İcariin'in etki mekanizmalarından biri de, vazodilatasyon, nörotransmisyon ve immün yanıt dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan nitrik oksit (NO) üretimini artırma yeteneğidir (H. Bin Xu ve Huang, 2007a). İCA, NOS aktivitesini ve buna bağlı olarak vücutta NO üretimini artırarak vazodilatasyonu sağlar (W. J. Liu ve diğerleri, 2005). İCA, nitrik oksit (NO) sentezini artırarak, vazokonstriktör faktörlerin inhibisyonunu ve hücrel sinyal yollarının modülasyonunu da içeren mekanizmalar aracılığıyla vasküler tonusu düzenler. Genel olarak, İCA ve nitrik oksit arasındaki ilişki son derece önemli bir araştırma konusudur ve icariin'in etki mekanizmasının ve vasküler tonusun düzenlenmesindeki rolünün belirlenmesi potansiyel etkisinin tam olarak anlaşılmasını ve pek çok patolojik koşulda icariinin terapötik etkisinden yararlanılmasını sağlayacaktır.

Çalışmamızda, icariinin gevşetici etkileri NOS inhibitörü olan L-NAME varlığında azalmıştır. Benzer şekilde, spatül yardımıyla (10 kez sağa,10 kez sola) endotelsiz bırakılan aorta halkarıyla yapılan çalışmalarda, İCA gevşemeleri, endotelsiz aorta halkalarında endotelli aortalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmış hatta neredeyse sıfırlanmıştır. Bu sonuç, bize İCA'nın gevşetici etkilerinin NO ve endotel

aracılı olduğunu kanıtlamaktadır. İCA'nın gevşetici yanıtlarında eNOS ve endotel tabakasının katkısı literatürde yapılan birçok çalışmada da doğrulanmaktadır. H. Bin Xu ve arkadaşlarının köpek koroner arterinde yaptığı çalışmada, endotelsiz ve L-NAME inkübasyonlu dokularda İCA gevşeme yanıtlarının kontrol İCA yanıtlarına kıyasla azaldığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada COX inhibitörü olan indometazin ve sGS inhibitörü ODQ de kullanılmış ve indometazin kontrol İCA gevşemelerinde bir fark oluşturmazken, ODQ İCA gevşeme yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (H. Bin Xu ve Huang, 2007b). H. Bin Xu ve arkadaşları başka bir çalışmalarında ise, İCA'nın insan endotel hücrelerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, İCA'nın mRNA ve protein düzeyinde eNOS'u arttırdığı gösterilmiştir (H. Bin Xu ve Huang, 2007a). İCA'nın, hipertansif sıçanlarda eNOS ve fosforile-eNOS(p-eNOS) ekspresyon düzeylerini arttırdığı ve buna bağlı olarak erektil disfonksiyonu tedavi ettiği bildirilmiştir (Q. W. Liu, Yang, Jiang ve Jiang, 2021). İnsan endotel hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada da, İCA'nın eNOS ve p-eNOS düzeylerini arttırdığı doğrulanmıştır (Chung ve diğerleri, 2008). Apolipoprotein E^{-/-} farelerde yapılan bir çalışmada İCA, eNOS ve p-eNOS ekspresyon düzeylerini ve plazma NO konsantrasyonlarını arttırmıştır. (Xiao, Sui ve Lu, 2017). Tüm bu çalışmaların yanı sıra, İCA'nın PI3K/AKT-eNOS sinyal yolağını aktive ettiğini gösteren bir çok çalışma vardır (Ding ve diğerleri, 2018; Duan, Xu, Huang, Zhou ve Sun, 2013; Koizumi ve diğerleri, 2010; Y. K. Zhai ve diğerleri, 2014).

5.2. İcariinin Vazodilatör Etkisinde Çözücü (DMSO)'nun Rolü

İcariinin çözünürlük problemi çalışmamızın sınırlayıcısı olarak kabul edilebilir. İCA'nın yüksek oranda en iyi DMSO da çözünmesi, vasküler gevşetici etkide çözücü DMSO'nun da etkisinin araştırılmasını gerektirmiştir. Sadece çözücü uygulanan damarlarda oluşan gevşetici etki ve İCA gevşemeleri karşılaştırıldığında, DMSO'nun İCA'nın gevşetici etkisine herhangi bir katkısı olmadığı hatta çözücü ile oluşan gevşemenin dokunun zamana karşı kendisini salması olarak değerlendirilmiştir.

5.3. İcariinin Vazodilatör Etkisinde Sfingozin Yolağının Rolü

5.3.1. Seramidaz Enziminin Rolü

Seramidaz, seramidin sfingozin ve yağ asidine hidrolizini katalizleyerek, sfingolipit metabolizmasında kritik rolü olan önemli bir enzimdir (Park ve Schuchman, 2006). Bu

reaksiyon, seramidin hücre sel sinyalizasyonu ve metabolik düzenleyici etkisi için, oldukça önemli bir mekanizmadır (Ga ve diğ erleri, 1996). Seramid den oluşan sfingozin, S1P'nin sentezinde kullanılır ve S1P ilgili reseptörler aracılığıyla gevşeme yanıtları oluşturur (Dantas ve diğ erleri, 2003; Mendelson ve diğ erleri, 2014; Tölle ve diğ erleri, 2005). Bu nedenle, eğer İCA gevşetici etkisini sfingozin yolağı üzerinden yapıyor ise bu gevşetici etkisinde seramidaz enzimi üzerinden gerçekleşebilir. Bu hipotez üzerinden hareketle çalışmamızda seramidaz inhibitörü olan MAPP (3-10 µM) organ banyosunda aorta dokularında iki farklı konsantrasyonlarda kullanılarak 30 dk süresince inkübe edildi ve ardından kümülatif İCA yanıtları alındı. MAPP inkübasyonu varlığında, İCA gevşeme yanıtlarında istatistiksel herhangi bir değışiklik saptanmadı. Bu sonuç İCA gevşemelerinin sfingozin yolağında yer alan seramidaz enzimi ile ilişkili olmadığını gösterdi.

5.3.2. Sfingozin Kinaz Enziminin Rolü

Sfingozin kinaz (SK), çeşitli hücre sel süreçlerde rol oynayan biyoaktif bir lipit olan sfingozini, sfingozin-1-fosfata (S1P) dönüştüren bir lipit kinaz enzimidir (Maceyka ve diğ erleri, 2002). SK'nın iki izoformu (Hait ve diğ erleri, 2006): SK1 ve SK2 olarak bilinmektedir. SK1 çoğunlukla sitozolde bulunurken, SK2 ise çekirdekte de eksprese olur (Heffernan-Stroud ve Obeid, 2013). SK ve SK/S1P yolağı, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynar. Hücre proliferasyonu, farklılaşması, migrasyonu, anjiyogenez (Kohno ve diğ erleri, 2006) hayatta kalma (Olivera ve diğ erleri, 2003), ayrıca inflamasyon (C. Wang ve diğ erleri, 2021), ve kanser gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerde etkili olduğu düşünülmektedir (Heffernan-Stroud ve Obeid, 2013). Bu yolak, kardiyovasküler (D. D. Song ve diğ erleri, 2018), metabolik (Kwong ve diğ erleri, 2017) hastalıklar ve nörodejeneratif bozukluklar (Motyl ve Strosznajder, 2018) ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda sfingozin kinaz enzim inhibitörü olan DMS (10-30 µM) organ banyosunda aorta dokularında iki farklı konsantrasyonlarda 30 dk süresince inkübe edildi ve ardından kümülatif ICA yanıtları alındı. Elde edilen sonuçlarda DMS'nin her iki konsantrasyonunda da ICA gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. Bu azalma ICA'nin gevşetici etkilerinde sfingozin kinaz enziminin önemli bir rolü olabileceğı hipotezimizi güçlendirdi. Bunun üzerine, kontrol, DMSO ve ICA ile inkübe edilmiş aorta dokularında SK-1 enziminin protein ekspresyonunun nasıl değışebileceğini görmek

için western blot deneyleri planlandı. Western blot deneylerinde, İCA ile inkübe edilmiş dokularda kontrol ve çözücü ile inkübe edilmiş dokulara kıyasla, SK-1 protein ekspresyonunun arttığını görüldü. Bu çalışmalar, aorta dokusunda İCA'nın sfingozin yolağı üzerinde yer alan SP1 oluşumunu katalize eden SK enzim ekspresyonunu artırarak SP1 üzerinden gevşeme yanıtı oluşturabileceğini göstermektedir. Öyleyse, İCA'nın sfingozin yolağı ile ilişkisi bulunmaktadır ve bu yolak ile ilişkili fizyolojik/patolojik olayları düzenleyebilir. Bunlardan ilki nöroprotektif etkilerle ilişkilidir. Sfingozin kinaz enziminin inme modellerinde ve anti-nöroinflamatuvar, etkilerde önemli katkıları olabileceği gösterilmiştir. Örneğin fare nöronlarında yapılan bir çalışmada, sfingozin kinazın Bcl-2 protein ekspresyonunu düzenleyerek nöroprotektif etkileri olabileceği bildirilmiştir (D. D. Song ve diğerleri, 2017). Sıçan beyinde yapılan başka bir inme modelinde ise SK/S1P yolağının ilgili reseptörleri aracılığıyla hücre ölümünü azalttığı ve beyinde gerçekleşen infarktüs miktarını da azalttığı gösterilmiştir (Xue ve diğerleri, 2022). S1PR1^{-/-} farelerde yapılan başka bir infarktüs modelinde ise infarktüs miktarının arttığı ve endotel aracılı S1P'nin infarktüs hasarını azalttığı gösterilmiştir (Nitzsche ve diğerleri, 2021). Benzer etkiler İCA ile yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir. Farelerde yapılan bir inme(felç) modelinin de İCA'nın nöronal hasarı azalttığı caspase-3, PARP, Bcl-2, ve Bax gibi apoptotik proteinlerin ekspresyon düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (C. T. Wu ve diğerleri, 2021). Wistar sıçanlarıyla yapılan başka bir inme modelinde ise, apoptozu istatistiksel olarak azaltmıştır (Li, Li, 2009). Sprague–Dawley sıçanlarla yapılan diğer bir çalışmada İCA, beyin hücrelerinde ölü hücre sayısını azaltmış ve fosforile NF-κB protein ekspresyonunu azaltarak nöroprotektif ve anti-nöroinflamatuvar etkileri göstermiştir. SK/S1P yolağının nöroprotektif ve anti-nöroinflamatuvar etkilerinin yanı sıra Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında da etkili olduğu düşünülmektedir (Czubowicz, Ješko, Wencel, Lukiw ve Strosznajder, 2019). Yapılan klinik çalışmalarda Parkinson hastalarının Parkinson olmayanlarla kıyaslandığında, SK/S1P yolağının düzgün çalışmadığı ve serum S1P seviyesinin düşük olduğu saptanmıştır (Schwedhelm ve diğerleri, 2021). Başka bir klinik çalışma da, Parkinson hastalığında azalan serum S1P seviyelerini doğrulamakta ve ek olarak Alzheimer hastalarında da serum S1P düzeylerinde azalma olduğunu göstermektedir. (Oizumi ve diğerleri, 2022). Farelerde gerçekleştirilen Parkinson modellerinde SK enzim miktarının da kontrol ile kıyaslandığında azaldığı gösterilmiştir. Bu durumun S1P sentez yolağında

bozulmaların hastalığa sebep olduğu ve buna bağlı olarak hastalığın ilerlemesinde de etkili olduğu iddia edilmiştir (Sivasubramanian, Kanagaraj, Dheen ve Tay, 2015). Başka bir Parkinson fare modelinde, SK enzim miktarında azalma olduğu ve SK/S1P/S1PR sinyal yolağının Parkinson'a karşı tedavi edici etkiye sahip olabileceği ve bu sinyal yolağının nöroprotektif özellikleri vurgulanmıştır (Motyl, Przykaza, Boguszewski, Kosson ve Strosznajder, 2018). İnsan dopaminerjik hücrelerinde yapılan hücre kültürü deneylerinde, sfingozin kinaz enzimlerinin aktivitelerinin MPTP⁺(1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) 'e maruz kalmış hücrelerde, kontrole kıyasla azaldığı gösterilmiştir (J. A. Pyszko ve Strosznajder, 2014). Yapılan çalışmalarda, S1P metabolizmasının bozulması Alzheimer hastalığını kötüleştirdiğini amiloid B miktarını arttırdığı, kalsiyum akışını bozduğu ve lizozomal hasarı tetiklediği gösterilmiştir (Angelopoulou ve Piperi, 2019). İnsan dopaminerjik hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada SK enziminin, hem mRNA düzeyinde hem de protein düzeyinde ekspresyonu azalmış ve bu da hücre ölümünde artışlara neden olmuştur (J. Pyszko ve Strosznajder, 2014). Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında, SK/S1P sinyal yolağının Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda önemli rol oynadığını serum S1P seviyelerinin düşmesinin her iki hastalığı da olumsuz yönde etkilediği ve S1P homeostazının önemli rolü olduğu söylenebilir. Rafi ve arkadaşlarının yaptıkları bir derleme makalede, İCA'nın hem Parkinson'un hem de Alzheimer'in olumsuz etkilerini azalttığı bir çok çalışma örneklendirilmiştir (Rafi ve diğerleri, 2022). İCA ile Sprague-Dawley sıçanlar ve glia hücrelerinde yapılan bir çalışmada, hem LPS ile hem de 6-OHDA ile oluşturulmuş *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda dopaminerjik nöronları koruduğu gösterilmiştir (G. Q. Wang ve diğerleri, 2018). Sprague-Dawley sıçanlar ve PC12 hücre hattıyla yapılan başka bir çalışmada icariin 6-OHDA ile indüklenmiş hücrelerde, hücre canlılığını arttırdığı, Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı ve böylece dopaminerjik nöronları koruduğu gösterilmiştir (Lu ve diğerleri, 2018). Chen ve arkadaşlarının farelerde gerçekleştirdikleri bir Parkinson modelinde İCA, Bcl-2, caspase-3 ve Bax protein ekspresyonlarını PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden azaltarak, parkinson hastalığına karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir (W. F. Chen ve diğerleri, 2017). Sprague-Dawley sıçanlar ve PC12 hücre hattıyla yapılan ve rotenon (bir ROT) ile indüklenen Parkinson hastalığı modelinde ise İCA, mTOR ve P62'in fosforilasyonunu azaltmış ve dopaminerjik nöronların hayatta kalış sürelerini artırmıştır. İCA'nın ROT ile ortaya çıkan nöronal

hücre hasarında ve otofajide önemli etkileri olabileceği bu çalışma ile gösterilmiştir (Zeng ve diğerleri, 2019). C. Sheng ve arkadaşlarının Sprague-Dawley sıçanlar ile yaptıkları bir çalışmada, İCA'nın amiloid- β agregasyonuna etkisi araştırılmış, İCA'nın Alzheimer kaynaklı bilişimsel bozuklukları düzelttiği gösterilmiştir (C. Sheng ve diğerleri, 2017). Ayrıca kortikal nöron hücrelerinde İCA'nın hücre canlılığını arttırdığı ve amiloid- β ekspresyonlarını azalttığı gösterilmiştir (Sha, Li, Ye, Liu ve Xu, 2009). PC12 hücre hattında İCA, hücre apoptozise ve amiloid- β birikimine engel olduğu, hücrelerin hayatta kalış sürelerini arttırdığı ve PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden Alzheimer'a sebep olan proteinlerin ekspresyonlarını da düzenlediği gösterilmiştir (D. Zhang ve diğerleri, 2015). Sıçan hipokampusünde ise İCA, amiloid- β seviyelerini ve β -sekretaz ekspresyonunu azaltmıştır (Nie ve diğerleri, 2010).

Literatürde SK enzimi ve İCA arasındaki ortak farmakolojik etkilerin bir diğeri ise kardiyovasküler sistem üzerinde görülmektedir. SK/S1P yolağı ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişki, son yıllarda önemli bir araştırma konusu olmaktadır. S1P'nin kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri, vasküler tonus (Levkau, 2008), vasküler inflamasyon (Obinata ve Hla, 2019), tromboz (Hsia ve diğerleri, 2017) ve miyokardiyal enfarktüs gibi durumlarda ortaya çıkmaktadır (Waeber ve Walther, 2014). S1P ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişki araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Ateroskleroz (Soltau ve diğerleri, 2016) ve koroner arter hastalığına sahip kişilerde, kontrol grubuyla kıyaslandığında, kan S1P seviyelerinin düşük olduğu görülmektedir. Düşük S1P düzeylerinin HDL'nin ateroprotektif etkilerini azalttığı ve buna bağlı S1P'nin ateroskleroz ve koroner arter hastalığı (KAH) gibi kardiyovasküler hastalıkların gelişimiyle ilişkili olduğu göstermiştir (Sattler ve diğerleri, 2014). Ayrıca, S1P'in kalp fonksiyonları üzerindeki etkilerine de odaklanan çalışmaları görmek mümkündür (Christopher K. Means ve Brown, 2009). Özellikle, kardiyomiyositlerde S1P'nin anti-apoptotik etkileri olduğu da bildirilmektedir (K. Chen, Wang, Liu, Yang ve Jiang, 2022). S1P'nin sıçanlarda kalp krizi sonrası oluşan kalp hasarını ve kalp kasında apoptoz oranı azaltabileceği bulunmuştur (Fang ve diğerleri, 2017). Kardiyomiyoblastlarda yapılan bir çalışmada ise, SK-1 inhibisyonunun hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir (Pchejetski ve diğerleri, 2007). SK-1 geninden yoksun olan kardiyomiyositlerde miyositlerin hayatta kalma süreleri, kontrol grubuyla kıyaslandığında oldukça düşük bulunmuştur (Tao, Zhang, Vessey, Honbo ve Karliner, 2007). İCA'nın da kardiyoprotektif etkileri bulunmaktadır. Wistar

sıçanlarında yapılan iskemi ve reperfüzyon hasar modelinde İCA, PI3K-Akt sinyal yolağı üzerinden kardiyoprotektif etkiler göstermiştir. Bu çalışmada İCA grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında, infarktüs miktarını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır. Miyokardiyal apoptoz miktarı da kontrol grubu ile kıyaslandığında düşmüştür (Ke ve diğerleri, 2015). Diyabetik wistar sıçanlarla yapılan başka bir çalışmada İCA, sıçan kalplerindeki fibrozisi PI3K-Akt sinyal yolağını etkileyerek azaltmıştır. Bununla birlikte diyabetik sıçanlarla kıyaslandığında kalp yetmezliğini azaltmış ve hayvanlardaki hem sistolik hem de diastolik basınçları normalize etmiştir (L. Zhang ve diğerleri, 2021). M. Zhai ve ekibi, Sprague–Dawley sıçanlarda iskemi ve reperfüzyon hasarı modeli oluşturarak İCA'nın PI3K-Akt sinyal yolağı üzerinden caspase-3, Bax ve Bcl-2 gibi apoptoz proteinlerinin ekspresyon miktarlarını azalttığını bildirmişlerdir (M. Zhai ve diğerleri, 2015). Sıçan kalp hücrelerinde İCA, tunikamisin ile indüklenen toksik etkiyi ve apoptotik protein ekspresyonlarını azaltmış ve hücrenin hayatta kalış süresini uzatmıştır (Q. Zhang ve diğerleri, 2013). B. Wu ve arkadaşlarının yaptığı bir derleme makalede, hem sıçanlarda hem farelerde ve hem de kalp hücrelerinde yapılan çalışmalarda İCA, hücrelerin hayatta kalış sürelerini artırarak, oksidatif stres enzimlerini düzenleyerek ve apoptoz protein ekspresyonlarını da azaltarak kardiyoprotektif etkiler gösterdiği özetlenmektedir (B. Wu ve diğerleri, 2018).

5.3.3. Sfingozin-1-Fosfat Reseptör 1(S1PR1)'in Rolü

Sfingosin-1-fosfat reseptör 1'in (S1PR1) aktivasyonu, makrofajlar, mast hücreleri, dendritik hücreleri ve doğal katil hücreleri olmak üzere bir çok bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını ve göçünü düzenleyerek bağışıklık sistemi için önemli bir farmakolojik mekanizmayı oluşturmaktadır (Spiegel ve Milstien, 2011). Özellikle T ve B lenfositlerinin farklılaşması ve göçü, Multiple Skleroz gibi otoimmün hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar ve S1P'nin üzerindeki etkisi nedeniyle S1P'İ ilgi çekici bir farmakolojik hedef haline getirir (Marciniak ve diğerleri, 2018). Ek olarak S1P1 reseptörlerinin S1PR1//PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden, proliferasyonu ve apoptozu düzenlediği de bildirilmiştir (H. Wang ve diğerleri, 2018). S1PR1'lerin tüm bu etkilerinin yanı sıra endotel vasküler tonusun homeostazında da rol oynadığı yapılan derleme bir makalede pek çok yönüyle irdelenmektedir (Levkau, 2008).

S1P'nin vasküler tonus üzerindeki etki mekanizması, endotel ve düz kas hücrelerinde bulunan farklı reseptörlere bağlanması üzerinden belirlenmektedir. Damarlarda bulunan S1P, lokal olarak endotel ve düz kas hücreleri tarafından sentezlenebilir (Kurano ve Yatomi, 2018). S1P'nin, S1P1 ve/veya S1P3 reseptörlerine bağlanması sonucunda Akt'nin, PI3K'yi aktive ederek eNOS'un fosforilasyonuna ve NO üretiminin artmasına neden olduğu kabul edilmektedir. Ek olarak, S1P kaynaklı NOS aktivasyonunun kısmi olarak Ca²⁺/CaM'ye bağlı olduğu gösterilmiştir. NO, GS aktivasyonuna bağlı olarak sGMP üretimini katalizler. sGMP ise, PKG aktivasyonuna neden olur. PKG, Ca²⁺'yi azaltır ve bu sayede vazodilatasyonu gerçekleştirir (Watterson ve diğerleri, 2005). S1PR1'lerin farmakolojik bir hedef haline getiren en önemli hastalık Multiple Skleroz (MS) dur (Choi ve diğerleri, 2011). FDA onaylı tek S1PR1 modülatörü olan Fingolimod (FTY720) S1PR1/S1P sinyal yolağına etkileyerek immün sistem yanıtını düzenler ve MS hastalığının tedavisinde kullanılır (Pelletier ve Hafler, 2012). MS hastalığının laboratuvar ortamında taklit edilebilmesi için kullanılan önemli yöntemlerden biri olan Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE) hayvan modelinde fingolimodun S1PR1 modülatörü olarak etkisi gösterilmiştir (Aktas, Küry, Kieseier ve Hartung, 2010). Benzer şekilde İCA'nin de MS hastalığı üzerindeki tedavi edici özellikleri bir çok çalışmada gösterilmiştir (Jin ve diğerleri, 2019). Farelerde yapılan Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit ile indüklenen MS modelinde İCA, Fingolimoda benzer şekilde immün yanıtı düzenlemekte ve anti-inflamatuvar etkiler göstermektedir (Gao ve diğerleri, 2023). Farelerde yapılan Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit ile indüklenen MS modelinde İCA, proinflamatuvar proteinleri ve MS kaynaklı olumsuz etkileri azaltmaktadır (Cong ve diğerleri, 2020). Farelerde yapılan başka bir MS modelinde ise İCA'nın, apoptozu azalttığı ve inflamasyonu düzenlediği gösterilmiştir (Wei ve diğerleri, 2015). S1PR1 modülatörü olan fingolimodun hem kardiyoprotektif etkilere (Ahmed ve diğerleri, 2019) hem de vasküler tonusun düzenlenmesinde etkilidir (Tölle ve diğerleri, 2005). Fingolimoda benzer şekilde İCA da PI3K/Akt/eNOS yolağı üzerinden gevşetici etkilere sahiptir (H. Bin Xu ve Huang, 2007b). Projemizde kullandığımız S1PR1 antagonisti olan W146 (1-3 µM), organ banyosunda iki farklı konsantrasyonda 30 dk aorta dokularına inkübe edilmiş ve kümülatif İCA yanıtları alınmıştır. 1 µM W146 inkübasyonu varlığında İCA gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmezken, 3 µM W146 inkübasyonunda istatistiksel olarak anlamlılık

gözlemlenmiştir. S1P1 reseptörlerinin protein ekspresyon düzeyleri western blot deneyleri ile de incelenmiş ve İCA ile inkübe edilen dokularda kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel bir artış olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar ışığında İCA doğrudan veya dolaylı olarak S1PR1/PI3K/Akt/eNOS yolağı üzerinden gevşetici etkisini gösterebileceği söylenebilir.

5.3.4. Sfingozin-1-Fosfat Reseptör 3 (S1PR3)'ün Rolü

Sfingosin-1-fosfat reseptör 3 (S1PR3)'lerin endotel bariyerde, vasküler tonusta, kardiyak fibrozis ve pulmoner fibroziste görev aldığı gösterilmiştir. Dolaşım ve çevre doku arasında bulunan endotel bariyeri, fonksiyonel olarak oldukça önemlidir. Zarar görmesi vasküler sızıntının artmasına, enfeksiyonlara ve kanser hücrelerinin istilasıyla sonuçlanmaktadır (Qian Li ve diğerleri, 2021). Garcia ve arkadaşları, yüksek konsantrasyondaki S1P'nin; S1PR3/RhoA/Rho kinaz (ROCK) sinyal yolağı üzerinden endotel bariyerini G_i/Rac sinyallerine karşı koruduğunu ve Edg'ye bağlı hücre iskeletini yeniden düzenleyerek endotel hücre bariyerinin bütünlüğünü desteklediğini göstermişlerdir (Garcia ve diğerleri, 2001). S1PR3'lernin vasküler tonus üzerindeki etkileri ise iki şekilde gerçekleşmektedir. Endotel hücrelerinde bulunan S1PR3'lerin, NO üretimini başlatarak vazodilatasyonu uyardığı (Nofer ve diğerleri, 2004), vasküler düz kas hücrelerinde lokalize olan S1PR3'lerin ise hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunu artırarak vazokonstriksiyona neden olduğu bildirilmektedir (Murakami ve diğerleri, 2010). Çalışmamızda S1PR3 antagonisti olan CAY10444 (10-30 µM) organ banyosunda aorta dokularında iki farklı konsantrasyonlarda 30 dk süre ile inkübe edilmiş ve ardından kümülatif İCA yanıtları alınmıştır. İCA gevşeme yanıtlarında her iki konsantrasyon inkübasyonunda İCA gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Bununla birlikte S1PR3'lerin protein ekspresyon seviyeleri western blot deneyleriyle İCA varlığında ve yokluğunda araştırılmış ve S1PR3 protein ekspresyonunda da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Sonuç ve Öneriler

Projemizde İCA'nın, sfingozin sinyal yolağı ile ilişkisini aydınlatmak üzere, sfingozin biyosentezinde görevli enzimler ve vasküler tonusun düzenlenmesinde görev alan S1PR1 ve S1PR3'leri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu tez kapsamında İCA'nın sfingozin sinyal yolağı ile ilişkisi, izole organ banyosu deneyleri ile fonksiyonel yanıtlarda ve western blot deneyleriyle protein ekspresyonu düzeylerinde araştırılmıştır. İCA'nın seramidi, sfingozine dönüştüren seramidaz enzimi üzerindeki etkisi, seramidaz inhibitörü olan MAPP inkübasyonu varlığında araştırılmış ve MAPP ile inkübe edilen sıçan aortalarının İCA gevşemelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı bulunmuştur. Bu sonuca dayanarak İCA'nın seramidaz enzimi üzerinde bir etkisinin olmadığı ortaya konmuştur. Sfingozinin, sfingozin-1-fosfata dönüşümünden sorumlu olan sfingozin kinaz enzimi, sfingozin kinaz inhibitörü olan DMS kullanılarak araştırılmıştır. DMS ile inkübe edilen sıçan aortalarında İCA gevşemeleri, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmıştır. Bunun üzerine SK-1 ekspresyon düzeyleri western blot deneyleriyle bakılmış ve İCA inkübasyonu varlığında SK-1 ekspresyon düzeylerinin de arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, İCA gevşeme yanıtlarının sfingozin kinaz ile ilişkisini hem fonksiyonel yanıtlar üzerinden hem de protein ekspresyonundaki artış ile göstermektedir. Sfingozin-1-fosfat yolağında bulunan ve S1P biyosentezinde görev alan enzimlerin yanı sıra bu yolakta görevli reseptörler olan S1PR1 ve S1PR3'leri de projemiz kapsamında araştırılmıştır. S1PR1 antagonisti olan W146 ile yapılan çalışmalarda, İCA gevşeme yanıtlarının azaldığı izole organ banyosu deneylerinde gösterilmiştir. S1PR3 antagonisti olan CAY10444 ile yapılan çalışmalarda ise, İCA gevşemelerinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Bunun üzerine S1PR1 ve S1PR3'lerinin ekspresyon düzeyleri western blot deneyleri bakılmış ve S1PR1 düzeylerinin İCA varlığında artarken, S1PR3'lerin protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Tüm bu bulgular İCA'nın S1PR1'ler üzerinden doğrudan veya dolaylı (sentez enzimi) olarak etki gösterdiğini ve S1PR3'ü üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Literatürdeki çalışmalar ve bizim sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde, İCA'nın aortada gevşetici etkilerini sfingozin yolağında yer alan SK enzimi ve S1PR1 ile etkileşimi sonucu gerçekleştirdiğini ve başta anti-apoptotik, antioksidan ve kardiyoprotektif bu yararlı etkilerini sfingozin yolağı üzerinden gerçekleştirdiğini göstermektedir. İCA'nın aorta

üzerindeki bu gevşetici etkisini hem SK enzim ekspresyonunu artırmak suretiyle S1P miktarını arttırarak, hem de S1PR1 ekspresyon düzeylerini artırmak suretiyle S1PR1/PI3K/Akt yolağını aktive ederek gösterebileceği fikrini düşündürmekte ve elde ettiğimiz fonksiyonel yanıtlar bunu desteklemektedir. Günümüzde hala oldukça yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkili bir hastalık olan kardiyovasküler sistem hastalıklarına yönelik yeni ilaç ve ilaç hedeflerinin araştırılması ve tedavilerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Projemizde İCA'nın sfingozin sinyal yolağı üzerindeki olası farmakolojik etki mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmıştır. İCA'nın sfngozin sinyal yolağındaki enzimler ve reseptörleri üzerindeki etkisi **ilk kez** çalışmamızda gösterilmektedir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, İCA'nın vasküler dokuda sfingozin sinyal yolağını kullanarak gevşetici etkiler oluşturduğu kanıtlanmıştır. Bu kapsamda, İCA'nın SK/S1P/S1PR1 yolağının bozulduğu hastalıklarda tedavi edici etki potansiyeline sahip olabileceğini düşünmekteyiz. Projemizin sonuçlarından yola çıkarak, İCA'nın sfingozin yolağının bozulduğu başta kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere Multiple Skleroz, Astım, Parkinson ve Alzheimer gibi diğer hastalıkların tedavisinde de değerlendirilmek üzere önemli bir aday olabileceği düşünmekteyiz. Bu hipotezimizin desteklenmesi için bu yolağın bozulduğu hastalık modelleri oluşturularak, İCA etkisi *in vivo* koşullarda da araştırılmalıdır.

Kaynaklar

- Adada, M., Canals, D., Hannun, Y. A. ve Obeid, L. M. (2013, Aralık). Sphingosine-1-phosphate receptor 2. *FEBS Journal*. doi:10.1111/febs.12446
- Ahmed, N., Mehmood, A., Linardi, D., Sadiq, S., Tessari, M., Meo, S. A., ... Rungatscher, A. (2019). Cardioprotective Effects of Sphingosine-1-Phosphate Receptor Immunomodulator FTY720 in a Clinically Relevant Model of Cardioplegic Arrest and Cardiopulmonary Bypass. *Frontiers in Pharmacology*, 10(July), 1–13. doi:10.3389/fphar.2019.00802
- Akhter, M. Z., Chandra Joshi, J., Balaji Rangunathrao, V. A., Maienschein-Cline, M., Proia, R. L., Malik, A. B. ve Mehta, D. (2021). Programming to S1PR1+Endothelial Cells Promotes Restoration of Vascular Integrity. *Circulation Research*, 129(2), 221–236. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.318412
- Aktas, O., Küry, P., Kieseier, B. ve Hartung, H. P. (2010). Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 6(7), 373–382. doi:10.1038/nrneurol.2010.76
- Algandaby, M. M., Breikaa, R. M., Eid, B. G., Neamatallah, T. A., Abdel-Naim, A. B. ve Ashour, O. M. (2017). Icariin protects against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats: Implication of anti-angiogenic and anti-autophagic properties. *Pharmacological Reports*, 69(4), 616–624. doi:10.1016/j.pharep.2017.02.016
- Alves, N. G., Trujillo, A. N., Breslin, J. W. ve Yuan, S. Y. (2019). Sphingosine-1-phosphate reduces hemorrhagic shock and resuscitation-induced microvascular leakage by protecting endothelial mitochondrial integrity. *Shock*, 52(4), 423–433. doi:10.1097/SHK.0000000000001280
- Angelopoulou, E. ve Piperi, C. (2019). Beneficial Effects of Fingolimod in Alzheimer's Disease : Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *NeuroMolecular Medicine*, 21(3), 227–238. doi:10.1007/s12017-019-08558-2
- Anwar, M. ve Mehta, D. (2020). Post-translational modifications of S1PR1 and endothelial barrier regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(9), 158760. doi:10.1016/j.bbalip.2020.158760

- Aras-López, R., Blanco-Rivero, J., Hernanz, R., Briones, A. M., Rossoni, L. V., Ferrer, M., ... Balfagón, G. (2008). Chronic ouabain treatment increases the contribution of nitric oxide to endothelium-dependent relaxation. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 64(2), 115–125. doi:10.1007/bf03168239
- Ashley J Snider. (2014). Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate: regulators in autoimmune and inflammatory disease, 8(4), 1–17. doi:10.2217/ijr.13.40.Sphingosine
- Beljanski, V., Knaak, C. ve Smith, C. D. (2010). A novel sphingosine kinase inhibitor induces autophagy in tumor cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(2), 454–464. doi:10.1124/jpet.109.163337
- Bi, Z., Zhang, W. ve Yan, X. (2022). Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of icariin and icaritin. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 151(April), 113180. doi:10.1016/j.biopha.2022.113180
- Bolz, S., Vogel, L., Sollinger, D., Derwand, R., Boer, C., Pitson, S. M., ... Pohl, U. (2003). Sphingosine Kinase Modulates Microvascular Tone and Myogenic Responses Through Activation of RhoA/Rho Kinase, 342–347. doi:10.1161/01.CIR.0000080324.12530.0D
- Carlström, M. (2021). Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health. *Nature Reviews Nephrology*, 17(9), 575–590. doi:10.1038/s41581-021-00429-z
- Chan, H. ve Pitson, S. M. (2013). Post-translational regulation of sphingosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(1), 147–156. doi:10.1016/j.bbalip.2012.07.005
- Chang, C. L., Ho, M. C., Lee, P. H., Hsu, C. Y., Huang, W. P. ve Lee, H. (2009). S1P5 is required for sphingosine 1-phosphate-induced autophagy in human prostate cancer PC-3 cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 297(2), 451–458. doi:10.1152/ajpcell.00586.2008
- Chen, K., Wang, Z., Liu, C., Yang, X. ve Jiang, J. (2022). Sphingosine-1-phosphate Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-induced Cardiomyocyte Apoptosis Through Sphingosine-1-phosphate Receptor 1. *Archives of Medical Research*, 53(6), 562–573. doi:10.1016/j.arcmed.2022.08.002

- Chen, Q. P. ve Wei, P. (2013). Icariin supplementation protects mice from exercise-induced oxidant stress in liver. *Food Science and Biotechnology*, 22(5), 1–5. doi:10.1007/s10068-013-0230-6
- Chen, W. E. I., Lu, H., Yang, J. I. E., Xiang, H. ve Peng, H. U. I. (2016). Sphingosine 1-phosphate in metabolic syndrome, 1030–1038. doi:10.3892/ijmm.2016.2731
- Chen, W. F., Wu, L., Du, Z. R., Chen, L., Xu, A. L., Chen, X. H., ... Wong, M. S. (2017). Neuroprotective properties of icariin in MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: Involvement of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. *Phytomedicine*, 25, 93–99. doi:10.1016/j.phymed.2016.12.017
- Chiba, Y., Suzuki, K., Uechi, M., Kurihara, E., Goto, K., Sakai, H. ve Misawa, M. (2010). Downregulation of sphingosine-1-phosphate receptors in bronchial smooth muscle of mouse experimental asthma. *Pharmacological Research*, 62(4), 357–363. doi:10.1016/j.phrs.2010.05.005
- Choi, J. W., Gardell, S. E., Herr, D. R., Rivera, R., Lee, C. W., Noguchi, K., ... Chun, J. (2011). FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 751–756. doi:10.1073/pnas.1014154108
- Chung, B. H., Kim, J. D., Kim, C. K., Kim, J. W., Won, M. H., Lee, H. S., ... Kim, Y. M. (2008). Icariin stimulates angiogenesis by activating the MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways in human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(2), 404–408. doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.001
- Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P. ve Silverman, R. B. (2020). Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews*, 40(1), 158–189. doi:10.1002/med.21599
- Coant, N. ve Hannun, Y. A. (2019). Advances in Biological Regulation Neutral ceramidase : Advances in mechanisms , cell regulation , and roles in cancer. *Advances in Biological Regulation*, 71(October 2018), 141–146. doi:10.1016/j.jbior.2018.10.005
- Cogolludo, A., Villamor, E., Perez-vizcaino, F. ve Moreno, L. (2019). Ceramide and

Regulation of Vascular Tone. *International Journal of Molecular Sciences*, (2), 1–23. doi:10.3390/ijms20020411

Cong, H., Zhang, M., Chang, H., Du, L., Zhang, X. ve Yin, L. (2020). Icariin ameliorates the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis by down-regulating the major inflammatory signal pathways in a mouse relapse-remission model of multiple sclerosis. *European journal of pharmacology*, 885, 173523. doi:10.1016/J.EJPHAR.2020.173523

Constantinescu, V., Haase, R., Akgün, K. ve Ziemssen, T. (2022). S1P receptor modulators and the cardiovascular autonomic nervous system in multiple sclerosis: a narrative review. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 15, 1–25. doi:10.1177/17562864221133163

Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S. ve Zuckerbraun, B. S. (2020). Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical Care Clinics*, 36(2), 307–321. doi:10.1016/j.ccc.2019.12.009

Czubowicz, K., Jeśko, H., Wencel, P., Lukiw, W. J. ve Strosznajder, R. P. (2019). The Role of Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Molecular Neurobiology*, 56(8), 5436–5455. doi:10.1007/s12035-018-1448-3

Dantas, A. P. V., Igarashi, J. ve Michel, T. (2003). Sphingosine 1-phosphate and control of vascular tone. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 284(6 53-6), 2045–2052. doi:10.1152/ajpheart.01089.2002

Diaz Escarcega, R., McCullough, L. D. ve Tsvetkov, A. S. (2021). The Functional Role of Sphingosine Kinase 2. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(May), 1–7. doi:10.3389/fmolb.2021.683767

Diebel, M. E., Diebel, L. N. ve Liberati, D. M. (2019). Protective effects of plasma products on the endothelial-glycocalyx barrier following trauma-hemorrhagic shock: Is sphingosine-1 phosphate responsible? *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 87(5), 1061–1069. doi:10.1097/TA.0000000000002446

Ding, J., Tang, Y., Tang, Z., Zu, X., Qi, L., Zhang, X. ve Wang, G. (2018). Icariin improves the sexual function of male mice through the PI3K/AKT/eNOS/NO signalling pathway. *Andrologia*, 50(1), 1–6. doi:10.1111/and.12802

- Dominguez, G., Maddelein, M., Pucelle, M., Nicaise, Y., Maurage, C., Duyckaerts, C., ... Delisle, M. (2018). Neuronal sphingosine kinase 2 subcellular localization is altered in Alzheimer ' s disease brain, 1–14.
- Dong, J., El-zawahry, A. M., Guo, G., Hannun, Y. A. ve Holman, D. H. (2008). Acid ceramidase inhibition: a novel target for cancer therapy. *Frontiers in Bioscience*, 2293–2298.
- Doulias, P. T. ve Tenopoulou, M. (2020). Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. *F1000Research*, 9, 1–10. doi:10.12688/f1000research.19998.1
- Du, J., Zeng, C., Li, Q., Chen, B., Liu, H., Huang, X. ve Huang, Q. (2012). LPS and TNF- α induce expression of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in human microvascular endothelial cells. *Pathology Research and Practice*, 208(2), 82–88. doi:10.1016/j.prp.2011.11.008
- Duan, X. H., Xu, C. Q., Huang, J. H., Zhou, W. J. ve Sun, B. (2013). Icarin delays homocysteine-induced endothelial cellular senescence involving activation of the PI3K/AKT-eNOS signaling pathway. *Pharmaceutical Biology*, 51(4), 433–440. doi:10.3109/13880209.2012.738332
- Fang, R., Zhang, L. lu, Zhang, L. zhi, Li, W., Li, M. ve Wen, K. (2017). Sphingosine 1-Phosphate Postconditioning Protects Against Myocardial Ischemia/reperfusion Injury in Rats via Mitochondrial Signaling and Akt-Gsk3 β Phosphorylation. *Archives of Medical Research*, 48(2), 147–155. doi:10.1016/j.arcmed.2017.03.013
- Furuya, H. (2017). Involvement of Sphingosine Kinases / Sphingosine-1- Phosphate (S1P)/ S1P Receptors in Breast Cancer Subtypes, (October).
- Ga, S., Li, C., Quintern, L. E., Bernardo, K., Levran, O., Schnabel, D., ... Sandhoff, K. (1996). Molecular Cloning and Characterization of a Full-length Complementary DNA Encoding Human Acid Ceramidase, 271(51), 33110–33115. doi:10.1074/jbc.271.51.33110
- Gaengel, K., Niaudet, C., Hagikura, K., Siemsen, B. L., Muhl, L., Hofmann, J. J., ... Betsholtz, C. (2012). The Sphingosine-1-Phosphate Receptor S1PR1 Restricts Sprouting Angiogenesis by Regulating the Interplay between VE-Cadherin and

VEGFR2. *Developmental Cell*, 23(3), 587–599.
doi:10.1016/j.devcel.2012.08.005

Gao, D., Zheng, C. ceng, Hao, J. ping, Yang, C. cui ve Hu, C. ying. (2023). Icariin ameliorates behavioral deficits and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. *Brain Research*, 1804(January), 148267.
doi:10.1016/j.brainres.2023.148267

Garcia, J. G. N., Liu, F., Verin, A. D., Birukova, A., Dechert, M. A., Gerthoffer, W. T., ... English, D. (2001). Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *Journal of Clinical Investigation*, 108(5), 689–701. doi:10.1172/JCI12450

Greig, F. H., Nather, K., Ballantyne, M. D., Kazi, Z. H., Alganga, H., Ewart, M. A., ... Kennedy, S. (2019). Requirement for sphingosine kinase 1 in mediating phase 1 of the hypotensive response to anandamide in the anaesthetised mouse. *European Journal of Pharmacology*, 842(September 2018), 1–9.
doi:10.1016/j.ejphar.2018.10.027

Guo, L., Ou, X., Li, H. ve Han, Z. (2014). Roles of sphingosine-1-phosphate in reproduction. *Reproductive Sciences*, 21(5), 550–554.
doi:10.1177/1933719113512534

Hait, N. C., Oskeritzian, C. A., Paugh, S. W., Milstien, S. ve Spiegel, S. (2006). Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(12), 2016–2026.
doi:10.1016/j.bbamem.2006.08.007

He, C., Wang, Z. ve Shi, J. (2020). Pharmacological effects of icariin. *Advances in Pharmacology içinde* (C. 87, ss. 179–203). Academic Press Inc.
doi:10.1016/bs.apha.2019.10.004

Heffernan-Stroud, L. A. ve Obeid, L. M. (2013). *Sphingosine Kinase 1 in Cancer*. *Advances in Cancer Research* (1. bs., C. 117). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-394274-6.00007-8

Hoefler, J., Azam, M. A., Kroetsch, J. T. E., Poi, H. L., Momen, M. A., Voigtlaender-Bolz, J., ... Husain, M. (2010). Sphingosine-1-phosphate-dependent activation of p38 MAPK maintains elevated peripheral resistance in heart failure through

increased myogenic vasoconstriction. *Circulation Research*, 107(7), 923–933. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226464

Hsia, K., Yang, M. J., Chen, W. M., Yao, C. L., Lin, C. H., Loong, C. C., ... Lu, J. H. (2017). Sphingosine-1-phosphate improves endothelialization with reduction of thrombosis in recellularized human umbilical vein graft by inhibiting syndecan-1 shedding in vitro. *Acta Biomaterialia*, 51, 341–350. doi:10.1016/j.actbio.2017.01.050

Hu, L., Li, L., Zhang, H., Li, Q., Jiang, S., Qiu, J., ... Dong, J. (2019). Inhibition of airway remodeling and inflammatory response by Icariin in asthma. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1–10. doi:10.1186/s12906-019-2743-x

Hu, W. M., Li, L., Jing, B. Q., Zhao, Y. S., Wang, C. L., Feng, L. ve Xie, Y. E. (2010). Effect of S1P5 on proliferation and migration of human esophageal cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 16(15), 1859–1866. doi:10.3748/wjg.v16.i15.1859

Hwang, I., Lee, S. W., Oh, J., Lee, S. H., Jang, I. J. ve Yu, K. S. (2022). Dose-dependent reduction of lymphocyte count and heart rate after multiple administration of LC51-0255, a novel sphingosine-1-phosphate receptor 1 modulator, in healthy subjects. *Frontiers in Pharmacology*, 13(August), 1–10. doi:10.3389/fphar.2022.930615

Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S. ve Nakamura, S. (2003). Sphingosine Kinase 2 Is a Nuclear Protein and Inhibits DNA Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46832–46839. doi:10.1074/jbc.M306577200

Imasawa, T., Koike, K., Ishii, I., Chun, J. ve Yatomi, Y. (2010). Blockade of sphingosine 1-phosphate receptor 2 signaling attenuates streptozotocin-induced apoptosis of pancreatic β -cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 392(2), 207–211. doi:10.1016/j.bbrc.2010.01.016

Jaillard, C., Harrison, S., Stankoff, B., Aigrot, M. S., Calver, A. R., Duddy, G., ... Lubetzki, C. (2005). Edg8/S1P5: An oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *Journal of Neuroscience*, 25(6), 1459–1469. doi:10.1523/JNEUROSCI.4645-04.2005

- Jeya Paul, J., Weigel, C., Müller, T., Heller, R., Spiegel, S. ve Gräler, M. H. (2020). Inflammatory Conditions Disrupt Constitutive Endothelial Cell Barrier Stabilization by Alleviating Autonomous Secretion of Sphingosine 1-Phosphate. *Cells*, 9(4). doi:10.3390/cells9040928
- Ji, F., Mao, L., Liu, Y., Cao, X., Xie, Y. ve Wang, S. (2015). Biochemical and Biophysical Research Communications dexamethasone-induced damages to osteoblasts through activating SphK1-Akt signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(3), 568–575. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.007
- Jin, J., Wang, H., Hua, X., Chen, D., Huang, C. ve Chen, Z. (2019). *An outline for the pharmacological effect of icariin in the nervous system. European Journal of Pharmacology* (C. 842). Elsevier B.V. doi:10.1016/j.ejphar.2018.10.006
- Jozefczuk, E., Guzik, T. J. ve Siedlinski, M. (2020). Significance of sphingosine-1-phosphate in cardiovascular physiology and pathology. *Pharmacological Research*, 156(April), 104793. doi:10.1016/j.phrs.2020.104793
- Józefczuk, E., Nosalski, R., Saju, B., Crespo, E., Szczepaniak, P., Guzik, T. J. ve Siedlinski, M. (2019). Cardiovascular Effects of Pharmacological Targeting of Sphingosine Kinase 1, 383–392. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13450
- Kawamori, T., Kaneshiro, T., Okumura, M., Maalouf, S., Uflacker, A., Bielawski, J., ... Obeid, L. M. (2009). Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis. *The FASEB Journal*, 23(2), 405–414. doi:10.1096/fj.08-117572
- Ke, Z., Liu, J., Xu, P., Gao, A., Wang, L. ve Ji, L. (2015). The Cardioprotective Effect of Icariin on Ischemia-Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart: Potential Involvement of the PI3K-Akt Signaling Pathway. *Cardiovascular Therapeutics*, 33(3), 134–140. doi:10.1111/1755-5922.12121
- Kerage, D., Gombos, R. B., Wang, S., Brown, M. ve Hemmings, D. G. (2021). Sphingosine 1-phosphate-induced nitric oxide production simultaneously controls endothelial barrier function and vascular tone in resistance arteries. *Vascular Pharmacology*, 140(October 2020), 106874. doi:10.1016/j.vph.2021.106874

- Keul, P., van Borren, M. M. G. J., Ghanem, A., Müller, F. U., Baartscheer, A., Verkerk, A. O., ... Levkau, B. (2016). Sphingosine-1-phosphate receptor 1 regulates cardiac function by modulating Ca²⁺ sensitivity and Na⁺/H⁺ exchange and mediates protection by ischemic preconditioning. *Journal of the American Heart Association*, 5(5). doi:10.1161/JAHA.116.003393
- Kharel, Y., Lee, S., Snyder, A. H., Neill, S. L. S., Morris, M. A., Setiady, Y., ... Lynch, K. R. (2005). Sphingosine Kinase 2 Is Required for Modulation of Lymphocyte Traffic by FTY720. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 36865–36872. doi:10.1074/jbc.M506293200
- Kohno, M., Momoi, M., Oo, M. L., Paik, J.-H., Lee, Y.-M., Venkataraman, K., ... Hla, T. (2006). Intracellular Role for Sphingosine Kinase 1 in Intestinal Adenoma Cell Proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, 26(19), 7211–7223. doi:10.1128/mcb.02341-05
- Koizumi, H., Yu, J., Hashimoto, R., Ouchi, Y. ve Okabe, T. (2010). Involvement of androgen receptor in nitric oxide production induced by icariin in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Letters*, 584(11), 2440–2444. doi:10.1016/j.febslet.2010.04.049
- Kourosh-Arami, M., Hosseini, N., Mohsenzadegan, M., Komaki, A. ve Joghataei, M. T. (2020). Neurophysiologic implications of neuronal nitric oxide synthase. *Reviews in the Neurosciences*, 31(6), 617–636. doi:10.1515/revneuro-2019-0111
- Kurano, M. ve Yatomi, Y. (2017). Sphingosine 1-Phosphate and Atherosclerosis, 1–11.
- Kurano, M. ve Yatomi, Y. (2018). Sphingosine 1-phosphate and atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 25(1), 16–26. doi:10.5551/jat.RV17010
- Kwong, E. K., Li, X., Hylemon, P. B. ve Zhou, H. (2017). Sphingosine Kinases/Sphingosine 1-Phosphate Signaling in Hepatic Lipid Metabolism. *Current Pharmacology Reports*, 3(4), 176–183. doi:10.1007/s40495-017-0093-2
- Kwong, E. K., Liu, R., Zhao, D., Li, X., Zhu, W., Wang, X., ... Zhou, H. (2019). The role of sphingosine kinase 2 in alcoholic liver disease. *Digestive and Liver Disease*, 51(8), 1154–1163. doi:10.1016/j.dld.2019.03.020

- Landeem, L. K., Dederko, D. A., Kondo, C. S., Hu, B. S., Aroonsakool, N., Haga, J. H. ve Giles, W. R. (2008). Mechanisms of the negative inotropic effects of sphingosine-1-phosphate on adult mouse ventricular myocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 294(2), 736–749. doi:10.1152/ajpheart.00316.2007
- Langeslag, M. ve Kress, M. (2020). The ceramide-S1P pathway as a druggable target to alleviate peripheral neuropathic pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 24(9), 869–884. doi:10.1080/14728222.2020.1787989
- Lee, D. Y., Won, K. J., Lee, K. P., Jung, S. H., Baek, S., Chung, H. W., ... Kim, B. (2018). Angiotensin II facilitates neointimal formation by increasing vascular smooth muscle cell migration: Involvement of APE/Ref-1-mediated overexpression of sphingosine-1-phosphate receptor 1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 347, 45–53. doi:10.1016/j.taap.2018.03.032
- Levkau, B. (2008). Sphingosine-1-phosphate in the regulation of vascular tone: A finely tuned integration system of slp sources, receptors, and vascular responsiveness. *Circulation Research*, 103(3), 231–233. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.181610
- Li, Li, Z. Q.-X. S. J.-S. (2009). Protective effects of icariin on neurons. *ChinMedJ*, 118(19), 1637–1643.
- Li, N. ve Zhang, F. (2016). Implication of sphingosin-1-phosphate in cardiovascular regulation Department of Pharmacology and Toxicology , Medical College of Virginia Campus , Virginia Commonwealth Table 1 . S1P receptors and their coupled G proteins signaling molecule. *Frontiers in Bioscience*, 21, 1296–1313.
- Li, Qian, Li, Y., Lei, C., Tan, Y. ve Yi, G. (2021, 1 Ağustos). Sphingosine-1-phosphate receptor 3 signaling. *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.cca.2021.03.025
- Li, Qiang, Youn, J. Y. ve Cai, H. (2015). Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. *Journal of Hypertension*, 33(6), 1128–1136. doi:10.1097/HJH.0000000000000587
- Li, W., Wang, M. ve Wang, L. (2014). Icariin Synergizes with Arsenic Trioxide to Suppress Human Hepatocellular Carcinoma, (1), 427–436. doi:10.1007/s12013-

- Liu, H., Peng, H., Chen, S., Liu, Y., Xiang, H., Chen, R., ... Lu, H. (2017). S1PR2 antagonist protects endothelial cells against high glucose-induced mitochondrial apoptosis through the Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(3), 1119–1124. doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.189
- Liu, Q. W., Yang, Z. H., Jiang, J. ve Jiang, R. (2021). Icariin modulates eNOS activity via effect on post-translational protein-protein interactions to improve erectile function of spontaneously hypertensive rats. *Andrology*, 9(1), 342–351. doi:10.1111/andr.12875
- Liu, W. J., Xin, Z. C., Xin, H., Yuan, Y. M., Tian, L. ve Guo, Y. L. (2005). Effects of icariin on erectile function and expression of nitric oxide synthase isoforms in castrated rats. *Asian Journal of Andrology*, 7(4), 381–388. doi:10.1111/j.1745-7262.2005.00066.x
- Lu, D. S., Chen, C., Zheng, Y. X., Li, D. Di, Wang, G. Q., Liu, J., ... Zhang, F. (2018). Combination treatment of icariin and L-DOPA against 6-OHDA-lesioned dopamine neurotoxicity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(May), 1–10. doi:10.3389/fnmol.2018.00155
- Luo, Z., Dong, J. ve Wu, J. (2022). Impact of Icariin and its derivatives on inflammatory diseases and relevant signaling pathways. *International Immunopharmacology*, 108(March), 108861. doi:10.1016/j.intimp.2022.108861
- Maceyka, M., Payne, S. G., Milstien, S. ve Spiegel, S. (2002). Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1585(2–3), 193–201. doi:10.1016/S1388-1981(02)00341-4
- Mair, K. M., Robinson, E., Kane, K. A., Pyne, S., Brett, R. R., Pyne, N. J. ve Kennedy, S. (2010). Interaction between anandamide and sphingosine-1-phosphate in mediating vasorelaxation in rat coronary artery. *British Journal of Pharmacology*, 161(1), 176–192. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00878.x
- Marciniak, A., Camp, S. M., Garcia, J. G. N. ve Polt, R. (2018, 15 Aralık). An update on sphingosine-1-phosphate receptor 1 modulators. *Bioorganic and Medicinal*

- Mascall, K. S., Small, G. R., Gibson, G. ve Nixon, G. F. (2012). Sphingosine-1-phosphate-induced release of TIMP-2 from vascular smooth muscle cells inhibits angiogenesis. *Journal of Cell Science*, 125(9), 2267–2275. doi:10.1242/jcs.099044
- Mayol, K., Biajoux, V., Marvel, J., Balabanian, K. ve Walzer, T. (2011). Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood*, 118(18), 4863–4871. doi:10.1182/blood-2011-06-362574
- Means, Christopher K. ve Brown, J. H. (2009). Sphingosine-1-phosphate receptor signalling in the heart. *Cardiovascular Research*, 82(2), 193–200. doi:10.1093/cvr/cvp086
- Means, Christopher Kable, Miyamoto, S., Chun, J. ve Brown, J. H. (2008). S1P1 receptor localization confers selectivity for G_i-mediated cAMP and contractile responses. *Journal of Biological Chemistry*, 283(18), 11954–11963. doi:10.1074/jbc.M707422200
- Mendelson, K., Evans, T. ve Hla, T. (2014). Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development (Cambridge)*, 141(1), 5–9. doi:10.1242/dev.094805
- Michaud, J., Kohno, M., Proia, R. L. ve Hla, T. (2006). Normal acute and chronic inflammatory responses in sphingosine kinase 1 knockout mice, 580, 4607–4612. doi:10.1016/j.febslet.2006.07.035
- Miller, A. V., Alvarez, S. E., Spiegel, S. ve Lebman, D. A. (2008). Sphingosine Kinases and Sphingosine-1-Phosphate Are Critical for Transforming Growth Factor β -Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 Activation and Promotion of Migration and Invasion of Esophageal Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 28(12), 4142–4151. doi:10.1128/mcb.01465-07
- Miron, V. E., Schubart, A. ve Antel, J. P. (2008). Central nervous system-directed effects of FTY720 (fingolimod). *Journal of the Neurological Sciences*, 274(1–2), 13–17. doi:10.1016/j.jns.2008.06.031
- Motyl, J., Przykaza, Ł., Boguszewski, P. M., Kosson, P. ve Strosznajder, J. B. (2018). Pramipexole and Fingolimod exert neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease by activation of sphingosine kinase 1 and Akt kinase.

Neuropharmacology, 135, 139–150. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.02.023

Motyl, J. ve Strosznajder, J. B. (2018). Sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate receptors dependent signalling in neurodegenerative diseases. The promising target for neuroprotection in Parkinson's disease. *Pharmacological Reports*, 70(5), 1010–1014. doi:10.1016/j.pharep.2018.05.002

Mulders, A. C. M., Mathy, M. J., Meyer zu Heringdorf, D., ter Braak, M., Hajji, N., Olthof, D. C., ... Peters, S. L. M. (2009). Activation of sphingosine kinase by muscarinic receptors enhances NO-mediated and attenuates EDHF-mediated vasorelaxation. *Basic Research in Cardiology*, 104(1), 50–59. doi:10.1007/s00395-008-0744-x

Murakami, A., Takasugi, H., Ohnuma, S., Koide, Y., Sakurai, A., Takeda, S., ... Takakura, N. (2010). Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P 3 receptor: Investigation based on a new S1P3 receptor antagonist. *Molecular Pharmacology*, 77(4), 704–713. doi:10.1124/mol.109.061481

Nakade, Y., Banno, Y., T-Koizumi, K., Hagiwara, K., Sobue, S., Koda, M., ... Murate, T. (2003). Regulation of sphingosine kinase 1 gene expression by protein kinase C in a human leukemia cell line, MEG-O1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1635(2–3), 104–116. doi:10.1016/j.bbalip.2003.11.001

Nayak, D., Huo, Y., Kwang, W. X. T., Pushparaj, P. N., Kumar, S. D., Ling, E. A. ve Dheen, S. T. (2010). Sphingosine kinase 1 regulates the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide in activated microglia. *Neuroscience*, 166(1), 132–144. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.020

Neubauer, H. A. ve Pitson, S. M. (2013). Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kinase 2. *FEBS Journal*, 280(21), 5317–5336. doi:10.1111/febs.12314

Nie, J., Luo, Y., Huang, X. N., Gong, Q. H., Wu, Q. ve Shi, J. S. (2010). Icaritin inhibits beta-amyloid peptide segment 25-35 induced expression of β -secretase in rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 626(2–3), 213–218. doi:10.1016/j.ejphar.2009.09.039

- Niedernberg, A., Blaukat, A., Schöneberg, T. ve Kostenis, E. (2003). Regulated and constitutive activation of specific signalling pathways by the human S1P 5 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 138(3), 481–493. doi:10.1038/sj.bjp.0705055
- Nitzsche, A., Poittevin, M., Benarab, A., Bonnin, P., Faraco, G., Uchida, H., ... Camerer, E. (2021). Endothelial S1P1 Signaling Counteracts Infarct Expansion in Ischemic Stroke. *Circulation Research*, 128(3), 363–382. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316711
- Nofer, J. R., Van Der Giet, M., Tölle, M., Wolinska, I., Von Wnuck Lipinski, K., Baba, H. A., ... Levkau, B. (2004). HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Journal of Clinical Investigation*, 113(4), 569–581. doi:10.1172/JCI200418004
- Novgorodov, A. S., El-Awani, M., Bielawski, J., Obeid, L. M. ve Gudz, T. I. (2007). Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. *The FASEB Journal*, 21(7), 1503–1514. doi:10.1096/fj.06-7420com
- Obinata, H. ve Hla, T. (2019). Sphingosine 1-phosphate and inflammation. *International Immunology*, 31(9), 617–625. doi:10.1093/intimm/dxz037
- Oizumi, H., Sugimura, Y., Totsune, T., Kawasaki, I., Ohshiro, S., Baba, T., ... Takeda, A. (2022). Plasma sphingolipid abnormalities in neurodegenerative diseases. *PLoS ONE*, 17(12 December), 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0279315
- Okino, N., He, X., Gatt, S., Sandhoff, K., Ito, M. ve Schuchman, E. H. (2003). The Reverse Activity of Human Acid Ceramidase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29948–29953. doi:10.1074/jbc.M303310200
- Olesch, C., Ringel, C., Brüne, B. ve Weigert, A. (2017). Beyond Immune Cell Migration: The Emerging Role of the Sphingosine-1-phosphate Receptor S1PR4 as a Modulator of Innate Immune Cell Activation. *Mediators of Inflammation*. Hindawi Limited. doi:10.1155/2017/6059203
- Olivera, A., Rosenfeldt, H. M., Bektas, M., Wang, F., Ishii, I., Chun, J., ... Spiegel, S. (2003). Sphingosine Kinase Type 1 Induces G12/13-mediated Stress Fiber Formation, yet Promotes Growth and Survival Independent of G Protein-coupled

- Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46452–46460. doi:10.1074/jbc.M308749200
- Ozsarlak-Sozer, G., Sevin, G., Ozgur, H. H., Yetik-Anacak, G. ve Kerry, Z. (2016). Diverse effects of taurine on vascular response and inflammation in GSH depletion model in rabbits, 20(7), 1360–1372.
- Park, J. ve Schuchman, E. H. (2006). Acid ceramidase and human disease, 1758, 2133–2138. doi:10.1016/j.bbamem.2006.08.019
- Pchejetski, D., Doumerc, N., Golzio, M., Naymark, M., Teissie, J., Kohama, T., ... Cuvillier, O. (2008). Chemosensitizing effects of sphingosine kinase-1 inhibition in prostate cancer cell and animal models, 1836–1845. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-2322
- Pchejetski, D., Kunduzova, O., Dayon, A., Calise, D., Seguelas, M. H., Leducq, N., ... Cuvillier, O. (2007). Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circulation Research*, 100(1), 41–49. doi:10.1161/01.RES.0000253900.66640.34
- Pelletier, D. ve Hafler, D. A. (2012). Fingolimod for multiple sclerosis. *Drug and Therapeutics Bulletin*, 50(2), 18–20. doi:10.1136/dtb.2012.02.0086
- Pitson, S. M. (2011). Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(2), 97–107. doi:10.1016/j.tibs.2010.08.001
- Pyne, N. J., Adams, D. R. ve Pyne, S. (2017). Sphingosine Kinase 2 in Autoimmune / Inflammatory Disease and the Development of Sphingosine Kinase 2 Inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 581–591. doi:10.1016/j.tips.2017.04.003
- Pyne, N. J. ve Pyne, S. (2010, Temmuz). Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature Reviews Cancer*. doi:10.1038/nrc2875
- Pyszko, J. A. ve Strosznajder, J. B. (2014). The key role of sphingosine kinases in the molecular mechanism of neuronal cell survival and death in an experimental model of Parkinson's disease. *Folia Neuropathologica*, 52(3), 260–269. doi:10.5114/fn.2014.45567
- Pyszko, J. ve Strosznajder, J. B. (2014). Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine-1-

Phosphate in Oxidative Stress Evoked by 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP⁺) in Human Dopaminergic Neuronal Cells. *Molecular Neurobiology*, 50(1), 38–48. doi:10.1007/s12035-013-8622-4

Qiu, Y., Shen, J., Jiang, W., Yang, Y., Liu, X. ve Zeng, Y. (2022). Sphingosine 1-phosphate and its regulatory role in vascular endothelial cells. *Histology and Histopathology*, 37(3), 213–226. doi:10.14670/HH-18-428

Rafī, M., Morteza, K. ve Berenji, G. (2022). Icarin: A Potential Neuroprotective Agent in Alzheimer ' s Disease and Parkinson ' s Disease. *Neurochemical Research*, 47(10), 2954–2962. doi:10.1007/s11064-022-03667-0

Roviezzo, F., Bucci, M., Delisle, C., Brancaleone, V., Lorenzo, A. Di, Mayo, I. P., ... Cirino, G. (2006). Essential requirement for sphingosine kinase activity in eNOS-dependent NO release and vasorelaxation. *The FASEB Journal*, 20(2), 340–342. doi:10.1096/fj.05-4647fje

Sattler, K., Lehmann, I., Gräler, M., Bröcker-Preuss, M., Erbel, R., Heusch, G. ve Levkau, B. (2014). HDL-bound sphingosine 1-phosphate (S1P) predicts the severity of coronary artery atherosclerosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(1), 172–184. doi:10.1159/000362993

Schwedhelm, E., Englisch, C., Niemann, L., Lezius, S., von Lucadou, M., Marmann, K., ... Choe, C. un. (2021). Sphingosine-1-Phosphate, Motor Severity, and Progression in Parkinson's Disease (MARK-PD). *Movement Disorders*, 36(9), 2178–2182. doi:10.1002/mds.28652

Scott, F. L., Clemons, B., Brooks, J., Brahmachary, E., Powell, R., Dedman, H., ... Peach, R. J. (2016). Ozanimod (RPC1063) is a potent sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P1) and receptor-5 (S1P5) agonist with autoimmune disease-modifying activity. *British Journal of Pharmacology*, 173(11), 1778–1792. doi:10.1111/bph.13476

Sha, D., Li, L., Ye, L., Liu, R. ve Xu, Y. (2009). Icarin inhibits neurotoxicity of β -amyloid by upregulating cocaine-regulated and amphetamine-regulated transcripts. *NeuroReport*, 20(17), 1564–1567. doi:10.1097/WNR.0b013e328332d345

Shao-Rui, C., Xiang-Zhen, X., Yu-Hua, W., Jian-Wen, C., Suo-Wen, X., Lian-Quan,

- G. ve Pei-Qing, L. (2010). Icariin derivative inhibits inflammation through suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ b pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(8), 1307–1313. doi:10.1248/bpb.33.1307
- Sheng, C., Xu, P., Zhou, K., Deng, D., Zhang, C. ve Wang, Z. (2017). Icariin Attenuates Synaptic and Cognitive Deficits in an A β 1-42-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2017. doi:10.1155/2017/7464872
- Sheng, R., Zhang, T., Felice, V. D., Qin, T., Qin, Z., Smith, C. D., ... Waeber, C. (2014). Preconditioning Stimuli Induce Autophagy via Sphingosine Kinase 2 in Mouse Cortical Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 20845–20857. doi:10.1074/jbc.M114.578120
- Shi, Y., Rehman, H., Ramshesh, V. K., Schwartz, J., Liu, Q., Krishnasamy, Y., ... Zhong, Z. (2012). Sphingosine kinase-2 inhibition improves mitochondrial function and survival after hepatic ischemia – reperfusion. *Journal of Hepatology*, 56(1), 137–145. doi:10.1016/j.jhep.2011.05.025
- Shu, X., Keller, T. C. S., Begandt, D., Butcher, J. T., Biwer, L., Keller, A. S., ... Isakson, B. E. (2015). Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(23), 4561–4575. doi:10.1007/s00018-015-2021-0
- Sic, H., Kraus, H., Madl, J., Flittner, K. A., Von Münchow, A. L., Pieper, K., ... Eibel, H. (2014). Sphingosine-1-phosphate receptors control B-cell migration through signaling components associated with primary immunodeficiencies, chronic lymphocytic leukemia, and multiple sclerosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(2). doi:10.1016/j.jaci.2014.01.037
- Sivasubramanian, M., Kanagaraj, N., Dheen, S. T. ve Tay, S. S. W. (2015). Sphingosine kinase 2 and sphingosine-1-phosphate promotes mitochondrial function in dopaminergic neurons of mouse model of Parkinson's disease and in MPP⁺-treated MN9D cells in vitro. *Neuroscience*, 290(February), 636–648. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.032
- Soltau, I., Mudersbach, E., Geissen, M., Schwedhelm, E., Winkler, M. S., Geffken,

- M., ... Daum, G. (2016). Serum-sphingosine-1-phosphate concentrations are inversely associated with atherosclerotic diseases in humans. *PLoS ONE*, *11*(12). doi:10.1371/journal.pone.0168302
- Song, D. D., Zhang, T. T., Chen, J. L., Xia, Y. F., Qin, Z. H., Waeber, C. ve Sheng, R. (2017). Sphingosine kinase 2 activates autophagy and protects neurons against ischemic injury through interaction with Bcl-2 via its putative BH3 domain. *Cell Death and Disease*, *8*(7), e2912-14. doi:10.1038/cddis.2017.289
- Song, D. D., Zhou, J. H. ve Sheng, R. (2018). Regulation and function of sphingosine kinase 2 in diseases. *Histology and Histopathology*, *33*(5), 433–445. doi:10.14670/HH-11-939
- Song, Libing, Xiong, H., Li, J., Liao, W., Wang, L., Wu, J. ve Li, M. (2011). Sphingosine kinase-1 enhances resistance to apoptosis through activation of PI3K/Akt/NF- κ B pathway in human non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, *17*(7), 1839–1849. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0720
- Song, Linjiang, Chen, X., Mi, L., Liu, C., Zhu, S., Yang, T., ... Liang, X. (2020). Icariin-induced inhibition of SIRT6/NF- κ B triggers redox mediated apoptosis and enhances anti-tumor immunity in triple-negative breast cancer. *Cancer Science*, *111*(11), 4242–4256. doi:10.1111/cas.14648
- Spiegel, S. ve Milstien, S. (2011). The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nature Reviews Immunology*, *11*(6), 403–415. doi:10.1038/nri2974
- Spijkers, L. J. A., Alewijnse, A. E. ve Peters, S. L. M. (2012). FTY720 (fingolimod) increases vascular tone and blood pressure in spontaneously hypertensive rats via inhibition of sphingosine kinase. *British Journal of Pharmacology*, *166*(4), 1411–1418. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01865.x
- Stoltenberg, E., A., A., E., B. ve Lang Jr., J. D. (2012). The Influences of Nitric Oxide on Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Liver Transplantation - Basic Issues*, (February). doi:10.5772/27998
- Studer, E., Zhou, X., Zhao, R., Wang, Y., Takabe, K., Nagahashi, M., ... Hylemon, P. B. (y.y.). Conjugated Bile Acids Activate the Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 in Primary Rodent Hepatocytes.
- Sukocheva, O. A., Furuya, H., Ng, M. L., Friedemann, M., Menschikowski, M.,

- Tarasov, V. V., ... Bishayee, A. (2020). Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate receptor signaling pathway in inflammatory gastrointestinal disease and cancers: A novel therapeutic target. *Pharmacology and Therapeutics*, 207, 107464. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.107464
- Sukocheva, O., Wang, L., Verrier, E., Vadas, M. A. ve Xia, P. (2009). Restoring endocrine response in breast cancer cells by inhibition of the sphingosine kinase-1 signaling pathway. *Endocrinology*, 150(10), 4484–4492. doi:10.1210/en.2009-0391
- Takuwa, N., Ohkura, S. I., Takashima, S. I., Ohtani, K., Okamoto, Y., Tanaka, T., ... Takuwa, Y. (2010). S1P 3-mediated cardiac fibrosis in sphingosine kinase 1 transgenic mice involves reactive oxygen species. *Cardiovascular Research*, 85(3), 484–493. doi:10.1093/cvr/cvp312
- Tao, R., Zhang, J., Vessey, D. A., Honbo, N. ve Karliner, J. S. (2007). Deletion of the Sphingosine Kinase-1 gene influences cell fate during hypoxia and glucose deprivation in adult mouse cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 74(1), 56–63. doi:10.1016/j.cardiores.2007.01.015
- Tauseef, M., Kini, V., Knezevic, N., Brannan, M., Ramchandaran, R., Fyrst, H., ... Mehta, D. (2008). Activation of sphingosine kinase-1 reverses the increase in lung vascular permeability through sphingosine-1-phosphate receptor signaling in endothelial cells. *Circulation Research*, 103(10), 1164–1172. doi:10.1161/01.RES.0000338501.84810.51
- Tölle, M., Levkau, B., Keul, P., Brinkmann, V., Giebing, G., Schönfelder, G., ... Van Der Giet, M. (2005). Immunomodulator FTY720 induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circulation Research*, 96(8), 913–920. doi:10.1161/01.RES.0000164321.91452.00
- Tsuchida, J., Nagahashi, M., Nakajima, M., Katsuta, E., Rashid, O. M., Qi, Q., ... Wakai, T. (2020). Sphingosine Kinase 1 is Associated With Immune Cell-Related Gene Expressions in Human Breast Cancer. *Journal of Surgical Research*, 256, 645–656. doi:10.1016/j.jss.2020.06.057
- Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R. ve Misra, M. K. (2004). Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *Journal of*

Biomedicine and Biotechnology, 2004(4), 227–237.
doi:10.1155/S1110724304402034

- Venkata, J. K., An, N., Stuart, R., Costa, L. J., Cai, H., Coker, W., ... Smith, C. (2014). Inhibition of sphingosine kinase 2 downregulates the expression of c-Myc and Mcl-1 and induces apoptosis in multiple myeloma, *124*(12), 1915–1925. doi:10.1182/blood-2014-03-559385.J.K.V.
- Vessey, D. A., Kelley, M., Zhang, J., Li, L., Tao, R. ve Karliner, J. S. (2007). Dimethylsphingosine and FTY720 Inhibit the SK1 Form but Activate the SK2 Form of Sphingosine Kinase from Rat Heart, *21*(5), 273–279.
- Waeber, C. ve Walther, T. (2014). Sphingosine-1-phosphate as a potential target for the treatment of myocardial infarction. *Circulation Journal*, *78*(4), 795–802. doi:10.1253/circj.CJ-14-0178
- Wang, C., Xu, T., Lachance, B. B., Zhong, X., Shen, G., Xu, T., ... Jia, X. (2021). Critical roles of sphingosine kinase 1 in the regulation of neuroinflammation and neuronal injury after spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*, *18*(1), 1–19. doi:10.1186/s12974-021-02092-4
- Wang, G. Q., Li, D. Di, Huang, C., Lu, D. S., Zhang, C., Zhou, S. Y., ... Zhang, F. (2018). Icarin reduces dopaminergic neuronal loss and microglia-mediated inflammation in vivo and in vitro. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*(January), 1–11. doi:10.3389/fnmol.2017.00441
- Wang, H., Huang, H. ve Ding, S. F. (2018). Sphingosine-1-phosphate promotes the proliferation and attenuates apoptosis of Endothelial progenitor cells via S1PR1/S1PR3/PI3K/Akt pathway. *Cell Biology International*, *42*(11), 1492–1502. doi:10.1002/cbin.10991
- Wang, P., Yuan, Y., Lin, W., Zhong, H., Xu, K. ve Qi, X. (2019). Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in cancer. *Cancer Cell International*, *19*(1), 1–12. doi:10.1186/s12935-019-1014-8
- Watterson, K. R., Ratz, P. H. ve Spiegel, S. (2005). The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. *Cellular Signalling*, *17*(3), 289–298. doi:10.1016/j.cellsig.2004.09.013
- Wei, Z., Deng, X., Hong, M., Su, Q., Liu, A., Huang, Y., ... Peng, Z. (2015). Icarin

has synergistic effects with methylprednisolone to ameliorate EAE via modulating HPA function, promoting anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(11), 20188–20197.

Weigert, A., Cremer, S., Schmidt, M. V., Knethen, A. Von, Angioni, C. ve Geisslinger, G. (2010). Cleavage of sphingosine kinase 2 by caspase-1 provokes its release from apoptotic cells, *115*(17), 3531–3540. doi:10.1182/blood-2009-10-243444.The

Wigger, D., Schumacher, F., Schneider-Schaulies, S. ve Kleuser, B. (2021). Sphingosine 1-phosphate metabolism and insulin signaling. *Cellular Signalling*, 82(January), 109959. doi:10.1016/j.cellsig.2021.109959

Winkler, M. S., Nierhaus, A., Poppe, A., Greiwe, G., Gräler, M. H. ve Daum, G. (2017). Sphingosine-1-Phosphate: A Potential Biomarker and Therapeutic Target for Endothelial Dysfunction and Sepsis? *Shock*, 47(6), 666–672. doi:10.1097/SHK.0000000000000814

Wu, B., Feng, J. yu, Yu, L. ming, Wang, Y. chun, Chen, Y. qing, Wei, Y., ... Ha, X. qin. (2018). *Icariin protects cardiomyocytes against ischaemia/reperfusion injury by attenuating sirtuin 1-dependent mitochondrial oxidative damage. British Journal of Pharmacology* (C. 175). doi:10.1111/bph.14457

Wu, C. T., Chen, M. C., Liu, S. H., Yang, T. H., Long, L. H., Guan, S. S. ve Chen, C. M. (2021). Bioactive flavonoids icaritin and icariin protect against cerebral ischemia–reperfusion-associated apoptosis and extracellular matrix accumulation in an ischemic stroke mouse model. *Biomedicines*, 9(11). doi:10.3390/biomedicines9111719

Wu, Z., Xiang, Y., Zhu, X., Shi, X., Chen, S. ve Wan, X. (2022). International Immunopharmacology Icariin represses the inflammatory responses and survival of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by regulating the TRIB1 / TLR2 / NF-κB pathway. *International Immunopharmacology*, 110(17), 108991. doi:10.1016/j.intimp.2022.108991

Xiao, H. B., Sui, G. G. ve Lu, X. Y. (2017). Icariin improves eNOS/NO pathway to prohibit the atherogenesis of apolipoprotein E-null mice. *Canadian Journal of*

Physiology and Pharmacology, 95(6), 625–633. doi:10.1139/cjpp-2016-0367

- Xu, H. Bin ve Huang, Z. Q. (2007a). Icariin enhances endothelial nitric-oxide synthase expression on human endothelial cells in vitro. *Vascular Pharmacology*, 47(1), 18–24. doi:10.1016/j.vph.2007.03.002
- Xu, H. Bin ve Huang, Z. Q. (2007b). Vasorelaxant effects of icariin on isolated canine coronary artery. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 49(4), 207–213. doi:10.1097/FJC.0b013e3180325abe
- Xu, R., Antwi, P. ve Mao, C. (2021). Alkaline ceramidase family : The first two decades. *Cellular Signalling*, 78(November 2020), 109860. doi:10.1016/j.cellsig.2020.109860
- Xue, T., Ji, J., Sun, Y., Huang, X., Cai, Z., Yang, J., ... Sun, X. (2022). Sphingosine-1-phosphate, a novel TREM2 ligand, promotes microglial phagocytosis to protect against ischemic brain injury. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(4), 1885–1898. doi:10.1016/j.apsb.2021.10.012
- Yang, L., Lu, D., Guo, J., Meng, X., Zhang, G. ve Wang, F. (2013). Icariin from *Epimedium brevicornum* Maxim promotes the biosynthesis of estrogen by aromatase (CYP19). *Journal of Ethnopharmacology*, 145(3), 715–721. doi:10.1016/j.jep.2012.11.031
- Yetik-Anacak, G., Dereli, M. V., Sevin, G., Ozzayim, O., Erac, Y. ve Ahmed, A. (2015). Resveratrol stimulates hydrogen sulfide (H₂S) formation to relax murine corpus cavernosum. *Journal of Sexual Medicine*, 12(10), 2004–2012. doi:10.1111/jsm.12993
- Zeng, R., Zhou, Q., Zhang, W., Fu, X., Wu, Q., Lu, Y., ... Zhou, S. (2019). Icariin-mediated activation of autophagy confers protective effect on rotenone induced neurotoxicity in vivo and in vitro. *Toxicology Reports*, 6(June), 637–644. doi:10.1016/j.toxrep.2019.06.014
- Zhai, M., He, L., Ju, X., Shao, L., Li, G., Zhang, Y., ... Zhao, H. (2015). Icariin Acts as a Potential Agent for Preventing Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(2), 589–597. doi:10.1007/s12013-014-0506-3
- Zhai, Y. K., Guo, X. Y., Ge, B. F., Zhen, P., Ma, X. N., Zhou, J., ... Chen, K. M. (2014). Icariin stimulates the osteogenic differentiation of rat bone marrow

stromal cells via activating the PI3K-AKT-eNOS-NO-cGMP-PKG. *Bone*, 66, 189–198. doi:10.1016/j.bone.2014.06.016

Zhang, D., Wang, Z., Sheng, C., Peng, W., Hui, S., Gong, W. ve Chen, S. (2015). Icariin Prevents Amyloid Beta-Induced Apoptosis via the PI3K/Akt Pathway in PC-12 Cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. doi:10.1155/2015/235265

Zhang, H., Zhuo, S., Song, D., Wang, L., Gu, J., Ma, J., ... Guo, Y. (2021). Icariin inhibits intestinal inflammation of dss-induced colitis mice through modulating intestinal flora abundance and modulating p-p65/p65 molecule. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 32(4), 382–392. doi:10.5152/tjg.2021.20282

Zhang, L., Wang, S., Li, Y., Wang, Y., Dong, C. ve Xu, H. (2021). Cardioprotective effect of icariin against myocardial fibrosis and its molecular mechanism in diabetic cardiomyopathy based on network pharmacology: Role of ICA in DCM. *Phytomedicine*, 91(January), 153607. doi:10.1016/j.phymed.2021.153607

Zhang, Q., Li, H., Wang, S., Liu, M., Feng, Y. ve Wang, X. (2013). Icariin protects rat cardiac H9c2 cells from apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17845–17860. doi:10.3390/ijms140917845

Zhang, W., Yuan, W., Xu, N., Li, J. ve Chang, W. (2017). Icariin improves acute kidney injury and proteinuria in a rat model of pregnancy-induced hypertension. *Molecular Medicine Reports*, 16(5), 7398–7404. doi:10.3892/mmr.2017.7513

Zhang, Y., Xu, D., Huang, P., Zhang, Y., Li, Q., Fan, Z. ve Ren, L. (2021). Essential role of protein kinase C β I in icariin-mediated protection against atherosclerosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73(9), 1169–1179. doi:10.1093/jpp/rgab040

Zhang, Z. ve Yang, Q. (2006). The testosterone mimetic properties of icariin, 8(5), 601–605. doi:10.1111/j.1745-7262.2006.00197.x

Zhu, F. ve Ren, Z. H. E. (2022). Icariin inhibits the malignant progression of lung cancer by affecting the PI3K / Akt pathway through the miR - 205 - 5p / PTEN axis. doi:10.3892/or.2022.8326

Ekler

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2021-089
KONU: Onay

24.11.2021

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda “**ICARİİNİN VASKÜLER GEVŞETİCİ ETKİSİNDE SFİNGOZİN-1-FOSFAT RESEPTÖR 1(S1PR1)’İN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**” isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: **Doç. Dr. Gülnur Sevin, Ege Üniversitesi Eczacılık Fak Farmakoloji AD**
Arş. Gör. Elif Alan, Ege Üniversitesi Eczacılık Fak Farmakoloji AD
YL. Öğr. Ozan Mert, Ege Üniversitesi Eczacılık Fak Farmakoloji AD

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda 34 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

T.C.
Ege Üniversitesi REKTÖRLÜĞÜ
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü

Konu: Yürürlüğe giren proje öneriniz

27.09.2022

Sayın Doç. Dr. Gülnur SEVİN,

Aşağıda bilgileri özetlenen proje önerinize yönelik değerlendirme süreci tamamlanmış ve BAP Komisyonu tarafından desteklenmesi uygun görülen projeniz, proje sözleşmesinin Rektörlük Makamı tarafından onaylanmasıyla yürürlüğe girmiş bulunmaktadır.

Tebrik eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Saygılarımla,

Koordinatör Doç. Dr. Iskender İNCE

Proje Bilgileri

Proje no	75582
Proje adı	İcariinin vasküler gevşetici etkisinde sfingozin-1-fosfat Reseptör 1 (S1PR1)'in rolünün araştırılması
Proje türü	Genel Araştırma Projesi
Proje grubu	Tıp Sağlık
Proje süresi	18 ay
Başlangıç tarihi	20.07.2022
Proje bütçesi	₺74.999,13
Proje yürütücüsü	Doç. Dr. Gülnur SEVİN
Araştırmacılar	Araş. Gör. Elif ALAN, Lisansüstü Öğrencisi Ozan MERT

Teşekkürler

Tez çalışmalarımda şahsıma, bilgi ve desteği ile yardımcı olan tez danışmanım, Sayın Doç. Dr. Gülnur SEVİN'e;

Bilgi ve tecrübelerini paylaşan, laboratuvar çalışma arkadaşım Arş. Gör. Elif ALAN ALBAYRAK'a ve laboratuvarda bana olan destekleri nedeniyle laboratuvar çalışma arkadaşım, Gülcan DEMİR'e;

Yüksek Lisans eğitimim boyunca destek olan bütün hocalarıma ve farmakoloji öğrencilerine;

Her zaman beni destekleyen manevi güç kaynağım olan sevgilime;

Maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen aileme;

Teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma 75582 numaralı BAP-GAP projesi olarak Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü (BAP) tarafından desteklenmiştir.

İzmir, 25.08.2023

Ozan MERT

Özgeçmiş

Yüksek Lisans

Ege Üniversitesi– İzmir

Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 2020-2023.

Lisans

Ege Üniversitesi– İzmir

Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 2015 –2019

