



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**OSTOLÜN EREKTİL FONKSİYONDAKİ  
YARARLI ETKİLERİNDE  
H<sub>2</sub>S'İN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**Doktora Tezi**

Elif ALAN ALBAYRAK

Farmakoloji Anabilim Dalı

İzmir  
2024

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**OSTOLÜN EREKTİL FONKSİYONDAKİ  
YARARLI ETKİLERİNDE  
H<sub>2</sub>S'İN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Elif ALAN ALBAYRAK

Danışman  
Doç. Dr. Gülnur SEVİN

Farmakoloji Anabilim Dalı  
Doktora Programı

İzmir  
2024

## Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

**Başkan** : Doç. Dr. Gülnur SEVİN

**(Danışman)**

**Üye** : Prof. Dr. Şüra BAYKAN ÖZTÜRK

**Üye** : Prof. Dr. Yasemin ERAÇ

**Üye** : Prof. Dr. Şule KALKAN

**Üye** : Doç. Dr. Nil HOCAOĞLU AKSAY

**Üye** : Doç. Dr. Gönen ÖZŞARLAK SÖZER

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 25.01.2024

## Önsöz

Kardiyovasküler farmakolojinin büyüleyici dünyasına olan ilgim, lisans eğitimimin son yıllarında zirveye ulaştı. Bu tutku, beni farmakoloji laboratuvarının kapılarını aralamaya ve bu alandaki heyecan verici araştırmalara katılmaya yöneltti. Burada, kardiyovasküler hastalıkların en kritik göstergelerinden biri olarak kabul edilen erektil fonksiyon üzerine yapılan çalışmalarla karşılaştım. Özellikle, erektil disfonksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılan fosfodiesteraz tip-5 inhibitörlerinin, hastaların yaklaşık %40-50'sinde etkisiz kalması, bu alandaki yeni ilaç arayışının ne kadar önemli olduğunu gözler önüne sermekteydi. Laboratuvarında, son yıllarda dikkatleri üzerine çeken bir gazotransmitter olan hidrojen sülfür ( $H_2S$ ) üzerine yoğunlaşmıştı.  $H_2S$ 'nin, vücutta çeşitli sistemlerde yararlı etkiler gösterdiği ve endotelden bağımsız etki mekanizmaları olduğu biliniyordu. Bu durum,  $H_2S$  üretimini artırarak pek çok hastalığın tedavisinde yeni yollar açabileceğimiz umudunu yeşertmekteydi. Bu sebeple ilgi alanım giderek bu yöne kaydı. Bunun yanı sıra eğitimim sırasında, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı ile işbirliği içinde yürütülen bir TÜBİTAK projesinde bursiyer olarak görev almam, beni ülkemizde yetişen bitkilerden izole elde edilen ostol molekülü ile tanıştırdı. Bu molekül, çeşitli dokularda gösterdiği olumlu etkiler ve özellikle penil dokuda erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılan papaverinden daha etkili bir gevşeme sağlamasıyla dikkatimizi çekti. Laboratuvar çalışmalarımız, ostolün bu güçlü gevşetici etkisini doğruladı. Böylece tez çalışmam kapsamında, ostolün etkilerinde  $H_2S$ 'nin rolünü derinlemesine incelemeye karar verdik. Ege Üniversitesi'nde yaptığım bu çalışmaların yanı sıra, araştırma yolculuğumun bir diğer durağı olan Aarhus Üniversitesi'nde yürüttüğüm çalışmalar, ostolün potansiyel bir ilaç adayı olarak değerlendirilebileceğini kanıtlar nitelikteydi. Bu yolculuğun başlangıcında sadece bir öğrenci iken, şimdi bu alandaki yeniliklere katkıda bulunabilecek bir araştırmacı olarak kendimi geliştirdiğimi görmek, bu tezin önsözünü yazarken duyduğum gururun en büyük kaynağıdır.

İzmir, 21.12.2023

Elif ALAN ALBAYRAK

## Özet

### **Ostolün Eretil Fonksiyondaki Yararlı Etkilerinde H<sub>2</sub>S'in Rolünün Araştırılması**

Eretil fonksiyon, penil dokunun gevşemesiyle ereksiyonun gerçekleşmesini sağlayan nörovasküler bir süreçtir. Eretil disfonksiyon (ED) ise, cinsel performans için gerekli olan ereksiyona ulaşmada/sürdürmede bozukluk durumudur. 2025 yılında, 322 milyon ED hastası olacağı tahmin edilmektedir. Fosfodiesteraz enzimi (PDE), endotel/NO aracılığıyla üretilen cGMP'yi hidroliz ederek gevşemeyi sonlandırmaktadır. Bu nedenle, ED tedavisinde kullanılan PDE-5 inhibitörlerinin etkilerini gösterebilmeleri için endotelde/NO üretiminde bozukluk olmaması gerekmektedir. Ancak endotel disfonksiyonu kaynaklı vaskülojenik ED'nin, toplumda en sık rastlanan ED tipi olduğu ve PDE-5 inhibitörlerinin, genel hasta popülasyonunun %30-40'ında etkisiz olduğu bildirilmiştir. Bu durum özellikle vaskülojenik ED tedavisinde seçilecek ajanların, endotelden bağımsız etki göstermelerinin kritik önemini ortaya koymaktadır. Hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S), L-sisteinden, sistatyonin  $\gamma$ -liyaz (CSE), sistatyonin  $\beta$ -sentaz (CBS) ve 3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz (3-MST) enzimleri aracılığıyla üretilen bir gazotransmitterdir. H<sub>2</sub>S'nin endotelden bağımsız mekanizmalarla eretil fonksiyonu artırması dikkat çekmekte ve H<sub>2</sub>S'yi ED tedavisinde önemli bir hedef haline getirmektedir. Ostol, kardiyovasküler sistemde yararlı etkiler gösteren doğal bir kumarindir. Ostolün penil dokuyu, ED tedavisinde kullanılan papaverinden çok daha güçlü bir şekilde gevşettiği bildirilmiştir. Ostolün düz kas gevşetici etkilerini; kalsiyum kanal blokajı, fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI<sub>3</sub>K)/Akt/endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS)/NO yolağı aktivasyonu, çözünebilir guanilat siklaz (sGC) aktivasyonu ve PDE-5 inhibisyonu aracılığıyla gösterdiği rapor edilmiştir. Literatür taramalarımız, ostolün birçok farmakolojik etkisini, H<sub>2</sub>S ile ortak mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiğini ortaya çıkarmış ve tez kapsamında ilk kez ostolün eretil fonksiyondaki yararlı etkisinde H<sub>2</sub>S'nin rolünün araştırılması hedeflenmiştir.

Bu amaçla, tezin ilk bölümünde fare korpus kavernozumuyla (FKK), izole organ banyosu, gerçek-zamanlı H<sub>2</sub>S ölçümü, Western blot deneyleri; tezin diğer bölümde ise TÜBİTAK 2214-A kapsamında Aarhus Üniversitesi'nde sıçan pudendal arteriyle (SPA), H<sub>2</sub>S mikrosensörü takılı izole organ banyosu deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca ilk kez ostolün erektile fonksiyon üzerindeki etkisi, sıçanlara ostol uygulamasını (intravenöz) takiben intrakavernöz basınç (İKB)/ortalama arteriyel basınç (OAB) ölçülerek *in vivo* olarak araştırılmıştır.

Ostol, FKK'de gevşemeye neden olmuş, bu gevşemeler H<sub>2</sub>S sentez inhibitörü aminooksiasetik asit (AOAA) ile inhibe olmuştur. Ostol, SPA'yı gevşetirken eş zamanlı olarak arter lümeninde endojen H<sub>2</sub>S üretimini arttırmış; AOAA, ostole bağlı gevşemeleri ve H<sub>2</sub>S üretimini inhibe etmiştir. Ostol (20 µM), FKK'de, L-sistein, Na<sub>2</sub>S, asetilkolin ve sodyum nitroprusid gevşemelerini arttırmış, bu artışlar AOAA ile geri dönmüştür. SPA'da ise ostol, L-sistein ve Na<sub>2</sub>S gevşemelerini ve eş zamanlı olarak arter lümenindeki H<sub>2</sub>S düzeylerini arttırmıştır. FKK'de yapılan çalışmalar ile kısa süreli (30 dk.) ostol inkübasyonunun, L-sistein ile uyarılan H<sub>2</sub>S sentezini arttırdığı; daha uzun süreli inkübasyonunun ise (24 saat), CSE ve CBS enzim ekspresyonlarını arttırdığı ve bu artışın enzim aktivitesine yansıdığı saptanmıştır. FKK'de ostol gevşemeleri, L-NAME, ODQ ve glibenklamid ile; SPA'da ise L-NAME, iberitoksin ve linopirdin ile inhibe olmuştur.

Tüm bu sonuçlar, ostolün, FKK'de ve SPA'da endojen bazal ve L-sistein ile uyarılan H<sub>2</sub>S sentezini arttırarak gevşemeye neden olduğunu, ostolün NO aracılı gevşetici etkisine H<sub>2</sub>S'nin katkı sağladığını; sGC enziminin, K<sub>ATP</sub>, BK<sub>Ca</sub> ve KV<sub>7</sub> kanallarının ostol gevşemelerinde rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca ostolün, ilk kez İKB/OAB'ı arttırdığı ve spontan ereksiyona neden olduğu ön denemelerde gösterilmiştir. Ostolün özellikle endotel disfonksiyonunun eşlik ettiği ED ve NO/H<sub>2</sub>S biyoyararlanımının azaldığı hipertansiyon, diyabet gibi hastalıkların tedavisinde kullanıma potansiyeli ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca çalışmamızda ilk kez pudendal arterden ostol, L-sistein ve Na<sub>2</sub>S vasküler yanıtları alınmıştır.

Bu tez ile vasküler yanıtlar alınırken ilk defa eş zamanlı olarak arteriyel lümendeki endojen H<sub>2</sub>S oluşumunun ölçüldüğü, literatürde herhangi bir benzeri olmayan önemli bir bilimsel bulgu elde edilmiştir. Böylece mevcut literatüre; gazotransmitterlerin, damar fonksiyonu ile ilişkilerinin detaylı bir şekilde incelenmesine olanak sağlayacak yeni bir metodoloji kazandırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler;** Hidrojen sülfür, erektile fonksiyon, korpus kavernozum, pudendal arter

## **Abstract**

### **Investigation of the Role of H<sub>2</sub>S in the Beneficial Effects of Osthole on Erectile Function**

Erectile function is a neurovascular process that results in an erection through the relaxation of the penile tissue. Erectile dysfunction (ED) is the inability to achieve/maintain the erection required for sexual performance. It has been predicted that by the year 2025, there will be 322 million patients suffering from ED. Phosphodiesterase enzymes (PDE) terminate relaxation by hydrolyzing cGMP, which is produced via endothelium/nitric oxide (NO) mediation. Consequently, for PDE-5 inhibitors used in the treatment of ED to exert their therapeutic effects, there must be no disruption in endothelium/NO production. However, vasculogenic ED, primarily caused by endothelial dysfunction, is reported as the most common type of ED, with PDE-5 inhibitors being ineffective in 30-40% of patients with ED. This highlights the critical importance of selecting drugs that have effects independent of endothelial function for the treatment of vasculogenic ED. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) is a gasotransmitter produced by cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE), cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS), and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) enzymes from L-cysteine. The capacity of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) to augment erectile function via mechanisms that are independent of endothelium is noteworthy, establishing it as a prominent target in the treatment of ED. Osthole is a natural coumarin known with its beneficial effects on the cardiovascular system. Osthole has been reported to relax penile tissue more potently than papaverine, commonly used in ED treatment. The smooth muscle relaxant effects of osthole are reported to be mediated through mechanisms such as calcium channel blockade, activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI<sub>3</sub>K)/Akt/endothelial nitric oxide synthase (eNOS)/NO pathway, soluble guanylate cyclase (sGC) activation, and PDE-5 inhibition. In our literature reviews, it has been revealed that osthole shows its many pharmacological activities through common mechanisms with H<sub>2</sub>S, prompting this thesis to investigate, for the first time, the role of H<sub>2</sub>S in the beneficial effects of osthole on erectile function. In this context, in the first part of the thesis, the isolated organ bath, real-time H<sub>2</sub>S measurement, and Western blot experiments were performed with mouse corpus cavernosum (MCC). The second part, conducted at Aarhus University under the TUBITAK 2214-A

program, involved experiments with rat pudendal artery (RPA) in the H<sub>2</sub>S microsensor-attached isolated organ bath. Additionally, for the first time, the effect of osthole on erectile function was investigated *in vivo* by measuring intracavernosal pressure (ICP)/mean arterial pressure (MAP) following intravenous administration of osthole to rats. Osthole caused relaxation in the MCC, which was inhibited by the H<sub>2</sub>S synthesis inhibitor aminooxyacetic acid (AOAA). In the RPA, osthole not only relaxed the artery but also increased endogenous H<sub>2</sub>S production in the arterial lumen, with AOAA inhibiting both the relaxation and H<sub>2</sub>S production induced by osthole. In MCC, osthole (20  $\mu$ M) enhanced relaxations induced by L-cysteine, Na<sub>2</sub>S, acetylcholine, and sodium nitroprusside, with these increases in relaxations being reversed by AOAA. In the RPA, osthole increased L-cysteine and Na<sub>2</sub>S-induced relaxations and H<sub>2</sub>S levels in the arterial lumen. Short-term (30 min) incubation of MCC with osthole increased L-cysteine-stimulated H<sub>2</sub>S synthesis, while longer-term incubation (24 hours) increased the expression of CSE and CBS enzymes, and this increase was reflected in enzyme activities. L-NAME, ODQ, and glibenclamide inhibited osthole-induced relaxations in the MCC, while in the RPA, relaxations were inhibited by L-NAME, iberiotoxin, and linopirdine.

These results demonstrate that: i) Osthole causes relaxation by enhancing endogenous basal and L-cysteine-stimulated H<sub>2</sub>S synthesis in MCC and RPA, ii) H<sub>2</sub>S contributes to the NO-mediated relaxant effect of osthole, iii) sGC enzyme, K<sub>ATP</sub>, BKCa, and KV<sub>7</sub> channels play roles in the osthole-induced relaxations. Moreover, preliminary experiments have shown for the first time that osthole increases ICP/MAP and induces spontaneous erection. The potential of osthole in the treatment of ED, especially related to endothelial dysfunction and in conditions like hypertension and diabetes where NO/H<sub>2</sub>S bioavailability is reduced, is highlighted. Additionally, vascular responses to osthole, L-cysteine, and Na<sub>2</sub>S in the RPA have been obtained for the first time in our study. This thesis marks a significant scientific achievement, unprecedented in the literature, by simultaneously measuring the formation of endogenous H<sub>2</sub>S in the arterial lumen while monitoring the vascular responses. Consequently, this research presents to the existing body of literature a new methodology that could facilitate a detailed examination of the relationships between gasotransmitters and vascular function.

**Keywords;** Hydrogen sulfide, erectile function, corpus cavernosum, pudendal artery

## İçindekiler

|                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Önsöz .....                                                                       | II  |
| Özet.....                                                                         | III |
| Abstract.....                                                                     | V   |
| İçindekiler .....                                                                 | VII |
| Tablolar Dizini.....                                                              | X   |
| Şekiller Dizini .....                                                             | XII |
| Kısaltma Listesi .....                                                            | XVI |
| 1. Giriş .....                                                                    | 1   |
| 1.1. Araştırmanın problemi.....                                                   | 1   |
| 1.2. Araştırmanın sorusu .....                                                    | 2   |
| 1.3. Araştırmanın hipotezleri .....                                               | 2   |
| 1.4. Araştırmanın varsayımları.....                                               | 3   |
| 1.5. Araştırmanın sınırlılıkları .....                                            | 3   |
| 1.6. Araştırmanın amacı .....                                                     | 4   |
| 2. Genel Bilgiler .....                                                           | 5   |
| 2.1. Penis anatomisi.....                                                         | 5   |
| 2.2. Erektile fonksiyon fizyolojisi.....                                          | 8   |
| 2.3. Erektile disfonksiyon (ED).....                                              | 10  |
| 2.4. ED tedavisi ve PDE-5 inhibitörleri .....                                     | 13  |
| 2.5. Hidrojen sülfür (H <sub>2</sub> S).....                                      | 14  |
| 2.6. Ostol.....                                                                   | 16  |
| 2.7. Ostolün etki mekanizmaları ve H <sub>2</sub> S ile ilişkisi.....             | 17  |
| 3. Gereç ve Yöntem .....                                                          | 21  |
| 3.1. Gereç.....                                                                   | 21  |
| 3.1.1. Cihazlar .....                                                             | 21  |
| 3.1.2. Kimyasallar.....                                                           | 22  |
| 3.1.3. Antikorlar .....                                                           | 24  |
| 3.1.4. Çözeltiler .....                                                           | 24  |
| 3.1.4.1. Fare korpus kavernoza (FKK) ile çalışılırken kullanılan çözeltiler ..... | 24  |
| 3.1.4.2. Sıçan pudental arteri (SPA) ile çalışılırken kullanılan çözeltiler.....  | 29  |
| 3.2. Yöntem .....                                                                 | 31  |
| 3.2.1. Fare korpus kavernoza (FKK) ile yapılan deneyler .....                     | 31  |

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1.1. Doku izolasyonu .....                                                                                            | 31 |
| 3.2.1.2. İzole organ banyosu deneyleri .....                                                                              | 32 |
| 3.2.1.3. Doku kültürü .....                                                                                               | 36 |
| 3.2.1.4. Homojenizasyon .....                                                                                             | 37 |
| 3.2.1.5. Protein miktar tayini.....                                                                                       | 38 |
| 3.2.1.6. Western blot deneyleri.....                                                                                      | 39 |
| 3.2.1.7. Gerçek-zamanlı H <sub>2</sub> S üretiminin ölçülmesi.....                                                        | 42 |
| 3.2.2. Sıçan pudental arteriyle (SPA) yapılan deneyler .....                                                              | 43 |
| 3.2.2.1. Deney hayvanları ve pudental arter izolasyonu .....                                                              | 44 |
| 3.2.2.2. H <sub>2</sub> S mikrosensörlerinin kalibrasyonu .....                                                           | 45 |
| 3.2.2.3. İzole organ banyosu ve H <sub>2</sub> S mikrosensör deneyleri.....                                               | 47 |
| 3.2.3. <i>In vivo</i> intrakavernözal basınç (İKB) ve ortalama arteriyel kan basıncı (OAB) ölçümü.....                    | 51 |
| 3.2.4. İstatistiksel analiz.....                                                                                          | 53 |
| 4. Bulgular.....                                                                                                          | 54 |
| 4.1. Fare korpus kavernozumu (FKK) ile yapılan deneylerin sonuçları .....                                                 | 54 |
| 4.1.1. İzole organ banyosu deneyleri .....                                                                                | 54 |
| 4.1.1.1. Ostolün gevşetici etkisinde H <sub>2</sub> S ve NO sentezinin rolü.....                                          | 54 |
| 4.1.1.2. Ostolün gevşetici etkisinde H <sub>2</sub> S alt mekanizmalarının rolü.....                                      | 57 |
| 4.1.1.3. Ostolün NO ile ilişkili gevşetici etkisinde H <sub>2</sub> S'nin rolü .....                                      | 61 |
| 4.1.2. Gerçek-zamanlı H <sub>2</sub> S üretiminin ölçülmesi .....                                                         | 64 |
| 4.1.3. Western blot deneyleri .....                                                                                       | 67 |
| 4.1.4. Doku kültürü yapılan FKK'den elde edilen homojenatlarda gerçek-zamanlı H <sub>2</sub> S üretiminin ölçülmesi ..... | 68 |
| 4.2. Sıçan pudental arteri (SPA) ile yapılan deneylerin sonuçları.....                                                    | 70 |
| 4.2.1. Ostolün gevşetici etkisinde H <sub>2</sub> S'nin rolünün araştırılması .....                                       | 70 |
| 4.2.2. L-sistein yanıtlarının ve H <sub>2</sub> S seviyelerinin değerlendirilmesi .....                                   | 78 |
| 4.2.3. Na <sub>2</sub> S yanıtlarının ve H <sub>2</sub> S seviyelerinin değerlendirilmesi .....                           | 81 |
| 4.2.4. Ostolün SPA'daki gevşetici etki mekanizmasını aydınlatmak amacıyla yapılan deneyler .....                          | 85 |
| 4.2.4.1. Ostol gevşemesinde CSE enzimi ile ilişkili H <sub>2</sub> S sentezinin rolü .....                                | 85 |
| 4.2.4.2. Ostol tarafından indüklenen gevşemelerde NO sentezinin rolü .....                                                | 87 |
| 4.2.4.3. Potasyum kanallarının ostol gevşemelerindeki rolü .....                                                          | 88 |

|                                                                          |            |
|--------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.3. <i>İn vivo</i> İKB ve OAB ölçümü deneylerinin sonuçları.....</b> | <b>92</b>  |
| <b>Tartışma .....</b>                                                    | <b>94</b>  |
| <b>Sonuç ve Öneriler .....</b>                                           | <b>111</b> |
| <b>Kaynaklar .....</b>                                                   | <b>112</b> |
| <b>Teşekkür .....</b>                                                    | <b>131</b> |
| <b>Özgeçmiş .....</b>                                                    | <b>133</b> |



## Tablolar Dizini

|                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. Ostolün düz kas gevşetici ve kasılmayı inhibe edici konsantrasyonları ve etki mekanizmaları .....                                                                                                                                                 | 18 |
| Tablo 2. Ostolün ve H <sub>2</sub> S'nin ortak etki mekanizmaları .....                                                                                                                                                                                    | 19 |
| Tablo 3. Kullanılan cihazlar ve sistemler .....                                                                                                                                                                                                            | 21 |
| Tablo 4. Kullanılan kimyasallar .....                                                                                                                                                                                                                      | 22 |
| Tablo 5. Konsantre Krebs çözeltisi .....                                                                                                                                                                                                                   | 24 |
| Tablo 6. Normal Krebs çözeltisi .....                                                                                                                                                                                                                      | 25 |
| Tablo 7. SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler .....                                                                                                                                                                                          | 26 |
| Tablo 8. Western blot deneylerinde kullanılan tampon çözeltiler .....                                                                                                                                                                                      | 27 |
| Tablo 9. Primer ve sekonder antikor çözeltileri .....                                                                                                                                                                                                      | 28 |
| Tablo 10. PBS çözeltisi .....                                                                                                                                                                                                                              | 28 |
| Tablo 11. Western blot deneyleri için homojenizasyon çözeltisi .....                                                                                                                                                                                       | 29 |
| Tablo 12. 10X PSS çözeltisi .....                                                                                                                                                                                                                          | 30 |
| Tablo 13. 10X KPSS çözeltisi .....                                                                                                                                                                                                                         | 30 |
| Tablo 14. Ostol ve çözücü dilüsyon serisinin hazırlanması .....                                                                                                                                                                                            | 33 |
| Tablo 15. Çözücünün ve ostolün, FKK'de AOAA ve/veya L-NAME varlığında/yokluğunda oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin E <sub>maks</sub> ve pD <sub>2</sub> değerleri .....                                                                              | 55 |
| Tablo 16. L-sisteinin, FKK'de çözücü, ostol ve/veya AOAA varlığında oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin E <sub>maks</sub> ve pD <sub>2</sub> değerleri. ....                                                                                           | 57 |
| Tablo 17. Na <sub>2</sub> S'in, FKK'de çözücü, ostol ve inhibitörler varlığında oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin E <sub>maks</sub> ve pD <sub>2</sub> değerleri .....                                                                               | 59 |
| Tablo 18. Ostolün, FKK'de glibenklamid ve ODQ varlığında/yokluğunda oluşturduğu gevşemelere ilişkin E <sub>maks</sub> ve pD <sub>2</sub> değerleri .....                                                                                                   | 61 |
| Tablo 19. ACh'in, FKK'de çözücü, ostol ve AOAA varlığında oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin E <sub>maks</sub> ve pD <sub>2</sub> değerleri. ....                                                                                                     | 62 |
| Tablo 20. SNP'nin, FKK'de çözücü, ostol ve AOAA varlığında oluşturduğu gevşemelere ilişkin E <sub>maks</sub> ve pD <sub>2</sub> değerleri. ....                                                                                                            | 64 |
| Tablo 21. PBS (homojenatsız), bazal ve L-sistein ile uyarılmış ortamlarda; çözücünün ve ostolün, AOAA varlığında/yokluğunda maksimum H <sub>2</sub> S düzeyleri (E <sub>maks</sub> ) ve reaksiyon hızı (eğim) üzerindeki etkilerine ilişkin değerler ..... | 66 |

|                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 22. PBS (homojenatsız), bazal ve L-sistein ile uyarılmış ortamlarda; çözücünün ve ostolün, AOAA varlığında/yokluğunda maksimum H <sub>2</sub> S düzeyleri (E <sub>maks</sub> ) ve reaksiyon hızı (eğim) üzerindeki etkilerine ilişkin değerler. .... | 70 |
| Tablo 23. Çözücünün/ostolün, SPA'da AOAA varlığında/yokluğunda oluşturduğu gevşemelere ilişkin E <sub>maks</sub> ve pD <sub>2</sub> değerleri .....                                                                                                        | 72 |
| Tablo 24. Çözücünün/ostolün, AOAA varlığında/yokluğunda SPA'da oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin E <sub>maks</sub> ve pD <sub>2</sub> değerleri ile arter lümeninde ölçülen maksimum H <sub>2</sub> S değerleri .....                                | 75 |
| Tablo 25. L-sisteinin, SPA'da çözücü ve ostol varlığında oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin E <sub>maks</sub> ve pD <sub>2</sub> değerleri ile arter lümenindeki maksimum H <sub>2</sub> S değerleri.....                                             | 80 |
| Tablo 26. Na <sub>2</sub> S'nin, çözücü ve ostol varlığında SPA'da oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin E <sub>maks</sub> ve pD <sub>2</sub> değerleri ile arter lümenindeki maksimum H <sub>2</sub> S değerleri.....                                   | 84 |
| Tablo 27. Ostolün, SPA'da çeşitli inhibitörler varlığında/yokluğunda oluşturduğu gevşemelere ilişkin E <sub>maks</sub> ve pD <sub>2</sub> değerleri. ....                                                                                                  | 92 |

## Şekiller Dizini

|                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Penis anatomisi .....                                                                                                                                                                                      | 8  |
| Şekil 2. Erektıl fonksiyonda rol alan farmakolojik yollar .....                                                                                                                                                     | 10 |
| Şekil 3. H <sub>2</sub> S'nin gevşetici etki mekanizması .....                                                                                                                                                      | 15 |
| Şekil 4. Ostol .....                                                                                                                                                                                                | 16 |
| Şekil 5. Fareden penil doku izolasyonu (A), penil dokunun (B) ve korpus kavernozumun (C) görüntüsü .....                                                                                                            | 31 |
| Şekil 6. Dört banyolu şerit miyografin (A) ve banyoya asılan FKK'nin (B) görüntüsü .....                                                                                                                            | 32 |
| Şekil 7. CO <sub>2</sub> inkübatörü .....                                                                                                                                                                           | 36 |
| Şekil 8. Kriyojenik öğütme yapan CryoMill cihazı .....                                                                                                                                                              | 37 |
| Şekil 9. Soğutmalı santrifüj cihazı .....                                                                                                                                                                           | 38 |
| Şekil 10. Örnek BCA standart eğri grafiği .....                                                                                                                                                                     | 39 |
| Şekil 11. Multi-plaka okuyucu .....                                                                                                                                                                                 | 39 |
| Şekil 12. Jel hazırlanması .....                                                                                                                                                                                    | 40 |
| Şekil 13. Transfer sandviçi hazırlanması .....                                                                                                                                                                      | 40 |
| Şekil 14. Li-COR IR görüntüleme cihazı .....                                                                                                                                                                        | 41 |
| Şekil 15. H <sub>2</sub> S mikrosensör sistemi .....                                                                                                                                                                | 43 |
| Şekil 16. Amplifikatör (Multimeter, Unisense) ve H <sub>2</sub> S mikrosensörü .....                                                                                                                                | 43 |
| Şekil 17. Erkek sıçanın sol kalçasında bulunan pudendal arterin izole edilmeden önceki (A) ve izole edildikten sonraki (B) görüntüleri (mikroskop altında) .....                                                    | 44 |
| Şekil 18. Faraday kafesi, kafesin içerisindeki H <sub>2</sub> S mikrosensörü takılı izole organ banyosu sistemi ve mikroskop .....                                                                                  | 45 |
| Şekil 19. Farklı pH değerlerindeki sülfür türlerinin oranı .....                                                                                                                                                    | 46 |
| Şekil 20. H <sub>2</sub> S mikrosensörlerin kalibrasyonu .....                                                                                                                                                      | 47 |
| Şekil 21. SPA lümenine yerleştirilen H <sub>2</sub> S mikrosensörünün uzaktan (A) ve mikroskop altındaki (B) görüntüleri .....                                                                                      | 49 |
| Şekil 22. Miyografa yerleştirilen iki adet H <sub>2</sub> S mikrosensörünün görüntüsü .....                                                                                                                         | 49 |
| Şekil 23. <i>İn vivo</i> OAB ve İKB ölçümü düzeneği .....                                                                                                                                                           | 52 |
| Şekil 24. İnfüzyon pompası .....                                                                                                                                                                                    | 53 |
| Şekil 25. Çözücünün ve ostolün, FKK'de AOAA ve/veya L-NAME varlığında/yokluğunda, oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşemelerin (A), E <sub>maks</sub> 'ın (B) ve pD <sub>2</sub> değerlerinin (C) grafikleri ..... | 55 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 26. L-sisteinin, FKK'de çözücü, ostol ve/veya AOAA varlığında oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), $E_{maks}$ 'ın (B) ve $pD_2$ değerlerinin grafikleri.....                                                                                            | 56 |
| Şekil 27. $Na_2S$ 'nin, FKK'de çözücü, ostol ve ostol+AOAA varlığında oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), $E_{maks}$ 'ın (B) ve $pD_2$ değerlerinin grafikleri.....                                                                                          | 58 |
| Şekil 28. $Na_2S$ 'in, FKK'de glibenklamid ve ODQ varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), $E_{maks}$ 'ın (B) ve $pD_2$ değerlerinin grafikleri.....                                                                                        | 59 |
| Şekil 29. Ostolün, FKK'de glibenklamid ve ODQ varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), $E_{maks}$ 'ın (B) ve $pD_2$ değerlerinin grafikleri.....                                                                                            | 60 |
| Şekil 30. ACh'nin, FKK'de çözücü, ostol ve AOAA varlığında oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), $E_{maks}$ 'ın (B) ve $pD_2$ değerlerinin grafikleri.....                                                                                                     | 62 |
| Şekil 31. SNP'nin, FKK'de çözücü, ostol, AOAA varlığında oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), $E_{maks}$ 'ın (B) ve $pD_2$ değerlerinin grafikleri.....                                                                                                       | 63 |
| Şekil 32. PBS içerisinde (homojenatsız ortamda) çözücünün ve ostolün maksimum $H_2S$ düzeylerine etkileri. ....                                                                                                                                                                     | 64 |
| Şekil 33. FKK homojenatlarında, çözücünün ve ostolün, AOAA varlığında/yokluğunda, L-sistein ile indüklenen zamana bağlı $H_2S$ üretimi (A), bazal/uyarılmış koşullarda maksimum $H_2S$ düzeyleri (B) ve $H_2S$ üretim hızı (eğim) (C) üzerindeki etkilerini gösteren grafikler..... | 65 |
| Şekil 34. FKK'de çözücünün/ostolün CSE enzim ekspresyonu üzerindeki etkisi.....                                                                                                                                                                                                     | 67 |
| Şekil 35. FKK'de çözücünün/ostolün CBS enzim ekspresyonu üzerindeki etkisi ....                                                                                                                                                                                                     | 67 |
| Şekil 36. Çözücü/ostol uygulanmış ve kontrol FKK dokularına ait GAPDH, CSE ve CBS proteinlerinin temsili bant görüntüleri.....                                                                                                                                                      | 68 |
| Şekil 37. FKK'de, çözücünün ve ostolün, AOAA varlığında/yokluğunda, L-sistein ile uyarılmış zamana bağlı $H_2S$ üretimi (A), bazal/uyarılmış koşullarda maksimum $H_2S$ düzeyleri (B) ve $H_2S$ üretim hızı (eğim) (C) üzerindeki etkilerini gösteren grafikler. ....               | 69 |
| Şekil 38. Ostolün, FKK ve SPA üzerindeki gevşetici etkilerinin karşılaştırılması.....                                                                                                                                                                                               | 71 |

|                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 39. Çözücü ve ostolün, SPA'da AOAA (2 mM, 10 mM) varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşemelerin (A), $E_{maks}$ (B) ve $pD_2$ değerlerinin (C) grafikleri.....                                                | 72 |
| Şekil 40. Tel çapının SPA'da ostol tarafından indüklenen gevşemeler üzerindeki etkisi. ....                                                                                                                                              | 73 |
| Şekil 41. Çözücü ve ostolün, SPA'da AOAA varlığında/ yokluğunda oluşturduğu vasküler yanıtları (A) ve arter lümenindeki $H_2S$ seviyelerini (B) gösteren grafikler                                                                       | 74 |
| Şekil 42. SPA'da çözücü/ostol tarafından, AOAA varlığında/ yokluğunda indüklenen maksimum gevşeme yanıtlarının (A), $pD_2$ değerlerinin (B) ve arter lümenindeki maksimum $H_2S$ seviyelerinin (C) grafikleri.....                       | 75 |
| Şekil 43. Fen ile kastırılmış SPA'da, çözücüye (A), ostole (B) ve AOAA varlığında ostole (C) verilen yanıtların gösterildiği orijinal traseler .....                                                                                     | 76 |
| Şekil 44. Arter olmayan PSS içerisinde, çözücü varlığında $Na_2S$ 'in artan konsantrasyonlarına karşılık $H_2S$ mikrosensör sinyalinin gözlenmesi .....                                                                                  | 77 |
| Şekil 45. PSS'de (arter olmayan) çözücü ve ostolün $H_2S$ mikrosensör sinyalleri üzerindeki etkileri.....                                                                                                                                | 78 |
| Şekil 46. Fen ile kastırılmış SPA'da, L-sisteine bağlı vasküler yanıtları gösteren orijinal trase.....                                                                                                                                   | 79 |
| Şekil 47. SPA'da, çözücü ve ostol varlığında L-sistein tarafından indüklenen konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarını (A) ve arter lümenindeki $H_2S$ düzeylerini (B) gösteren grafikler .....                                           | 79 |
| Şekil 48. SPA'da, çözücü ve ostol varlığında, L-sistein tarafından indüklenen maksimum gevşemelerin (A), $pD_2$ değerlerinin (B) ve maksimum $H_2S$ seviyelerinin (C) grafikleri.....                                                    | 80 |
| Şekil 49. Fen ile kastırılmış SPA'da, çözücü (A) ve ostol (B) varlığında L-sistein tarafından indüklenen yanıtları gösteren orijinal traseler.....                                                                                       | 81 |
| Şekil 50. Fen ile kastırılmış SPA'da, iki farklı konsantrasyon aralığında $Na_2S$ tarafından indüklenen vasküler yanıtları gösteren orijinal traseler: $10^{-6}$ - $3 \times 10^{-2}$ M (A) ve $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-3}$ M (B)..... | 82 |
| Şekil 51. SPA'da, çözücü ve ostol varlığında, $Na_2S$ tarafından indüklenen konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarını (A) ve arter lümenindeki $H_2S$ düzeylerini (B) gösteren grafikler .....                                            | 83 |

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 52. SPA’da, çözücü/ostol varlığında, Na <sub>2</sub> S’ye bağlı maksimum gevşemeleri (A), pD <sub>2</sub> değerlerini (B) ve maksimum H <sub>2</sub> S seviyelerini (C) gösteren grafikler .....       | 84 |
| Şekil 53. Fen ile kastırılmış SPA’da, çözücü (A) ve ostol (B) varlığında, Na <sub>2</sub> S tarafından indüklenen yanıtları gösteren orijinal traseler.....                                                  | 85 |
| Şekil 54. Ostolün, SPA’da PAG varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E <sub>maks</sub> (B) ve pD <sub>2</sub> değerlerinin grafikleri .....                        | 86 |
| Şekil 55. Ostolün, SPA’da AOAA+PAG varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E <sub>maks</sub> (B) ve pD <sub>2</sub> değerlerinin grafikleri.....                    | 87 |
| Şekil 56. Ostolün, SPA’da L-NAME varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E <sub>maks</sub> (B) ve pD <sub>2</sub> değerlerinin grafikleri.....                      | 88 |
| Şekil 57. Ostolün, fen, 60 mM KPSS ve 125 mM KPSS ile kastırılmış SPA’larda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E <sub>maks</sub> (B) ve pD <sub>2</sub> değerlerinin grafikleri..... | 89 |
| Şekil 58. Ostolün, SPA’da iberitoksin varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E <sub>maks</sub> (B) ve pD <sub>2</sub> değerlerinin grafikleri.....                 | 90 |
| Şekil 59. Ostolün, SPA’da linopirdin varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E <sub>maks</sub> (B) ve pD <sub>2</sub> değerlerinin grafikleri.....                  | 91 |
| Şekil 60. 1 mg/kg ostolün, spontan olarak İKB/OAB’yi (erektıl fonksiyonu) arttırdığını gösteren orijinal traseler.....                                                                                       | 93 |
| Şekil 61. 3 mg/kg ostolün spontan ereksiyona neden olduğunu gösteren orijinal traseler .....                                                                                                                 | 93 |

## Kısaltma Listesi

|                  |                                                                                            |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3-MST            | : 3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz                                                       |
| 4-AP             | : 4-Aminopiridin                                                                           |
| ACE              | : Anjiyotensin dönüştürücü enzim, angiotensine converting enzyme                           |
| ACh              | : Asetilkolin                                                                              |
| ANOVA            | : Varyans analizi                                                                          |
| AOAA             | : Aminooksiasetik asit                                                                     |
| ATP              | : Adenozin trifosfat                                                                       |
| BCA              | : Bikinkoninik asit                                                                        |
| BKCa             | : Büyük iletkenlik $Ca^{+2}$ ile aktifleştirilmiş, large-conductance, $Ca^{2+}$ -activated |
| BSA              | : Sığır serum albumini, bovine serum albumin                                               |
| BSLA             | : $\beta$ -siyano-L-alanin                                                                 |
| cAMP             | : Siklik adenozin monofosfat                                                               |
| CBS              | : Sistatyonin $\beta$ -sentaz                                                              |
| cGMP             | : Siklik guanozin monofosfat                                                               |
| COX-2            | : Siklooksijenaz-2                                                                         |
| CSE              | : Sistatyonin $\gamma$ -liyaz                                                              |
| EC <sub>50</sub> | : Etkin konsantrasyon 50                                                                   |
| ED               | : Erektile disfonksiyon                                                                    |

|                   |                                                                      |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------|
| EGTA              | : Etilen Glikol-bis ( $\beta$ -aminoeter) N,N,N',N' Tetraasetik Asit |
| E <sub>maks</sub> | : Maksimum etki                                                      |
| eNOS              | : Endotelyal nitrik oksit sentaz                                     |
| Fen               | : Fenilefrin                                                         |
| FKK               | : Fare korpus kavernozaumu                                           |
| GAPDH             | : Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz                                |
| H <sub>2</sub> S  | : Hidrojen sülfür                                                    |
| IR                | : İnfared                                                            |
| İKB               | : İtrakavernz basınç                                                |
| İKK               | : İnsan korpus kavernozaumu                                          |
| iNOS              | : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz                                 |
| İPA               | : İnsan penil arteri                                                 |
| K <sub>ATP</sub>  | : ATP duyarlı potasyum kanalları                                     |
| KPSS              | : Yüksek potasyum çözeltisi                                          |
| K <sub>v</sub>    | : Voltaj kapılı potasyum kanalları                                   |
| L-NA              | : L $\omega$ -Nitroarjinin                                           |
| L-NAME            | : L-nitro-arjinin metil ester                                        |
| MLCK              | : Miyozin hafif zincir kinaz, Myosin light-chain kinase              |
| NA                | : Noradrenalin                                                       |
| Na <sub>2</sub> S | : Sodyum slfıt                                                      |
| NOS               | : Nitrik oksit sentaz                                                |

|                   |                                                             |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|
| nNOS              | : Nöronal nitrik oksit sentaz                               |
| NO                | : Nitrik oksit                                              |
| OAB               | : Ortalama arteriyel basınç                                 |
| ODQ               | : 1H-[1,2,4]okzadiazolo-[4, 3-a]kinokzalin-1-on             |
| PAG               | : DL-propargilglisin                                        |
| PAH               | : Pulmoner arter hipertansiyonu                             |
| PBS               | : Fosfat tamponu salin, phosphate buffered saline           |
| PDE               | : Fosfodiesteraz                                            |
| PDE-5             | : Fosfodiesteraz tip-5                                      |
| PI <sub>3</sub> K | : Fosfatidilinozitol 3-kinaz                                |
| PKA               | : Protein kinaz A                                           |
| PKG               | : Protein kinaz G                                           |
| PSS               | : Fizyolojik salin solüsyonu, physiological saline solution |
| PVDF              | : Poliviniliden diflorür                                    |
| SDS-PAGE          | : Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi     |
| SEM               | : Ortalamanın standart hatası, Standard error of the mean   |
| sGC               | : Çözünebilir guanilat siklaz, soluble guanylate cyclase    |
| SNP               | : Sodyum nitroprusid                                        |
| SPA               | : Sıçan pudendal arteri                                     |
| TEA               | : Tetraetilamonyum                                          |
| TKK               | : Tavşan korpus kavernozumu                                 |

## 1. Giriş

### 1.1. Araştırmanın problemi

Halk arasında ‘iktidarsızlık’ olarak bilinen erektil disfonksiyon (ED), 40-70 yaş arasındaki erkeklerin yaklaşık %52'sinde görülen ve psikososyal sonuçlarıyla aileleri olumsuz yönde etkileyen önemli bir cinsel işlev bozukluğudur. Oral fosfodiesteraz tip-5 (PDE-5) enzim inhibitörleri (sildenafil, tadalafil vb.), ilk piyasaya sürüldükleri yıllarda ED tedavisi için önemli bir gelişme olarak kabul edilmiş ve bu alandaki tedavi seçeneklerinin başında yer almışlardır. Bu ilaçların etkili olabilmesi için, endotel hücrelerde ve nitrik oksit (NO) üretiminde bozukluk olmaması gerekmektedir. Fakat, ED'ye neden olan başlıca faktörler arasında, hipertansiyon, diyabet ve hiperlipidemiye bağlı gelişen endotel disfonksiyonu yer almakta ve vaskülojenik ED, en sık görülen ED türü olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sebeple, PDE-5 inhibitörlerinin, genel ED hasta popülasyonunun %30-40'ında, diyabetli ED hastalarının ise %50'sinde etkili olmadığı görülmüştür. İntrakavernözal papaverin ve prostaglandin E1 enjeksiyonu, vakum ereksiyon cihazı, penil protez implantasyonu gibi diğer tedavi yöntemleri ise uygulama zorluğu, maliyet ve ciddi yan etki potansiyelleri nedeniyle daha az tercih edilmektedir. Bu durum, etkinliği endotel fonksiyona ve NO üretimine bağlı olmayan yeni ilaç adaylarının araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Yeni ilaç adaylarının, mevcut tedavi seçeneklerine kıyasla farklı farmakolojik yolları hedef alması ve ED'nin çeşitli nedenlerine karşı geniş bir etki spektrumu sunması beklenmektedir. Bu yaklaşımla, daha fazla hasta grubuna etkili çözümler sunulabilecek ve ED tedavisinde önemli bir ilerleme sağlanabilecektir. Son yıllarda, erektil/penil dokunun gevşemesini sağlayarak erektil fonksiyonu artıran ve bu etkiyi endotelden/NO üretiminden bağımsız mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiren bir gazotransmitter olan hidrojen sülfür ( $H_2S$ ), bilimsel araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Ostol, çok hedefli bir ilaç adayı olarak değerlendirilebilecek çeşitli farmakolojik etkilere sahip doğal bir kumarindir. Literatür taramalarımız ile, ostolün çeşitli farmakolojik etkilerini  $H_2S$  ile ortak mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca ostolün penil dokuyu, ED tedavisinde kullanılan papaverinden daha güçlü bir şekilde gevşetmesi dikkat çekmektedir. Elde edilen bu bilgiler, ostolün erektil fonksiyon üzerindeki potansiyel etkilerini daha detaylı incelemek için bilimsel dayanak oluşturmaktadır.

Ostolün ve H<sub>2</sub>S'nin birçok ortak etki mekanizması olmasına rağmen, literatürde ostol-H<sub>2</sub>S ilişkisi daha önce hiç araştırılmamıştır. Bu kapsamda, ostolün H<sub>2</sub>S ile ilişkili mekanizmalar aracılığıyla erektil fonksiyonu artırma potansiyelini araştırmak, tez çalışmasının temelini oluşturmaktadır. Bu araştırma, ED tedavisinde kullanılabilecek yeni ve umut vadeden bir molekülün keşfini hedeflemektedir. Ostolün, H<sub>2</sub>S aracılığıyla erektil dokuyu gevşetici etki mekanizmasını moleküler düzeyde araştırmak, bu alanda ilerlemeye katkıda bulunacak ve ED tedavisinde yeni tedavi seçenekleri sunabilecek önemli bir adım olarak değerlendirilmektedir.

### 1.2. Araştırmanın sorusu

Araştırma kapsamında, izole organ banyosu, gerçek-zamanlı H<sub>2</sub>S ölçümü (H<sub>2</sub>S mikrosensör), Western blot ve H<sub>2</sub>S mikrosensörü takılı izole organ banyosunda yapılan deneyler ve *in vivo* intrakavernöz basınç ölçümü (ön deneme) ile aşağıdaki sorulara yanıt aranmıştır:

1. Ostolün erektil fonksiyon üzerinde yararlı etkileri var mıdır?
2. Ostolün erektil fonksiyonu artırıcı etkilerinde H<sub>2</sub>S'nin rolü var mıdır?
3. Ostolün, literatürde NO aracılı olduğu gösterilen gevşetici etkilerinde H<sub>2</sub>S'nin rolü var mıdır?
4. Ostolün endojen H<sub>2</sub>S üretimi üzerindeki etkisi, damar lümenine yerleştirilen bir H<sub>2</sub>S mikrosensörü ile vasküler yanıtlarla eş zamanlı olarak ölçülebilir mi?
5. Ostolün gevşetici etkisinde hangi alt mekanizmalar rol oynamaktadır?

### 1.3. Araştırmanın hipotezleri

- Ostol, erektil fonksiyonu H<sub>2</sub>S sentezi aracılığıyla endotelden bağımsız olarak artırır.
- Ostol, erektil dokuda H<sub>2</sub>S sentezinden sorumlu CSE ve CBS enzimlerinin aktivitesini artırır.
- Ostol, erektil dokuda H<sub>2</sub>S sentezinden sorumlu CSE ve CBS enzimlerinin ekspresyonunu artırır.
- Ostol, erektil dokuda NO'nun ve H<sub>2</sub>S'nin ortak alt mekanizmaları üzerinden etki gösterir.
- Ostolün, literatürde NO aracılı olduğu bildirilen gevşetici etkilerinde, H<sub>2</sub>S sentezini artırması rol oynar.
- Ostol, gevşemeye neden olurken eş zamanlı olarak arter lümenindeki H<sub>2</sub>S düzeylerini artırır.

-*In vivo* ostol uygulaması İKB/OAB oranını, dolayısıyla erektil fonksiyonu arttırır.

#### 1.4. Araştırmanın varsayımları

Bu çalışmada ostolün penil dokudaki yararlı etkilerine H<sub>2</sub>S'nin aracılık ettiği gösterilirse, özellikle endotel disfonksiyonu ile seyreden vaskülojenik ED tedavisinde kullanılma potansiyeli ortaya çıkarılacaktır. Ayrıca bu çalışma; ostolün, H<sub>2</sub>S aracılı tedavi edici etki potansiyelinin miyokart infarktüsü, diyabet, enflamasyon ve Alzheimer gibi NO biyoyararlanımının bozulduğu diğer hastalıklarda da araştırılması ve H<sub>2</sub>S'yi hedef alan ostol türevi yeni moleküllerin geliştirilmesi için yol gösterici olacaktır.

#### 1.5. Araştırmanın sınırlılıkları

Fare korpus kavernozumunun (FKK), tunica albuginea içeren sert bir doku olması nedeniyle zor homojenize olması ve düşük miktarda protein elde edilmesi; Western blot deneylerinde hedeflenen protein miktarını elde etmek için jele yüklenmesi gereken hacimin artmasına neden olmuştur. Bir jele yüklenebilecek örnek sayısı (kuyucuk sayısı) sınırlı olduğundan optimizasyon çalışmaları ve deneylerin tamamlanması beklenenden uzun zaman almıştır.

Pudental arter, H<sub>2</sub>S mikrosensörü takılı izole organ banyosu sistemine asıldıktan ve mikrosensör arter lümenine yerleştirildikten sonra, arterin bazal gerilime dönmesi ve H<sub>2</sub>S mikrosensör sinyalinin stabil hale gelmesi uzun zaman almıştır. Ayrıca, ostol, L-sistein veya Na<sub>2</sub>S yanıtları alındıktan sonra, yeni yanıtlar alınmadan önce en az 2-3 saatlik geniş yıkama periyotlarına ihtiyaç duyulmuş, hatta çoğu zaman arter segmentinin tamamen değiştirilmesi gerekmiştir. Bu durum, deneysel yöntemde karşılaşılan teknik zorlukları, özellikle prosedürlerin uzun zaman almasını ve verimli veri toplamanın etkinliğini önemli ölçüde yavaşlatabilecek, tekrar tekrar yeni arter segmentlerinin hazırlanmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

H<sub>2</sub>S mikrosensörü takılı izole organ banyosu sistemindeki deneyler planlanırken hem pudental arter lümeni içerisine hem de organ banyosuna iki farklı H<sub>2</sub>S mikrosensörü yerleştirilmesi hedeflenmiştir. Ancak pudental arterde endojen H<sub>2</sub>S üretiminin nM konsantrasyonlarda olması, organ banyosundaki H<sub>2</sub>S'yi ölçmeye olanak vermemiştir. Sonuç olarak, endojen H<sub>2</sub>S sentezi araştırılırken; H<sub>2</sub>S'nin hızla difüze olabilen, çabuk

bozulan bir gaz olmasını ve üretimin çok düşük konsantrasyonlarda olmasını araştırmanın sınırlılıkları arasında değerlendirmek uygun olacaktır

### **1.6. Araştırmanın amacı**

Araştırmanın temel amacı, ilk kez ostolün erektile fonksiyon üzerindeki yararlı etkilerine  $H_2S$ 'nin katkısının araştırılmasıdır.

Bu kapsamda araştırmanın başlıca hedefleri; ostolün,

-Erektile dokudaki (korpus kavernozum, pudental arter) gevşetici etkisine  $H_2S$ 'nin aracılık edip etmediğinin izole organ banyosu çalışmalarıyla,

- $H_2S$  düzeylerini artırıp artırmadığının  $H_2S$  mikrosensör deneyleriyle,

- $H_2S$  sentezinden sorumlu enzimlerin ekspresyonunu değiştirip değiştirmediğinin Western blot çalışmalarıyla,

-Vasküler yanıtları etkilerken eş zamanlı olarak  $H_2S$  düzeylerini artırıp artırmadığının,  $H_2S$  mikrosensör takılı izole organ banyosu deneyleriyle ortaya konmasıdır.

\*Ayrıca ostolün, *in vivo* erektile fonksiyonu arttırıcı etkinliğinin, intrakavernöz basınç ölçülerek araştırılması amacıyla ön denemeler de bu tez kapsamında yapılmıştır.

## 2. Genel Bilgiler

### 2.1. Penis anatomisi

Erkek üreme sisteminde yer alan penis, idrarın vücuttan atılması ve cinsel ilişki sırasında spermin vajinaya taşınması gibi birçok önemli işlevi yerine getirmektedir. Peniste bulunan sinirler ve kan damarları, hem ereksiyonu hem de duyarlılığı kontrol etmektedir. Penis anatomik olarak farklı fonksiyonel yapılardan oluşmaktadır (Andersson ve Wagner, 1995; Dean ve Lue, 2005; Panchatsharam, Durland ve Zito, 2023; Pedrosa Nunes ve Webb, 2012) (Şekil 1):

Korpus kavernozum: Peniste bir çift korpus kavernozum bulunmaktadır. Korpus kavernozumlar, kollajenden oluşan tunica albuginea adında çift katmanlı bir zar içinde yer almakta ve içerlerinde büyüklükleri değişken olan sinüzoidler bulunmaktadır. Bu sinüzoidler; tunica albuginea ile çevrili, düz kas trabeküllerinden, elastik liflerden ve kollajenden oluşan fibröz bir iskelet tarafından desteklenmektedir. Fibröz iskelet yapısı, korpus kavernozumda yer alan sinüzoidlerin kanla dolmasını ve penisin ereksiyon sırasında sertleşmesini sağlamaktadır. Tunica albuginea ayrıca, sinüzoidleri boşaltan venleri sıkıştırarak venöz kan akışını engellemekte ve böylece ereksiyonun devamlılığını sağlamaktadır.

Korpus spongiozum: Penisin ventral kısmında yer alan, üretrayı çevreleyen daha küçük bir erektil doku parçasıdır ve distal uçta glans penisi oluşturmaktadır. Bu yapı, glans peniste hiç bulunmayan, daha az yoğunlukta tunica zarı içermektedir. Korpus spongiozumda yer alan sinüzoidler, korpus kavernozumdakilere göre daha büyüktür. Bu yapı da, ereksiyon sırasında genişlemekte, ancak asıl görevi, idrarın ve spermin geçişini sağlamak ve ereksiyon sırasında üretranın sıkışmasını önlemektir.

İskiokavernöz kas: Korpus kavernozumların proksimaldeki başlangıç noktaları olarak değerlendirilen iki ayrı krurayı çevrelemektedir. Bu kasın kasılması, kanın kruradaki kavernöz boşluktan distal olarak korpus kavernozumuna doğru ilerlemesini sağlamak ve ereksiyona katkıda bulunmaktadır.

Bulbospongioz kas: Penisin tabanında bulunan bulbusu çevrelemekte ve dorsal veni sıkıştırarak ereksiyona katkı sağlamaktadır. Ayrıca, idrar yapma ve ejakülasyon sırasında idrarın ve spermin dışarı atılmasına yardımcı olmak için üretrayı sıkıştırmaktadır.

Glans penis: Penisin uç kısmı olan glans penis, korpus spongiosumun devamıdır ve genellikle daha fazla sinir ucu içermektedir. Glans, cinsel uyarılma ve orgazm sırasında önemli bir rol oynamaktadır. Sünnet derisi (prepus) tarafından kısmen veya tamamen kaplanabilmektedir.

Üretra: Penis boyunca uzanan, glans penisten dışarıya açılan, idrarın ve spermin vücuttan atıldığı kanaldır. Erkek üretrası hem idrar yolu hem de üreme sistemi için kullanılan ortak bir kanaldır.

Sinirler, arterler ve venler: Sinirler ve kan damarları erektil fonksiyonda büyük rol oynamakta ve penisin işlevselliğini kontrol etmektedir. Peniste kavernoza, dorsal ve bulboüretral olmak üzere üç ana arter bulunmaktadır. Bu üç arterin de iliak arterden köken alan internal pudendal arterden dallandığı bilinmektedir. Pudendal arterin, total penis vasküler direncinin %70'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle korpus kavernoza/kavernöz artere kıyasla, pudendal arterdeki değişikliklerin (vazodilatasyon, vazokonstriksiyon, stenoz, vb.), arteriyel kan akışının belirlenmesindeki en önemli faktör olduğu vurgulanmıştır (Manabe, Heaton, Morales, Kumon ve Adams, 2000).

Bu nedenle, pudendal arter, erektil fonksiyonda çok önemli bir role sahiptir ve erektil fonksiyon/disfonksiyon çalışmalarında sıklıkla tercih edilen vasküler bir dokudur (Justina, Priviero, Giachini ve Webb, 2020; Lopes ve diğerleri, 2014; Odom, Powers, Pak ve Hannan, 2019; Silva ve diğerleri, 2019).

Kan, korpus kavernoza, kavernoza penil arter aracılığı ile gelmekte, sinüzoidlere dolan bu kan peniste genişlemeye neden olurken, dorsal penil arter ise glansın genişlemesini sağlamaktadır. Penil venöz sistem ise, venöz drenaj için tunica albuginea ile Buck fasyası arasında konumlanan bir çift dorsal arterin eşlik ettiği tek bir derin dorsal ven olarak tanımlanmaktadır.

Penisin innervasyonu, hem otonom (sempatik ve parasempatik) hem de somatik (duyusal ve motor) kavernoza sinirler tarafından sağlanmaktadır (Andersson ve Wagner, 1995; Dean ve Lue, 2005; Panchatsharam ve diğerleri, 2023; Pedrosa Nunes ve Webb, 2012):

## 1. Otonomik innervasyon

Sempatik sinirler: Omuriliğin torakolumbal bölgesinden köken alan bu sinirler, penisteki arterlerin kasılmasını sağlayarak kan akışını azaltmakta ve böylece ereksiyonun sona ermesine (detümesans) neden olmaktadır.

Parasempatik sinirler: Omuriliğin sakral bölgesinden köken alan bu sinirler, penisteki arterlerin gevşemesini sağlayarak kan akışını artırmakta ve böylece ereksiyonun başlaması (tümesans) aşamasında önemli bir rol oynamaktadır.

## 2. Somatik innervasyon

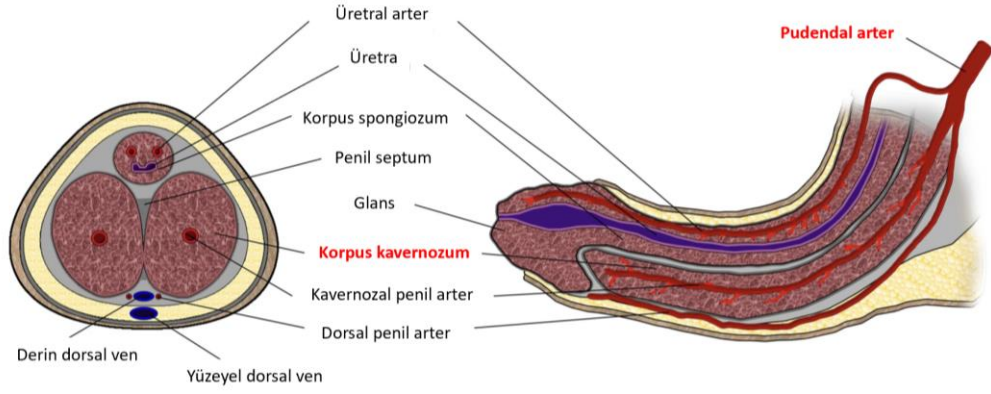
Somatoduyusal sinirler: Penisin duyusal innervasyonu, cinsel uyarılma ve zevk algısında önemli bir role sahiptir. Bu sinirler, penis derisi, glans, üretra ve korpus kavernozumdan gelen duyusal bilgileri merkezi sinir sistemine taşımaktadır.

Somatomotor sinirler: Penisin motor innervasyonu, özellikle iskiokavernöz ve bulbospongioz kasların kasılmasını sağlamaktadır. Bu kasların kasılması hem sert ereksiyona katkıda bulunmakta hem de ejakülasyon sırasında spermin dışarı atılmasına yardımcı olmaktadır.

Kavernöz sinirler: Sempatik ve parasempatik sinirler, kavernöz sinirleri oluşturmak üzere birleşmektedir. Bu sinirler, korpus kavernoza ve korpus spongiozuma girmekte ve ereksiyon sırasındaki kan akışını ve damarların genişlemesini kontrol etmektedir. Bu sinirlerin düzgün çalışması, sağlıklı bir erektil fonksiyon için son derece önemlidir.

Bu yapıların herhangi birindeki yapısal/işlevsel bozukluk, ED başta olmak üzere çeşitli cinsel işlev bozukluklarına yol açabilmektedir (Pedrosa Nunes ve Webb, 2012).

Düz kasların, venlerin ve arterlerin yer aldığı penis anatomisi **Şekil 1**'de gösterilmiştir.



**Şekil 1. Penis anatomisi**

(Gómez-Bermejo, Huang, Bertolotto ve Sidhu, 2023)

## 2.2. Erektıl fonksiyon fizyolojisi

Erektıl fonksiyon, nöronal, hormonal ve vasküler sistemlerin; düz kas ile koordine çalışması sonucunda ortaya çıkan karmaşık bir nörovasküler süreçtir. Arteriyel genişleme ve venöz tıkanma olarak özetlenen ereksiyon, korpus kavernozumdaki düz kas ve kan damarları tarafından kontrol edilmektedir (Dean ve Lue, 2005; Lue, 2000). İlk olarak cinsel uyarı ile sempatik inhibisyon, parasempatik aktivasyon ve kavernoöz sinirlerden pro-erektogenik nörotransmitterlerin (NO vb.) salınımı tetiklenmektedir. Parasempatik sinirlerin aktivasyonu, kavernoza düz kasın gevşemesine neden olmaktadır. Gevşeyen düz kas ve kavernoza arter, pudendal arterden gelen kanı penil doku içindeki sinüzoid boşluklara taşımakta ve bu boşluklara dolan kan ile artan basınç sayesinde ereksiyon gerçekleşmektedir. Bu süreç ile paralel olarak, tunica albuginea boyunca uzanan emisser venlerin bu tabaka ile sinüzoidler arasında sıkışması sonucu venöz akış ve kanın penisten geri dönmesi engellenmekte ve ereksiyon süreci devam etmektedir. Cinsel uyarı ile iskiokavernoöz ve bulbospongioz kaslar kasılmakta ve kan miktarı (intrakavernoza basınç) daha da artmaktadır. İntrakavernoza basıncın yavaş yavaş azalması ile birlikte trabeküler düz kaslar kasılmaya, emisser venler genişlemeye ve sinüzoidlerin içindeki kan azalmaya başlamaktadır. Venöz drenaj ve arteriyel kan akışının normale dönmesi ile ereksiyon süreci sonlanmaktadır (Panchatsharam ve diğerleri, 2023; Pedrosa Nunes ve Webb, 2012).

Sonuç olarak penil ereksiyonun başlaması, idamesi ve sonlanması, intrakavernoza kan akımı ve intrakavernoza basınç artışı ile ilişkilidir. Bu nedenle, deneysel

çalışmalarda erektil fonksiyonun göstergesi olarak krusa yerleştirilen bir kanül ile ölçölen intrakavernözal basınç ortalama arteriyel kan basıncına oranlanmaktadır (S. G. Comerma-Steffensen, Carvacho, Hedegaard ve Simonsen, 2017; Jupiter ve diğlerleri, 2015).

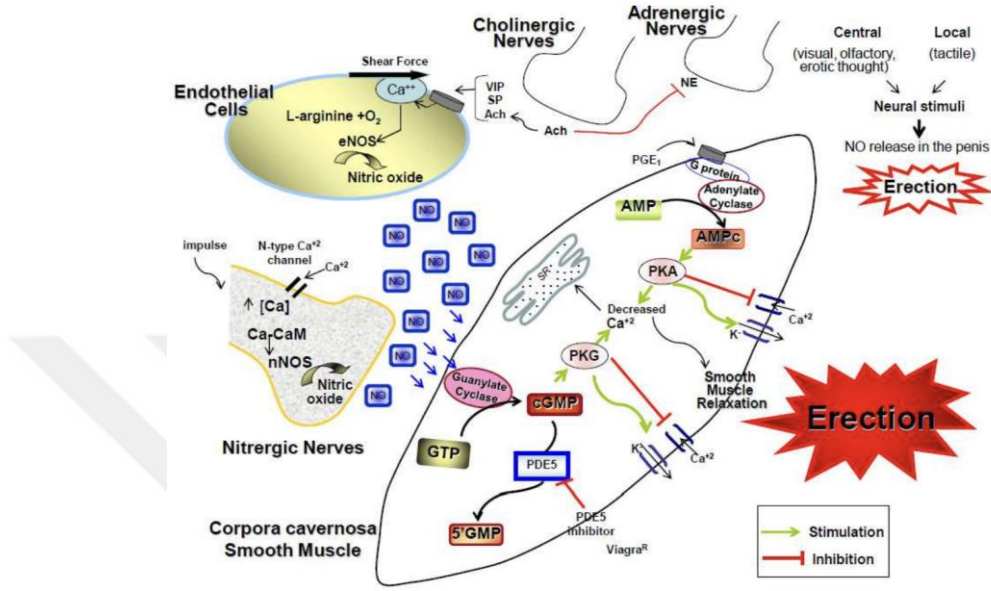
Ereksiyon hücresel mekanizması aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

ACh, parasempatik kavernöz sinirlerin terminal uçlarından salıverildikten sonra endoteldeki muskarinik reseptörlere bağlanmaktadır. Bu bağlanma, eNOS aktivitesini artırmakta ve L-arjinenin NO oluşmaktadır (Yafi ve diğlerleri, 2016). NO, korpus kavernozum düz kasına difüze olarak siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunu katalize eden çözünebilir guanilat siklaz enzimini (sGC, soluble guanylate cyclase) aktive etmektedir. cGMP, protein kinaz G (PKG) aracılığıyla  $Ca^{+2}$  kanallarını inhibe,  $K^{+}$  kanallarını ise aktive ederek (hiperpolarizasyon) sitozolik  $Ca^{+2}$  düzeylerinin azalmasına yol açmakta, bunun sonucunda ise düz kas gevşemesine ve ereksiyona neden olmaktadır. PDE-5 enzimi, cGMP'yi hidroliz ederek gevşemeyi sonlandırmaktadır (K. P. Nunes, Labazi ve Webb, 2012).

NO; endotelyal (eNOS), nöronal (nNOS) ve indüklenabilir (iNOS) olmak üzere üç farklı nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla üretilmektedir (Konukoglu ve Uzun, 2017). NO oluşumu ve salıverilmesi ereksiyonu başlatan temel olay olarak nitelendirilmektedir (Mizusawa, Hedlund, Håkansson, Alm ve Andersson, 2001; K. P. Nunes ve diğlerleri, 2012). nNOS'un hızlı ve kısa süreli aktivasyonu erektil süreci başlatmakta, fosfatidilinozitol 3-kinaz/Protein kinaz B ( $PI_3K/Akt$ )-bağımlı fosforilasyon ve eNOS aktivasyonu ise sürekli NO üretimi ile maksimum ereksiyona yol açmaktadır (Gratzke ve diğlerleri, 2010; K. P. Nunes ve diğlerleri, 2012).

Düz kaslarda, büyük iletkenlikli  $Ca^{+2}$  ile aktive olan ( $BK_{Ca}$ : large-conductance,  $Ca^{2+}$ -activated), orta iletkenlikli  $Ca^{+2}$  ile aktive olan ( $K_{Ca3.1}$ : intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated), adenosin trifosfata (ATP) duyarlı ( $K_{ATP}$ ), içeriye doğru düzeltici ( $K_{IR}$ : inward-rectifier  $K^{+}$ ) ve voltaj kapılı ( $K_V$ )  $K^{+}$  kanalları olmak üzere çeşitli potasyum kanalları yer almaktadır (Gratzke ve diğlerleri, 2010; Jackson, 2017). Potasyum kanallarının fosforilasyonu (açılması), korpus kavernozumun hiperpolarizasyonuna ve gevşemesine neden olmakta ve böylece erektil fonksiyonda rol oynamaktadır. NO'nun, cGMP/PKG aracılığıyla bu kanalların aktivasyonuna

neden olduğu bilinmektedir (S. Comerma-Steffensen ve diğerleri, 2022; S. G. Comerma-Steffensen ve diğerleri, 2017; Diniz, Ferreira, de Souza ve da Silva, 2020). **Şekil 2'**de erektil fonksiyon sürecinde yer alan farmakolojik yollar gösterilmiştir.



**Şekil 2. Eretil fonksiyonda rol alan farmakolojik yollar**

(Pedrosa Nunes ve Webb, 2012)

### 2.3. Eretil disfonksiyon (ED)

ED, cinsel performans için gerekli olan ereksiyona ulaşmada veya sürdürmede yani erektil fonksiyonda meydana gelen bozukluk durumudur. Ereksiyonun gerçekleşmesini sağlayan vasküler ve/veya nörolojik süreçlerin hasar görmesi ile ilişkilidir (Irwin, 2019; Javaroni ve Neves, 2012; Yafi ve diğerleri, 2016). ED, 40-70 yaş arasındaki erkeklerin %52'sinde görülmekte (Yafi ve diğerleri, 2016) ve 2025 yılında 322 milyon erkeğin ED hastası olacağı tahmin edilmektedir (K. P. Nunes ve diğerleri, 2012).

Vasküler fonksiyonun, ereksiyonun gerçekleşmesindeki kritik önemi, yukarıdaki 'erektil fonksiyon fizyolojisi' başlığı altında detaylı bir şekilde anlatılmıştır. Bu nedenle, penise kan taşıyan arterlerde meydana gelen herhangi bir vasküler bozukluğun/hastalığın, kan akışını kısıtlayarak ED'ye neden olacağı bilinmektedir.

Bu durum, genel kalp-damar sağlığının korunmasının, erektil işlevin sŸrdŸrŸlmesi için önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca penil dokudaki kavernöz arterlerin çapı, kalpteki koroner arterlerden çok daha kŸk olduğundan; ED, koroner arter hastalığı semptomları grŸlmeden önce ortaya çıkmakta ve bu nedenle kardiyovaskŸler hastalıklarının erken bir belirtici olarak değerlendirilmektedir. ED'nin, kardiyovaskŸler hastalık belirtilerinden Ÿ-beş yıl önce ortaya çıkması, bu dönemin kardiyovaskŸler risk faktörlerinin araştırılması ve mŸdahalesi için önemli bir zaman dilimi olarak değerlendirilmesine olanak tanımaktadır (Diaconu ve diğerleri, 2020; Gratzke ve diğerleri, 2010).

ED, etiyolojisine göre organik, non-organik (psikojenik) ve ikisinin birlikte grŸldŸđŸ mikst tip olmak Ÿzere Ÿe ayrılmaktadır. ED vakalarının %80'den fazlasının organik nedenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir. VaskŸlojenik ED, organik ED'nin açık ara en yaygın etiyolojisidir. ED, etiyolojik olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır (Anaissie ve Hellstrom, 2016; Lue, 2000; Persu ve diğerleri, 2009; Yafi ve diğerleri, 2016):

### **1. Organik ED**

#### **1. A. Nörojenik**

- Merkezi: SerebrovaskŸler, multipl skleroz, omurilik yaralanması vb.
- Periferik: Radikal prostatektomi sonrası vb.

#### **1. B. Endokrin**

Diabetes mellitus, hipogonadizm, hiperprolaktinemi vb.

#### **1. C. VaskŸlojenik**

- Arteriyel: Ateroskleroz, travma, endotel disfonksiyon vb.
- Venöz: Veno-oklŸzif mekanizmanın başarısızlığı

#### **1. D. İlaç/cerrahi girişim (iatrojenik) ve madde bağımlılığına bağlı**

- Antihipertansif ajanlar, antidepresanlar, antiandrojenler, merkezi sinir sistemi depresanları (rn. benzodiazepinler) vb.
- Radikal pelvik cerrahi (meydana gelen hasar esas olarak kavernöz sinir hasarı gibi nörojenik niteliktedir, ancak pudendal arterin yaralanması da ED'ye neden olabilir.)
- Sigara, alkol, yasadışı ilaçlar (marihuana, eroin vb.)

### 1. E. Sistemik hastalıklar

Kardiyovasküler, pulmoner, karaciğer, böbrek hastalıkları vb.

### 1. F. Lokal hastalıklar

Peyronie hastalığı, penis kırığı vb.

## **2. Psikojenik ED**

-Depresyon, şizofreni, geçmiş travmatik deneyimler, yetersiz cinsel eğitim, fiziksel ve zihinsel sağlık problemleri vb.

-Akut ilişki problemleri, günlük stresler

-Bilgi eksikliği

## **3. Mikst ED**

Organik ve psikojenik nedenlerin (anksiyete, depresyon vb.) bir arada görüldüğü ED tipidir.

En sık karşılaşılan vaskülojenik ED; hipertansiyon, hiperlipidemi ve diyabet gibi kardiyovasküler risk faktörleri ile ilişkilendirilmiş ve penil dokuda endotele bağlı gevşemenin azalmasıyla ereksiyonun bozulduğu bildirilmiştir (Javaroni ve Neves, 2012; Lue, 2000; Solomon, Man ve Jackson, 2003; Yafı ve diğerleri, 2016). ED tanısı konmuş erkeklerin, yaklaşık %42'sinde hiperlipidemi, %40'ında hipertansiyon ve %20'sinde diyabet bulunduğu rapor edilmiştir (Irwin, 2019). Bununla birlikte temelinde endotel disfonksiyonun yer aldığı hipertansiyon hastalarında genel popülasyona göre ED sıklığının ve hastalık şiddetinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Burchardt ve diğerleri, 2000; Javaroni ve Neves, 2012; K. P. Nunes ve diğerleri, 2012).

Vasküler endotel hücreler, NO gibi birçok güçlü vazodilatör ajan üreterek vasküler düzenlemeye katkıda bulunmaktadır (Beevers, Lip ve O'Brien, 2001). Ereksiyonun gerçekleşmesinden birincil derecede sorumlu olan NO'nun biyoyararlanımının azalması, düz kas tonusunun artması ve ED ile sonuçlanmaktadır (Brioni ve diğerleri, 2002; Dean ve Lue, 2005; Yetik-Anacak, Sorrentino, Linder ve Murat, 2015).

#### 2.4. ED tedavisi ve PDE-5 inhibitörleri

PDE-5 inhibitörleri (örn. sildenafil, tadalafil), ED tedavisinde ilk sırada kullanılan ilaçlardır. NO/cGMP sinyal iletim yolunun anahtar enzimi PDE-5, düz kas gevşemesini ve dolayısıyla erektile süreci sonlandırma işlevi görmektedir. PDE-5 inhibitörlerinin etkilerini gösterebilmeleri için endotelde ve NO üretiminde bozukluk olmaması gerekmektedir (K. P. Nunes ve diğerleri, 2012). PDE-5 inhibitörlerinin genel ED hasta popülasyonunun %30-40'ında, diyabetli ED hastalarının ise %50'sinde etki göstermediği rapor edilmiştir (Goldstein ve diğerleri, 2012; Kendirci, Tanriverdi, Trost ve Hellstrom, 2006; Porst ve diğerleri, 2013). Bu nedenle özellikle hipertansiyon, diyabet ve hiperlipidemi kaynaklı vaskülojenik ED'de seçilecek ajanların tedavide yararlı olmaları için endotelden ve NO'dan bağımsız etkiler göstermesi esastır.

PDE-5 inhibitörlerine yanıt vermeyen veya tolerans geliştiren hastalar için alternatif tedavi seçenekleri arasında intrakavernözal enjeksiyon (papaverin, prostaglandin E1), vakum ereksiyon cihazı (ikinci basamak tedavi) ve penil protez implantasyonu (üçüncü basamak tedavi) bulunmaktadır. Ancak bu tedavi yöntemlerinin oral ilaçlara kıyasla uygulama zorlukları, ağrı, priapizm, hematoma, penil fibrozis ve protez enfeksiyonu gibi ciddi yan etkileri, kullanımlarını kısıtlamaktadır (C. M. Wang, Wu, Xiang, Xiao ve Hu, 2023). Bunlar dışında, düşük yoğunluklu ekstrakorporeal şok dalga uygulaması, kök hücre ve ekzosom uygulaması gibi bazı yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu seçeneklerin etkinliği, prelinik araştırmalarda ve sınırlı sayıda klinik çalışmada gösterilmiş olsa da, etkinliklerinin ve güvenilirliklerinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi için daha geniş çaplı araştırmalara ihtiyaç vardır (Feng, Peng, Deng, Liu ve Wang, 2023; C. M. Wang ve diğerleri, 2023).

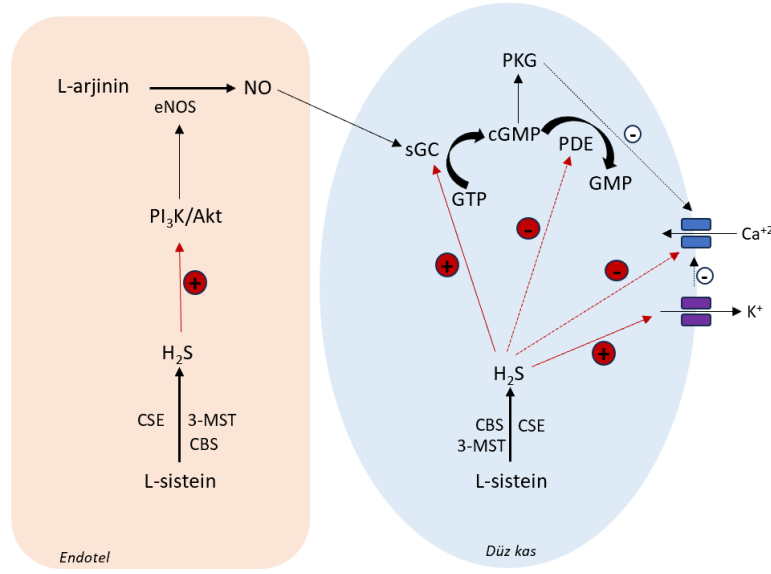
Bu durum ED tedavisi için henüz kesin ve etkili bir çözümünün olmadığını ortaya koymakta ve etkinliği endotel fonksiyona/NO üretimine bağlı olmayan yeni ilaç adaylarının araştırılmasının gerekliliğini vurgulamaktadır. Son yıllarda literatürde; yeni bir gazotransmitter olan H<sub>2</sub>S'nin, endotelden bağımsız bir mekanizma ile erektile fonksiyonu artırdığına dikkat çekilmektedir (Yetik-Anacak ve diğerleri, 2015).

## 2.5. Hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S)

1996 yılında Abe ve Kimura tarafından H<sub>2</sub>S'nin vücutta doğal olarak bulunan bir transmitter olduğunu gösteren ilk kanıtlar yayımlanmış ve H<sub>2</sub>S, NO ve CO<sub>2</sub>'den sonra üçüncü gazotransmitter olarak araştırılmaya başlanmıştır (Abe ve Kimura, 1996). H<sub>2</sub>S; düz kas gevşetici etkisiyle ön plana çıkan, gaz yapısında yeni bir endojen vazodilatör ve nöromodülatördür. H<sub>2</sub>S üretimindeki bozukluk, vasküler ve erektil fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Olivencia ve diğerleri, 2023; Van Goor, Van Den Born, Hillebrands ve Joles, 2016). H<sub>2</sub>S, vücutta L-sistein aminoasidinden, sistatyonin  $\beta$ -sentaz (CBS), sistatyonin  $\gamma$ -liyaz (CSE) ve 3-merkaptopiruvat sülfür transferaz (3-MST) enzimleri aracılığıyla üretilmektedir. H<sub>2</sub>S'nin, gevşetici etkisini büyük ölçüde damar düz kasındaki K<sub>ATP</sub> kanallarını açarak ve düz kası hiperpolarize ederek gösterdiği bildirilmiştir (Yang ve diğerleri, 2008; W. Zhao, Zhang, Lu ve Wang, 2001). H<sub>2</sub>S'nin gevşetici etkisi ile ilgili önerilen bir diğer mekanizma, NO'ya benzer şekilde sGC aktivitesini arttırarak ve PDE enzimini inhibe ederek cGMP düzeylerini artırmasıdır (Bibli ve diğerleri, 2015; La Fuente ve diğerleri, 2019; Olivencia ve diğerleri, 2023; Z. Zhou ve diğerleri, 2016). Ayrıca H<sub>2</sub>S'nin, NO gibi, KV<sub>7</sub> ve BK<sub>Ca</sub> kanallarını aktive ederek gevşemeye neden olduğu rapor edilmiştir (S. G. Comerma-Steffensen ve diğerleri, 2017; Kida, Sugiyama, Yoshimoto ve Ogawa, 2013; Yan Li, Bai, Yang, Hoshi ve Chen, 2020; Martelli ve diğerleri, 2013). H<sub>2</sub>S'nin NO ile ortak alt mekanizmalar üzerinden gevşetici etki göstermesinin yanı sıra endotel hücrelerde PI<sub>3</sub>K/Akt yolağını aktive ederek NO üretimini arttırdığı bildirilmiştir (Coletta ve diğerleri, 2012; Meng, Adaikan ve Srilatha, 2012; Olivencia ve diğerleri, 2023).

**Şekil 3'**te H<sub>2</sub>S'nin gevşetici etki mekanizmasında yer alan yollar özetlenmiştir:

H<sub>2</sub>S endotel hücrelerde CSE ve 3-MST enzimleri, düz kas hücrelerinde ise CBS enzimi aracılığıyla sentezlenmektedir. H<sub>2</sub>S, endoteldeki PI<sub>3</sub>K/Akt yolağını aktive ederek NO üretimine neden olmaktadır. Bunun yanı sıra H<sub>2</sub>S, sGC enzimini aktive ederek ve PDE enzimlerini inhibe ederek cGMP düzeyini arttırmakta ve PKG aracılığıyla düz kasta yer alan K<sup>+</sup> kanallarını aktive ederek hücreyi hiperpolarize etmekte ve Ca<sup>+2</sup> kanallarını/girişini inhibe etmektedir (Osmond ve Kanagy, 2014; Qiu, Villalta, Lin ve Lue, 2012).



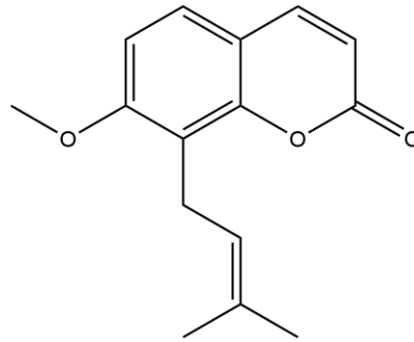
**Şekil 3. H<sub>2</sub>S'nin gevşetici etki mekanizması**

H<sub>2</sub>S son zamanlarda endotelden bağımsız bir mekanizma ile erektil fonksiyonu artırıcı olarak dikkat çekmektedir (Yetik-Anacak ve diğerleri, 2015). CSE enziminin DL-propargilglisin (PAG) ile inhibisyonu (Weimin Zhao, Ndisang ve Wang, 2003) veya genetik olarak silinmesi (Yang ve diğerleri, 2008) endotel aracılı gevşemede azalmaya ve hipertansiyona neden olmaktadır. İnsan penil dokusunun kas trabeküllerinde ve penil arterin düz kasında CSE daha yüksek oranda olmak üzere, CSE ve CBS enzimleri bulunmaktadır. Ayrıca, insan korpus kavernozumunun ekzojen H<sub>2</sub>S'ye ve L-sisteine bağlı, endotelden bağımsız olarak gevşediği gösterilmiştir (Di Villa Bianca ve diğerleri, 2009). PAG ile CSE enziminin inhibisyonu, insan dışı primatlarda kavernöz basıncı azaltmıştır (Srilatha, Adaikan ve Moore, 2006). Sıçanlarda *in vivo* hipertansiyon modeli oluşturmak amacıyla NOS inhibitörü N $\omega$ -Nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) uygulamasının; penil dokuda intrakavernöz basıncı, eNOS, CSE ekspresyon düzeylerini, H<sub>2</sub>S konsantrasyonunu azalttığı ve ekzojen H<sub>2</sub>S tedavisinin bu parametrelerin tümünü düzelttiği rapor edilmiştir (Yılmaz ve diğerleri, 2019). Bu nedenle H<sub>2</sub>S, vaskülojenik ED başta olmak üzere, endotel fonksiyonun bozulduğu birçok vasküler hastalığın tedavisi için umut vadeden bir terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir.

## 2.6. Ostol

Ostol, 7-metoksi-8-(3-metil-2-butenil)-2H-1-benzopiran-2-on (Şekil 4), özellikle *Cnidium monnieri*'nin meyvelerinde yüksek miktarda bulunan basit kumarin yapısında doğal bir bileşiktir (R. Wang, Kong, Wang, Lien ve Lien, 2007; You, Feng, An ve Wang, 2009). Bununla birlikte ostol, önceki projemiz kapsamında (TÜBİTAK-1001-117S116), ülkemizde endemik olarak yetişen ve halk arasında 'boz çakşır' olarak bilinen *Prangos heyniae* köklerinden, majör bileşik olarak yüksek miktarlarda elde edilmiştir (Albayrak, Demir, Aydın Kose ve Baykan, 2023).

Daha önce yapılan farmakolojik çalışmalarda ostolün; antienflamatuvar (W. C. Huang ve diğerleri, 2017; Y. Jin ve diğerleri, 2018; Liao ve diğerleri, 2010), antioksidan (W. C. Huang ve diğerleri, 2017; Y. Wang, Che, Zhao, Tang ve Shi, 2018), antikanser (Jarzab, Grabarska, Skalicka-Woźniak ve Stepulak, 2017), antidiyabetik (Lee ve diğerleri, 2011; Y. Yao, Zhao, Xin, Wu ve Li, 2018), antikoagülan (L. Yao ve diğerleri, 2018) ve düz kas gevşetici (J. Chen, Chiou, Chen ve Chen, 2000; W. F. Chiou, Huang, Chen ve Chen, 2001; Y. Huang ve diğerleri, 2019; Ko, Wu, Liou, Huang ve Teng, 1992; Teng, Lin, Ko, Wu ve Huang, 1994; L. Yao ve diğerleri, 2013) etkileri gösterilmiştir. Bu bileşiğin penil doku dahil olmak üzere farklı düz kaslar üzerinde güçlü gevşetici etki göstermesi ve gevşetici etki mekanizmasının tam olarak aydınlatılmamış olması dikkat çekmektedir.



Şekil 4. Ostol

## 2.7. Ostolün etki mekanizmaları ve H<sub>2</sub>S ile ilişkisi

Ostolün, *in vitro* vasküler çalışmalarda bildirilen düz kas gevşetici ve kasılmayı inhibe edici etki mekanizmaları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (**Tablo 1**). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, ostolün gevşetici etkisini; PI<sub>3</sub>K/Akt-eNOS-NO yolağının aktivasyonu sonucunda (L. Yao ve diğerleri, 2013) endotele bağlı NO sentezini artırarak (J. Chen ve diğerleri, 2000; L. Yao ve diğerleri, 2013); sGC aktivasyonuna (Teng ve diğerleri, 1994) veya PDE inhibisyonuna bağlı (J. Chen ve diğerleri, 2000) düz kas cAMP ve cGMP düzeylerini yükselterek (J. Chen ve diğerleri, 2000; Ko ve diğerleri, 1992) gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Ayrıca ostolün, penil dokuyu ED tedavisinde kullanılan papaverinden daha güçlü gevşettiği gösterilmiştir (W. F. Chiou ve diğerleri, 2001). Ostolün vasküler dokudaki gevşetici etkisinde, kalsiyum kanal blokajının rolü olduğu bildirilmiştir (Y. Huang ve diğerleri, 2019; S. N. Wu, Lo, Chen, Li ve Chiang, 2002). Bileşiğin hücre içine kalsiyum girişini düzenleyerek kalsiyuma bağlı kasılma yanıtlarını azalttığı ve L-tipi kalsiyum kanal inhibitörü etkisinin gevşemeye katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Y. Huang ve diğerleri, 2019; Ko ve diğerleri, 1992; L. Li ve diğerleri, 1995). Tavşan korpus kavernozumunda (TKK) (J. Chen ve diğerleri, 2000) ostol gevşemelerinin tetradotoksin varlığında değişmemesi, ostolün nöronal bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Ostol gevşemelerinin, TKK'da (J. Chen ve diğerleri, 2000) ve sıçan aortasında (Ko ve diğerleri, 1992) indometazin varlığında değişmemesi ise PGI<sub>2</sub>'nin ostol gevşemelerinde rol oynamadığını ortaya koymaktadır. Sonuç olarak ostolün gevşetici etkisinin prostaglandin sentezinden (J. Chen ve diğerleri, 2000; Ko ve diğerleri, 1992),  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerden (Teng ve diğerleri, 1994) ve nöronal NO salıverilmesinden (J. Chen ve diğerleri, 2000) bağımsız olduğu rapor edilmiştir.

**Tablo 1. Ostolün düz kas gevşetici ve kasılmayı inhibe edici konsantrasyonları ve etki mekanizmaları**

| Lit.                                  | Hayvan/<br>Doku                     | Gevşeme                     |                                                                        |                                                                                                  | Kasılma                                                  |                                                                                         |
|---------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
|                                       |                                     | Konsantrasyon<br>( $\mu$ M) | Gevşemeyi<br>inhibe eden<br>ajanlar                                    | Gevşeme<br>mekanizması                                                                           | Konsantrasyon<br>( $\mu$ M) / inkübasyon<br>süresi (dk.) | Ostolün kasılma<br>yanıtını inhibe ettiği<br>ajanlar                                    |
| (Ko ve<br>diğerleri,<br>1992)         | Sıçan/ torasik<br>aorta             | 40, 100, 200                | Metilen mavisi<br>(sGC inhibitörü)                                     | cAMP, cGMP<br>düzeylerinin<br>yükselmesi                                                         | 40-200/15                                                | Norepinefrin, kalsiyum<br>(K <sup>+</sup> varlığında<br>kalsiyumsuz ortamda),<br>kafein |
| (J. Chen<br>ve<br>diğerleri,<br>2000) | Tavşan/<br>korpus<br>kavernozum     | 0.1-30                      | L-NAME (NOS<br>inhibitörü), ODQ<br>(sGC inhibitörü),<br>endotel hasarı | NO sentezi, sGC<br>aktivasyonu, cGMP<br>PDE inhibisyonu                                          |                                                          |                                                                                         |
| (L. Yao<br>ve<br>diğerleri,<br>2013)  | İnsan, tavşan/<br>Pulmoner<br>arter | 1.10                        | L-NAME,<br>LY294002 (PI <sub>3</sub> K<br>inhibitörü)                  | eNOS<br>ekspresyonunu<br>artırarak, PI <sub>3</sub> K/ Akt-<br>eNOS-NO yolağını<br>aktive ederek |                                                          |                                                                                         |
| (L. Li ve<br>diğerleri,<br>1995)      | Kobay/ sol<br>atrium                | 10, 100                     |                                                                        |                                                                                                  | 10-100/15                                                | Kalsiyum/inotrop                                                                        |
| (Teng ve<br>diğerleri,<br>1994)       | Kobay/ trakea                       | 100, 200                    |                                                                        | cAMP, cGMP<br>düzeylerinin<br>yükselmesi, PDE<br>inhibisyonu                                     | 25-100/15                                                | Karbakol, PGF2 $\alpha$ ,<br>46619, LTC4                                                |

Ostolün ve H<sub>2</sub>S'nin etki mekanizmalarında literatürde gördüğümüz benzerlikler (Tablo 2); "Ostol yararlı etkilerinin pek çoğunu H<sub>2</sub>S aracılığıyla mı gerçekleştiriyor?" sorusunu aklımıza getirmiş ve özellikle de ostolün gevşetici etkisinde H<sub>2</sub>S'nin rolü olabileceğini düşünmemize neden olmuştur.

**Tablo 2. Ostolün ve H<sub>2</sub>S'nin ortak etki mekanizmaları**

| Etki              | Mekanizma                                                                                                                                             | Ostol Literatür                                                                   | H <sub>2</sub> S Literatür                                 |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Düz kas gevşetici | PI <sub>3</sub> K/Akt-eNOS-NO yolağının aktivasyonu sonucu NO seviyelerini yükselterek                                                                | (L. Yao ve diğerleri, 2013)                                                       | (Altaany, Yang ve Wang, 2013; Coletta ve diğerleri, 2012)  |
|                   | PDE-5 inhibisyonu yaparak cGMP düzeylerini artırarak                                                                                                  | (J. Chen ve diğerleri, 2000; Ko ve diğerleri, 1992)                               | (Bibli ve diğerleri, 2015)                                 |
|                   | Ca(v)1.2 kanallarını bloke ederek                                                                                                                     | (Fusi, Sgaragli, Ha, Cuong ve Saponara, 2012)                                     | (Dai ve diğerleri, 2019)                                   |
| Antioksidan       | Reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini inhibe ederek, başta GSH olmak üzere hücre içi antioksidan düzeylerini artırarak ve katalazı aktive ederek | (Cai ve diğerleri, 2018; H. J. Ji ve diğerleri, 2010; Y. Wang ve diğerleri, 2018) | (Predmore, Lefer ve Gojon, 2012; Xie, Liu ve Bian, 2016)   |
| Antienflamatuvar  | Proenflamatuvar sitokinlerin ekspresyon düzeylerini azaltarak                                                                                         | (Yi qi Li ve diğerleri, 2017; Liao ve diğerleri, 2010; L. Yao ve diğerleri, 2013) | (T. Li ve diğerleri, 2008; J. Wu ve diğerleri, 2013)       |
|                   | İndüklenebilir NOS'un ve siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin ekspresyon seviyelerini azaltarak                                                               | (Liao ve diğerleri, 2010; Nakamura ve diğerleri, 2009)                            | (Brancaleone, Mitidieri, Flower, Cirino ve Perretti, 2014) |
|                   | NF-κB düzeylerini azaltarak                                                                                                                           | (R. Chen, Xue ve Xie, 2011)                                                       | (Oh ve diğerleri, 2006)                                    |
| Nöroprotektif     | Apoptoz durumunu belirlemede kullanılan Bax/Bcl-2 ekspresyon oranını azaltarak                                                                        | (H. J. Ji ve diğerleri, 2010)                                                     | (L. M. Zhang, Jiang ve Liu, 2009)                          |
|                   | PI <sub>3</sub> K yolağını aktive ederek                                                                                                              | (Singh ve Bhatti, 2023)                                                           | (H. Zhang, Gao, Zhao, Qiao ve Yan, 2015).                  |
|                   | BDNF ekspresyon düzeyini yükselterek ve TrkB yolağını aktive ederek                                                                                   | (Liu, Xue, Shi, Qi ve Gong, 2015)                                                 | (Jiang ve diğerleri, 2015)                                 |
| Antidiyabetik     | GLUT-4 seviyelerini yükselterek hücre içine glikoz alımını artırarak                                                                                  | (Lee ve diğerleri, 2011)                                                          | (Parsanathan ve Jain, 2018)                                |

K<sub>ATP</sub> kanal aktivasyonunun, H<sub>2</sub>S'nin gevşetici etkisinde önemli rolü olduğu bildirilmiştir (W. Q. Ji ve diğerleri, 2014; S. Jin ve diğerleri, 2017; Yang ve diğerleri, 2008; W. Zhao ve diğerleri, 2001). Ancak ostolün damar gevşetici etkisinde K<sub>ATP</sub> kanallarının rolü henüz araştırılmamıştır. Ortak mekanizmalar göz önüne alındığında, ostolün H<sub>2</sub>S düzeylerini yükselterek K<sub>ATP</sub> kanallarını açtığı ve düz kası hiperpolarize ederek kalsiyum girişini engellediği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra literatürde ostolün, NO üretimini artırarak düz kası gevşettiği öne sürülmektedir (J. Chen ve diğerleri, 2000; L. Yao ve diğerleri, 2013). Vasküler dokuda H<sub>2</sub>S'nin ve NO'nun birbirlerini destekleyici bir etkileşim içinde oldukları görülmektedir (King ve

diğerleri, 2014; W. Zhao ve diğerleri, 2001; Weimin Zhao ve diğerleri, 2003). H<sub>2</sub>S'nin endoteldeki kalsiyum konsantrasyonunu ve eNOS fosforilasyonunu, doğrudan (Kida ve diğerleri, 2013) veya p38 MAPK ve PI<sub>3</sub>K/Akt aracılığıyla (Altaany ve diğerleri, 2013; Coletta ve diğerleri, 2012; S. Jin ve diğerleri, 2017) artırarak NO üretimine neden olduğu öne sürülmektedir. Benzer şekilde ostolün de, NO sentezini PI<sub>3</sub>K/Akt aracılığıyla artırdığı rapor edilmiştir (L. Yao ve diğerleri, 2013). Bu bilgiler ışığında, ostolün NO aracılı gevşetici etkisinde H<sub>2</sub>S üretimini artırmasının bir katkısı olabileceği düşünülerek; çalışmamızda, ostol-H<sub>2</sub>S ilişkisinin ilk kez araştırılması hedeflenmiştir.



### 3. Gereç ve Yöntem

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan tüm cihazlar **Tablo 3**'te listelenmiştir.

**Tablo 3. Kullanılan cihazlar ve sistemler**

| Cihaz                                                         | Firma / Ülke                           |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Basınç transdüseri                                            | AD Instrument/ Birleşik Krallık        |
| CO <sub>2</sub> inkübatörü                                    | Sanyo / Japonya                        |
| Elektroforez sistemi (Mini-Protean)                           | BioRad / ABD                           |
| Hassas Terazı AS60/220.R2                                     | Radwag / Polonya                       |
| Homojenizatör (CryoMill)                                      | Retsch / Almanya                       |
| IR görüntüleme cihazı (Odyssey)                               | Licor / ABD                            |
| Isı bloğu (TS-100)                                            | Boeco / Almanya                        |
| İnfüzyon pompası                                              | Harvard Apparatus/ABD                  |
| Manyetik karıştırıcı (MK418)                                  | Nüve / Türkiye                         |
| Mikrosensör amplifikatör (Multimeter)                         | Unisense / Danimarka                   |
| Tel miyograf, ring (halka) miyograf ve strip (şerit) miyograf | DMT / Danimarka                        |
| pH metre (Orion 5-star)                                       | Thermo Fischer Scientific / Finlandiya |
| Picoampermetre (PA2000)                                       | Unisense / Danimarka                   |
| Powerlab                                                      | AD Instruments / Avustralya            |
| Santrifüj                                                     | Hettich Lab Technology / ABD           |
| Spektrofotometre (Varioskan Flash)                            | Thermo Fischer Scientific / Finlandiya |
| Su Banyosu                                                    | Memmert / Almanya                      |
| Stimülatör                                                    | Grass Instrument Co./ ABD              |

### 3.1.2. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasallar **Tablo 4**'te listelenmiştir.

**Tablo 4. Kullanılan kimyasallar**

| Kimyasal Madde                                                        | Firma / Ülke             |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Akrilamid/bis (%30) solüsyonu, 29:1                                   | Bio-rad / ABD            |
| Amonyum persülfat (APS)                                               | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Asetilkolin HCl                                                       | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O                                  | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Dimetil sülfoksit (DMSO)                                              | Carlo Erba / İtalya      |
| DL-Propargilglisin (PAG)                                              | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| DMEM/F-12 (1:1)                                                       | Gibco / ABD              |
| Etanol, saf                                                           | Honeywell /ABD           |
| Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA)                                 | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Etilen Glikol-bis(2-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraasetik asit (EGTA) | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| EZBlock™ Proteaz fosfataz inhibitör kokteyl                           | Biovision / ABD          |
| Fenilefrin HCl                                                        | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS)                          | Biowest / Fransa         |
| Glibenklamid                                                          | Santa Cruz / ABD         |
| Glisin                                                                | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Glikoz monohidrat                                                     | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Hidroklorik asit (HCl) %37                                            | Merck / Almanya          |
| Iberitoksin                                                           | BioNordika / Danimarka   |
| IGEPAL (CA-630)                                                       | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| KCl                                                                   | Riedel de Haen / Almanya |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                       | Merck / Almanya          |
| Laemmli (SDS-Sample) 6X buffer                                        | Bioworld / ABD           |
| Linopirdin                                                            | Merck / Almanya          |
| L-sistein HCl                                                         | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Metanol, saf                                                          | Honeywell /ABD           |

|                                                                  |                          |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O                             | Merck / Almanya          |
| NaCl                                                             | AppliChem / Almanya      |
| NaHCO <sub>3</sub>                                               | Riedel de Haen / Almanya |
| N <sub>ω</sub> -Nitro-L-arginin metil ester hidroklorid (L-NAME) | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| O-(Carboxymethyl)hydroxylamine hemihydrochloride (AOAA)          | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Opti-Protein Marker                                              | ABM / ABD                |
| Ostol                                                            | Cayman / ABD             |
| Penstrep (Penisilin+Streptomisin)                                | Gibco / ABD              |
| Pridoksal 5'-fosfat                                              | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Sığır serum albümin (Bovine serum albumin, BSA)                  | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Sodyum sülfat × 9H <sub>2</sub> O                                | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Sodyum deoksikolat                                               | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Sodyum dodesil sülfat (SDS)                                      | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Süt tozu (Skim milk)                                             | BioShop/Kanada           |
| TEMED                                                            | AppliChem / Almanya      |
| Tris baz                                                         | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Trizma® hydrochloride                                            | Sigma-Aldrich / Almanya  |
| Tween 20                                                         | AppliChem / Almanya      |

### 3.1.3. Antikorlar

Western blot deneylerinde kullanılan antikorlar aşağıda listelenmiştir:

#### Primer antikorlar

1. Rabbit CTH Polyclonal Antibody (Bioss, BS-4193R)
2. Rabbit CBS Polyclonal Antibody (Bioss, BS-4193R)
3. Goat anti-gliseralehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) Antibody (Sigma-aldrich, PLA0302)

#### Sekonder antikorlar

1. Donkey anti-Rabbit IgG (680RD) (Licor, 925-68073)
2. Donkey anti-Goat IgG (800CW) (Licor, 925-32214)

### 3.1.4. Çözeltiler

#### 3.1.4.1. Fare korpus kavernozaumu (FKK) ile çalışılırken kullanılan çözeltiler

##### Krebs çözeltisinin hazırlanması

Krebs çözeltisi (1X) hazırlanırken, ilk olarak 20 kat konsantre Krebs çözeltisi (20X) (**Tablo 5**) hazırlanmış ve bu çözelti seyreltilip içerisinde glikoz,  $\text{NaHCO}_3$  ve  $\text{CaCl}_2$  eklenerek normal Krebs (**Tablo 6**) çözeltisi hazırlanmıştır.

##### Konsantre Krebs çözeltisi (20X)

Tabloda yer alan maddeler sırasıyla 1.5-1.7 L distile suda çözülmüş ve çözelti distile su ile 2 L'ye tamamlanmıştır.

**Tablo 5. Konsantre Krebs çözeltisi**

| Madde                                     | Miktar (g) |
|-------------------------------------------|------------|
| NaCl                                      | 276        |
| KCl                                       | 14         |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 11.9       |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 6.4        |

#### Normal Krebs çözeltisi (1X)

1.5-1.7 L distile suya 100 mL konsantre Krebs çözeltisi eklendikten sonra aşağıdaki kimyasallar sırasıyla eklenmiş ve distile su ile 2 L'ye tamamlanmıştır.

**Tablo 6. Normal Krebs çözeltisi**

| Madde                                 | Miktar (g) |
|---------------------------------------|------------|
| Glikoz.H <sub>2</sub> O               | 4          |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 4.2        |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O* | 0.74       |

\* CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O başka bir beherde çözüldükten sonra karıştırılarak yavaş yavaş Krebs çözeltisine eklenmiştir.

#### **Western blot deneylerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması**

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için jel hazırlanması ve Western blot deneylerinde gerekli çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları **Tablo 7**'de ve **Tablo 8**'de listelenirken; primer ve sekonder antikörlerin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve hacimleri **Tablo 9**'da belirtilmiştir.

**Tablo 7. SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler**

| <b>Çözelti/Madde</b>              | <b>Hacim/miktar</b> |
|-----------------------------------|---------------------|
| <b>Resolving jeli (%8)</b>        |                     |
| %30 akrilamit (29:1)              | 6.68 mL             |
| 4X Resolving buffer               | 6.25 mL             |
| Distile su                        | 12 mL               |
| %10 APS                           | 187.5 µL            |
| <b>4 X Resolving buffer</b>       |                     |
| 1,5 M Tris buffer<br>(pH=8,8)     | 99.6 mL             |
| SDS                               | 0.4 g               |
| TEMED                             | 400 µL              |
| <b>1,5 M Tris buffer (pH=8.8)</b> |                     |
| Tris baz                          | 72.6 g              |
| Distile su                        | 300 mL              |
| pH=8.8                            |                     |
| 400 mL'ye tamamlanır.             |                     |
| <b>Stacking jeli (%5)</b>         |                     |
| %30 akrilamit (29:1)              | 1.05 mL             |
| 4X Stacking buffer                | 2.25 mL             |
| Distile su                        | 5.7 mL              |
| %10 APS                           | 90 µL               |
| <b>4X Stacking buffer</b>         |                     |
| 0.5 M Tris buffer<br>(pH=6.8)     | 49.6 mL             |
| SDS                               | 0.2 g               |
| TEMED                             | 200 µL              |
| <b>0.5 M Tris buffer (pH=6.8)</b> |                     |
| Tris baz                          | 24.228 g            |
| Distile su                        | 300 mL              |
| pH=6.8                            |                     |
| 400 mL'ye tamamlanır.             |                     |

**Tablo 8. Western blot deneylerinde kullanılan tampon çözeltiler**

| <b>Çözelti/Madde</b>               | <b>Hacim/miktar</b> |
|------------------------------------|---------------------|
| <b>10X Running Buffer</b>          |                     |
| Tris baz                           | 30 g                |
| Glisin                             | 144 g               |
| SDS                                | 10 g                |
| Distile su                         | 700 mL              |
| Distile su ile 1 L'ye tamamlanır.  |                     |
| <b>1X Running Buffer</b>           |                     |
| 10X Running buffer                 | 100 mL              |
| Distile su                         | 900 mL              |
| <b>10X Transfer Buffer</b>         |                     |
| Tris baz                           | 30.3 g              |
| Glisin                             | 144.1 g             |
| Distile su                         | 700 mL              |
| Distile su ile 1 L'ye tamamlanır.  |                     |
| <b>1X Transfer Buffer</b>          |                     |
| 10X Transfer buffer                | 100 mL              |
| Metanol                            | 200 mL              |
| Distile su ile 1 L'ye tamamlanır.  |                     |
| <b>10X TBS</b>                     |                     |
| Tris baz                           | 12.19 g             |
| NaCl                               | 87.76 g             |
| Distile su                         | 800 mL              |
| %37 HCl ile pH=8 ayarlanır.        |                     |
| Distile su ile 1 L'ye tamamlanır.  |                     |
| <b>1X TBS</b>                      |                     |
| 10X TBS                            | 100 mL              |
| Distile su                         | 900 mL              |
| <b>TBS-T</b>                       |                     |
| 1X TBS                             | 1 L                 |
| Tween20                            | 1 mL                |
| %37 HCl ile pH=7.5-7.65 ayarlanır. |                     |
| <b>%5 BSA</b>                      |                     |
| BSA                                | 5 g                 |
| TBS-T                              | 100 mL              |

**Tablo 9. Primer ve sekonder antikor çözeltileri**

|                            | %5 BSA | TBS-T   | Antikor |
|----------------------------|--------|---------|---------|
| Anti-CSE (1/250)           | 600 µL | 5400 µL | 24 µL   |
| Anti-CBS (1/250)           | 600 µL | 5400 µL | 24 µL   |
| Anti-GAPDH (1/1000)        | 1 mL   | 9 mL    | 10 µL   |
| Sekonder antikor (1/15000) | 1 mL   | 9 mL    | 0.67 µL |

**Fosfat tamponu salin (PBS, Phosphate buffered saline) çözeltisinin, Western blot deneylerinde kullanılan çözeltinin ve homojenizasyon çözeltilerinin hazırlanması**

Mikrosensör deneylerinde kullanılacak olan PBS'in elde edilmesi için **Tablo 10**'da yer alan maddeler yaklaşık 900 mL distile suda çözündürüldükten sonra, çözeltinin pH'ı 1 M HCl ile 7.4'e ayarlanmıştır. Hacim, distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

**Tablo 10. PBS çözeltisi**

| Madde                                                | Miktar |
|------------------------------------------------------|--------|
| NaCl                                                 | 8 g    |
| KCl                                                  | 200 mg |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O | 1.77 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 240 mg |

Western blot deneylerinde kullanılacak homojenatların elde edilmesi amacıyla kullanılacak olan homojenizasyon çözeltisi ise **Tablo 11**'deki maddeler/çözeltiler 800 mL distile suya eklendikten sonra toplam hacmin distile su ile 1 L'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır.

**Tablo 11. Western blot deneyleri için homojenizasyon çözeltisi**

| Madde/Çözelti        | Miktar/Hacim |
|----------------------|--------------|
| Tris HCl             | 7.88 g       |
| EGTA                 | 0.038 g      |
| 0.5 M EDTA çözeltisi | 0.2 mL       |
| NP40 (IGEPAL)        | 10 mL        |
| SDS                  | 5 mL (%20)   |
| Deoksikolik asit     | 1 g          |

Homojenat elde etmeden hemen önce **Tablo 10** ve **Tablo 11**'de içerikleri gösterilen çözeltilere proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyl (EZBlock, Biovision) eklenerek homojenizasyon çözeltileri hazırlanmıştır.

#### **3.1.4.2. Sıçan pudental arteri (SPA) ile çalışılırken kullanılan çözeltiler**

İzole organ banyosu deneyleri için 10X fizyolojik salin solüsyonu (PSS) çözeltisi, **Tablo 12**'de belirtilen kimyasallar yaklaşık 4.5 L distile suda çözüldükten sonra distile su ile 5 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. 10X PSS çözeltisinden 500 mL alınıp 4.5 L distile suya eklendikten sonra 1.105 g  $\text{CaCl}_2$  eklenmiş ve sonrasında 15 dk gazlandırılarak (%5  $\text{CO}_2$ , %21  $\text{O}_2$ , %74  $\text{N}_2$ ), deneylerde kullanmak üzere 1X PSS hazırlanmıştır.

$\text{H}_2\text{S}$  mikrosensörlerinin kalibrasyonu için kullanılan PSS çözeltisinin pH'ı 5 N HCl çözeltisi ile 4'ün altına düşürülmüş ve çözelti 30 dk azot gazı ile gazlandırılarak  $\text{O}_2$  uzaklaştırılmıştır. Kalibrasyonda kullanılan  $\text{Na}_2\text{S}$  çözeltisini hazırlamak için ise  $\text{PSS}_{0.0}$  çözeltisi, yine azot gazı geçirilerek hazırlanmıştır.

\*Çalışmamızda bahsi geçen 'PSS', 1.6 mM  $\text{Ca}^{+2}$  içeren kalsiyumlu PSS'yi; ' $\text{PSS}_{0.0}$ ' ise  $\text{Ca}^{+2}$  içermeyen PSS'yi tanımlamaktadır.

**Tablo 12. 10X PSS çözeltisi**

| <b>Madde</b>                         | <b>Miktar (g)</b> |
|--------------------------------------|-------------------|
| NaCl                                 | 347.75            |
| KCl                                  | 17.5              |
| MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O | 14.4              |
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 105               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 8.1               |
| EDTA                                 | 0.48              |
| Glikoz                               | 54.5              |

KPSS (yüksek potasyum çözeltisi), PSS içindeki NaCl'nin 125 mM KCl ile değiştirilmiş halidir. 10X KPSS çözeltisi, **Tablo 13**'te yer alan maddeler belirtilen miktarlarda tartılıp yaklaşık 500 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra, 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. 10X KPSS çözeltisinden 500 mL alınıp, 4.5 L distile suya eklendikten sonra 1.105 g CaCl<sub>2</sub> eklenmiş ve sonrasında 15 dk gazlandırılarak (%5 CO<sub>2</sub>, %21 O<sub>2</sub>, %74 N<sub>2</sub>), deneylerde kullanmak üzere 1X KPSS hazırlanmıştır.

**Tablo 13. 10X KPSS çözeltisi**

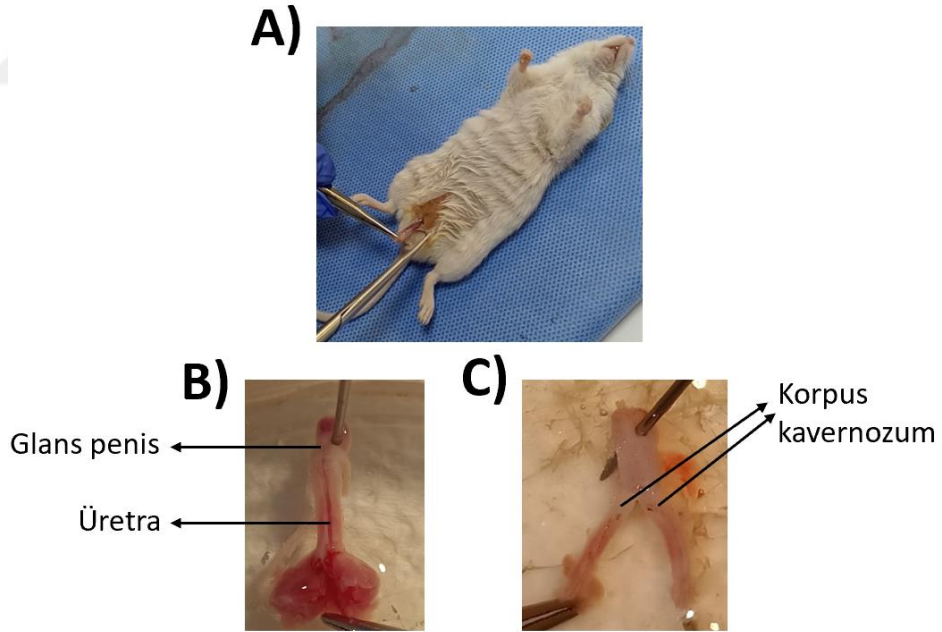
| <b>Madde</b>                         | <b>Miktar (g)</b> |
|--------------------------------------|-------------------|
| KCl                                  | 92.23             |
| MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O | 2.89              |
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 21                |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1.6               |
| EDTA                                 | 0.1               |
| Glikoz                               | 10.91             |

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Fare korpus kavernozaumu (FKK) ile yapılan deneyler

##### 3.2.1.1. Doku izolasyonu

Hayvan deneylerine Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onay belgesi alındıktan sonra başlanmıştır (belge numarası: 2020-117). Swiss albino erkek fareler (25-30 g) servikal dislokasyon yöntemi ile ötanazi edilmiştir. Her gün iki fare kesilerek elde edilen iki penil doku (**Şekil 5A**) soğuk Krebs çözeltisi (1X) içerisine alınarak Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'na getirilmiştir. Hedeflenen sağlıklı FKK doku şeritlerini elde etmek için; penil dokudaki glans penis ve üretra (**Şekil 5B**) ayrılıp uzaklaştırılarak iki korpus kavernozaumu dokusu arasındaki fibröz septum kesilmiştir. Tunica albuginea intakt halde bırakılmıştır. Sonuçta bir fareden iki adet FKK elde edilmiştir (**Şekil 5C**).



**Şekil 5. Fareden penil doku izolasyonu (A), penil dokunun (B) ve korpus kavernozaumunun (C) görüntüsü**

### 3.2.1.2. İzole organ banyosu deneyleri

İki fareden izole edilen dört FKK şeridi, 5 mL'lik organ banyolarında %95 O<sub>2</sub>, %5 CO<sub>2</sub> karışımıyla sürekli olarak gazlandırılmış Krebs solüsyonu (37°C, pH=7,4) bulunan 4 banyolu DMT marka şerit miyografa asılmıştır (**Şekil 6**). FKK'lere, 5 mN ön gerilim uygulanmış ve dokular, banyodaki Krebs çözeltisi her 15 dk.'da 5 kez değiştirilerek 45 dk. stabilizasyon için bekletilmiştir. Her konsantrasyon-yanıt protokolü arasında FKK'ler 15 dk.'lık aralıklarla 5 seri yıkanarak 30 dk.'lık yıkama periyodu uygulanmış, farmakolojik ajanlar uzaklaştırılmış, sonuncu yıkamada hacim 5 mL'ye ayarlanarak dokuların bazal tonus düzeyine gelmesi beklenmiştir. PowerLab (ADInstruments) kayıt sistemi kullanılarak izometrik gerilimdeki değişiklikler mN birimi cinsinden bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Daha stabil yanıtlar almak ve düz kas fonksiyonunu kontrol etmek amacıyla önce FKK'ler bir kez 80 mM KCl ile kastırılmıştır. Yıkama periyodundan sonra dokular  $3 \times 10^{-6}$ M fenilefrin (Fen) ile kastırılıp iki doz ( $10^{-5}$ M,  $3 \times 10^{-5}$ M) asetilkolin (ACh) ile gevşetilmiştir. FKK'nin asetilkoline karşı verdiği gevşeme yanıtı %40'tan az ise 'endoteli hasar görmüş' olarak kabul edilerek değerlendirme dışı bırakılmıştır. Endoteli sağlıklı olarak kabul edilen dokular ile çalışmaya devam edilmiştir.



**Şekil 6. Dört banyolu şerit miyografin (A) ve banyoya asılan FKK'nin (B) görüntüsü**

#### A. Ostol dilüsyon serisinin hazırlanması

Ostolün lipofilik bir bileşik olması ve sudaki çözünürlük sorunu nedeniyle; dilüsyon serisi hazırlanırken, ana stok ( $10^{-1}$  M) ostolün DMSO’da çözülmesiyle ve ileri dilüsyonlar etanol-salin ile hazırlanmıştır. Organ banyosundaki DMSO ve etanol oranları, %0.01’in altında tutulmuştur (**Tablo 14**). Ayrıca ostol dilüsyon serisi ile aynı şekilde çözücü hazırlanmış ve protokollere dahil edilmiştir.

**Tablo 14. Ostol ve çözücü dilüsyon serisinin hazırlanması**

| ORGAN BANYOSU        |                      |                      | STOK HAZIRLAMA       |            |                 |            |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------|-----------------|------------|
| Final                | Uygulanan stok hacmi | Stok konsantrasyonu  | Stok ve hacim        |            | Çözücü ve hacim |            |
| $10^{-7}$ M          | 5 $\mu$ L            | $10^{-4}$ M          | $2 \times 10^{-4}$ M | 25 $\mu$ L | Salin           | 25 $\mu$ L |
| $3 \times 10^{-7}$ M | 5 $\mu$ L            | $2 \times 10^{-4}$ M | $2 \times 10^{-3}$ M | 8 $\mu$ L  | Salin           | 72 $\mu$ L |
| $10^{-6}$ M          | 5 $\mu$ L            | $7 \times 10^{-4}$ M | $7 \times 10^{-3}$ M | 5 $\mu$ L  | Salin           | 45 $\mu$ L |
| $3 \times 10^{-6}$ M | 5 $\mu$ L            | $2 \times 10^{-3}$ M | $2 \times 10^{-2}$ M | 5 $\mu$ L  | Salin           | 45 $\mu$ L |
| $10^{-5}$ M          | 5 $\mu$ L            | $7 \times 10^{-3}$ M | $7 \times 10^{-2}$ M | 5 $\mu$ L  | Etanol          | 45 $\mu$ L |
| $3 \times 10^{-5}$ M | 5 $\mu$ L            | $2 \times 10^{-2}$ M | $10^{-1}$ M*         | 10 $\mu$ L | Etanol          | 40 $\mu$ L |
| $10^{-4}$ M          | 5 $\mu$ L            | $7 \times 10^{-2}$ M | $10^{-1}$ M*         | 35 $\mu$ L | Etanol          | 15 $\mu$ L |

\*  $10^{-1}$  M ana stok çözeltisi ostolün DMSO’da çözünmesiyle hazırlanmıştır.

## **B. İzole organ banyosu protokolleri**

Bu protokollerdeki fen ön-kastırma düzeylerinin eşit olması amacıyla fen konsantrasyonları düzenlenmiştir.

### **Ostolün FKK'yi gevşetici etkisinde $H_2S$ ve NO sentezinin rolü**

#### **Protokol 1**

1. Fen ( $3 \times 10^{-6}M$ ) ile kastırılıp ostol ( $10^{-7}M$  -  $10^{-4}M$ ) ve çözücü gevşeme yanıtları,
2. AOAA [10 mM, 30 dk.; CSE ve CBS enzimlerinin inhibitörü] inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-6}M$ ) ile kastırılıp ostol ( $10^{-7}M$  -  $10^{-4}M$ ) gevşeme yanıtları,
3. L-NAME (100  $\mu M$ , 30 dk., NOS enzim inhibitörü) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-6}M$ ) ile kastırılıp ostol ( $10^{-7}M$  -  $10^{-4}M$ ) gevşeme yanıtları,
4. AOAA (10 mM, 30 dk.) ve L-NAME (100  $\mu M$ , 30 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-6}M$ ) ile kastırılıp ostol ( $10^{-7}M$  -  $10^{-4}M$ ) gevşeme yanıtları alınmıştır.

#### **Protokol 2**

1. Çözücü (15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-6}M$ ) ile kastırılıp L-sistein ( $10^{-5}M$  -  $10^{-2}M$ ;  $H_2S$  substratı) gevşeme yanıtları,
2. Ostol ( $EC_{50}=20 \mu M$ , 15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-5}M$ ) ile kastırılıp L-sistein ( $10^{-5}M$  -  $10^{-2}M$ ) gevşeme yanıtları,
3. AOAA (10 mM, 30 dk.) ve çözücü veya ostol ( $EC_{50}=20 \mu M$ , 15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-5}M$ ) ile kastırılıp L-sistein ( $10^{-5}M$  -  $10^{-2}M$ ) gevşeme yanıtları alınmıştır.

### **Ostolün FKK'yi gevşetici etkisinde $H_2S$ alt mekanizmalarının rolü**

#### **Protokol 1**

1. Çözücü (15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-6}M$ ) ile kastırılıp  $Na_2S$  ( $10^{-6}M$  -  $3 \times 10^{-3}M$ ;  $H_2S$  donörü) gevşeme yanıtları,
2. Ostol ( $EC_{50}=20 \mu M$ , 15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-5}M$ ) ile kastırılıp  $Na_2S$  ( $10^{-6}M$  -  $3 \times 10^{-3}M$ ) gevşeme yanıtları,
3. AOAA (10 mM, 30 dk.) ve ostol ( $EC_{50}=20 \mu M$ , 15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-5}M$ ) ile kastırılıp  $Na_2S$  ( $10^{-6}M$  -  $3 \times 10^{-3}M$ ) gevşeme yanıtları,

## **Protokol 2**

1. Penil dokular, fen ( $3 \times 10^{-6}$  M) ile kastırılıp ostol ( $10^{-7}$ M- $10^{-4}$ M) gevşeme yanıtları,
2. Glibenklamid (Glb, 10  $\mu$ M, 30 dk.;  $K_{ATP}$  kanal inhibitörü) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-6}$  M) ile kastırılıp ostol ( $10^{-7}$ M- $10^{-4}$ M) gevşeme yanıtları alınmıştır.
3. ODQ (10  $\mu$ M, 30 dk.; sGC kanal inhibitörü) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-6}$  M) ile kastırılıp ostol ( $10^{-7}$ M- $10^{-4}$ M) gevşeme yanıtları alınmıştır.

\* Literatürdeki çelişkili bulgular nedeniyle; FKK'de,  $K_{ATP}$  kanallarının ve sGC enziminin  $H_2S$  gevşemelerindeki rolünü araştırmaya yönelik çalışmalar:

1. Penil dokular, fen ( $3 \times 10^{-6}$  M) ile kastırılıp  $Na_2S$  ( $10^{-6}$ M- $3 \times 10^{-3}$  M;  $H_2S$  donörü) gevşeme yanıtları,
2. Glb (10  $\mu$ M, 30 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-6}$  M) ile kastırılıp  $Na_2S$  ( $10^{-6}$ M- $3 \times 10^{-3}$ M) gevşeme yanıtları alınmıştır.
3. ODQ (10  $\mu$ M, 30 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-6}$  M) ile kastırılıp  $Na_2S$  ( $10^{-6}$ M- $3 \times 10^{-3}$ M) gevşeme yanıtları alınmıştır.

## **Ostolün NO ile ilişkili gevşetici etkisinde $H_2S$ 'nin rolü**

### **Protokol 1**

1. Çözücü (15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-6}$  M) ile kastırılıp ACh ( $10^{-9}$ M- $10^{-5}$  M) gevşeme yanıtları,
2. Ostol ( $EC_{50}=20$   $\mu$ M, 15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-5}$ M) ile kastırılıp ACh ( $10^{-9}$ M- $10^{-5}$ M) gevşeme yanıtları,
3. AOAA (10 mM, 30 dk.) ve çözücü veya ostol ( $EC_{50}=20$   $\mu$ M, 15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-5}$ M) ile kastırılıp ACh ( $10^{-9}$ M- $10^{-5}$ M) gevşeme yanıtları alınmıştır.

## Protokol 2

1. Çözücü (15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-6}$  M) ile kastırılıp sodyum nitroprussid (SNP,  $10^{-9}$  M- $10^{-4}$  M; NO donörü) gevşeme yanıtları,
2. Ostol ( $EC_{50}=20$   $\mu$ M, 15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-5}$  M) ile kastırılıp SNP ( $10^{-9}$  M- $10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları,
3. AOAA (10 mM, 30 dk.) ve ostol ( $EC_{50}=20$   $\mu$ M, 15 dk.) inkübasyonu varlığında fen ( $3 \times 10^{-5}$  M) ile kastırılıp SNP ( $10^{-9}$  M- $10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları alınmıştır.

### 3.2.1.3. Doku kültürü

FKK'deki CSE ve CBS proteinlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler, çözücü ve ostol (20  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M) varlığında/yokluğunda Western blot yöntemiyle aydınlatılmıştır. Western blot deneylerinde kullanılacak örnekler, doku kültürü yapılarak hazırlanmıştır. İzole edilen korpus kavernozum dokuları penisilin (10.000 IU/mL, Penstrep) ve streptomisin (10.000 IU/mL, Penstrep) ile %10 FBS içeren DMEM/F-12 (1:1) besiyerine alınmıştır. Tüm dokular (kontrol, çözücü, 20  $\mu$ M ostol ve 100  $\mu$ M ostol inkübe edilmiş), 37°C sıcaklıkta, 24 saat süreyle CO<sub>2</sub> inkübatöründe (Şekil 7) bekletilmişlerdir. Bu dokular homojenizasyon işlemine kadar -80°C dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 7. CO<sub>2</sub> inkübatörü

#### 3.2.1.4. Homojenizasyon

Farelerden izole edilen taze FKK dokuları, soğuk Krebs çözeltisi içinde yıkandıktan sonra sıvı azot içinde dondurulmuştur. İzole edilen dokular, homojenizasyon işlemine kadar -80°C dondurucuda saklanmıştır. Tüm dokular, CryoMill cihazında (Retsch) (**Şekil 8**) toz haline getirilmiştir. Dokular, metal tüpler içerisinde yaklaşık 30 mg olacak şekilde tartılmış, tüplerin içerisine metal bilyeler (3 adet 5 mm, 5 adet 3 mm) konulduktan sonra tüpler CryoMill cihazına yerleştirilmiştir. Cihaz sıvı azot kullanarak kriyojenik öğütme işlemini gerçekleştirmiştir. Böylece toz hale gelen dokular, fosfataz ve proteaz inhibitörleri eklenmiş PBS homojenizasyon çözeltisi içerisinde homojenize edilmiştir. Örnekler, homojenizasyon çözeltisi ile 90 dk., 4°C’de, rotatörde bekletildikten sonra 10.000 rpm’de, 4°C’de, 10 dk. santrifüj edilmiştir (**Şekil 9**). Süpernatantlar toplanarak (homojenat), BCA yöntemi ile protein konsantrasyonu ölçülmüştür.

Western blot deneylerinde kullanılacak olan, doku kültürü yapılmış FKK homojenatları hazırlanırken, toz haline getirilmiş dokular, Tris HCl, EGTA, EDTA, NP40, SDS, Deoksikolik asit (**Tablo 11**) ve ayrıca proteaz ve fosfataz inhibitörleri içeren çözelti içerisinde homojenize edilmiştir.



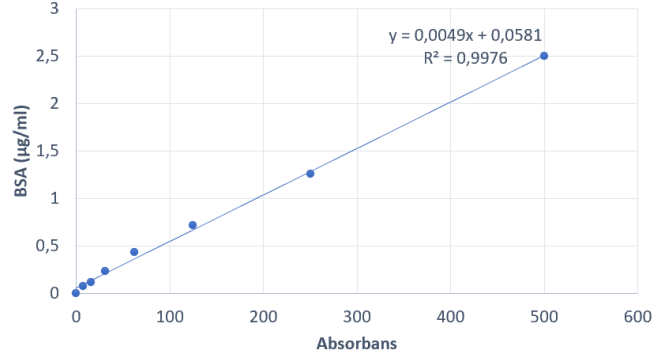
**Şekil 8. Kriyojenik öğütme yapan CryoMill cihazı**



**Şekil 9. Soğutmalı santrifüj cihazı**

#### **3.2.1.5. Protein miktar tayini**

FKK homojenatlarında bikinkoninik asit (BCA) protein kiti (Biovision) kullanılarak protein miktar tayini yapılmıştır. Kitin içerisindeki BSA proteini, distile su ile seyreltildikten sonra 7.8- 15.625- 31.25- 62.5- 125- 250- 500 µg/mL konsantrasyonlarının karşılık geldiği absorbans değerleri ile standart eğri hazırlanmıştır (**Şekil 10**). Örnekler, FKK homojenatları distile su ile 1:8 oranında dilüe edilerek hazırlanmıştır. BCA çalışma çözeltisi, kit içerisinde yer alan 2 bileşen 1:50 oranında hazırlanarak elde edilmiştir. Tüm standartlar ve örnekler 96 kuyucuklu mikropiakanın kuyucuklarına 50 µL hacimde yüklenmiş ve üzerlerine 100 µL çalışma çözeltisi eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan mikropiakanın etrafı alüminyum folyo ile sarılarak 60°C’de 1 saat süre ile bekletildikten sonra multi-plaka okuyucuda (**Şekil 11**) ölçümler alınmıştır. Homojenatlar, Western blot veya H<sub>2</sub>S ölçümü deneylerinde kullanılmak üzere -80°C dondurucuda saklanmıştır.



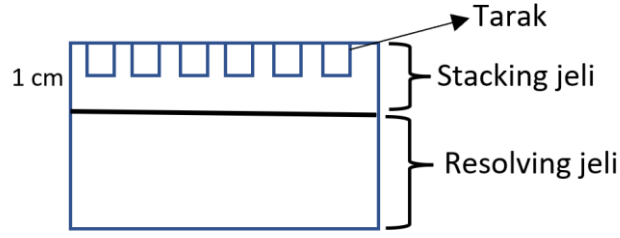
**Şekil 10. Örnek BCA standart eğri grafiği**



**Şekil 11. Multi-plaka okuyucu**

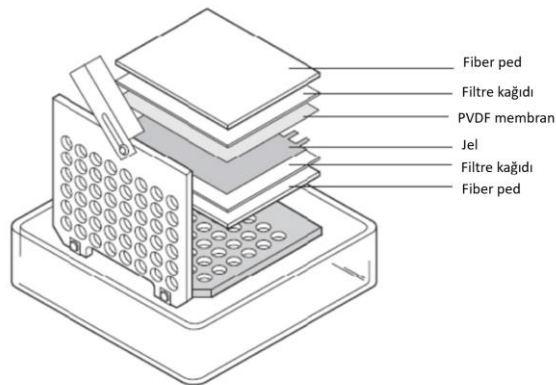
#### **3.2.1.6. Western blot deneyleri**

Ostolün, CSE ve CBS enzim ekspresyonları üzerindeki etkisi, 50 µg protein içeren FKK homojenatları kullanılarak SDS-PAGE aracılığıyla belirlenmiştir. İlk olarak resolving jeli (ayırma) ve stacking jeli (depolama) **Tablo 7**'deki çözeltiler/maddeler kullanılarak hazırlanmıştır. Yüklenebilecek örnek hacmini arttırmak için 1.5 mm'lik cam kullanılmış ve jeller **Şekil 12**'deki gibi dökülerek 1.5 mm'lik tarak takılmıştır.



**Şekil 12. Jel hazırlanması**

50 µg protein içeren FKK homojenatlarına 6X Laemmli tamponu (boya+beta-merkaptoetanol) eklendikten sonra örnekler 95°C'ye ayarlanan ısı bloğunda 5 dk. bekletilmiş ve proteinler denatüre edilmiştir. Denatüre edilen örnekler ve marker, içerisinde running buffer (yürütme tamponu) (1X) bulunan tankta jele yüklenmiştir. Proteinler, stacking jelinin sonuna kadar 60 V ile, resolving jelinde ise 120 V ile yürütülmüşlerdir. Hedeflenen ayrılma gerçekleştikten sonra proteinlerin jelden poliviniliden diflorür (PVDF) membrana (Immobilon-FL, Millipore, IPFL00005) transfer (aktarma) işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için **Şekil 13**'teki sıralama ile transfer sandviçi hazırlanmış, sandviç transfer buffer (aktarma tamponu) (1X) bulunan tank içerisine yerleştirilmiştir. Tank buz içerisine yerleştirildikten sonra soğuk odada (+4°C) 400 mA'de 90 dk. boyunca ıslak transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.



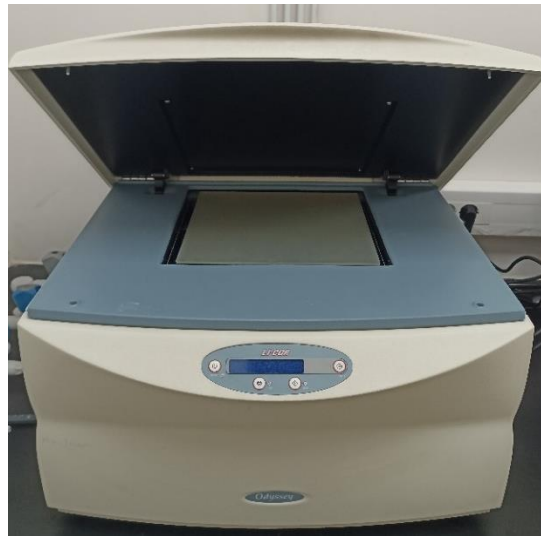
**Şekil 13. Transfer sandviçi hazırlanması**

(Mini-PROTEAN kit, Bio-Rad)

Transfer aşamasından sonra membran, %5 süt tozu içeren TBS-T solüsyonu içerisinde bloke edilmiştir. Bu işlemden sonra membran, TBS-T (1X) ile 15 dk. sonra bir ve sonrasında her 5 dk.'da bir olacak şekilde toplamda 30 dk. boyunca yıkanmıştır. Ardından, membran CSE ve CBS primer antikorum (1/250) ile 16 saat boyunca soğuk odada (+4°C) inkübe edilmiştir. Referans protein GAPDH'i görüntülemek için, membran GAPDH primer antikoru (1/1000) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Primer antikorum toplandıktan sonra, membran TBS-T (1X) ile 15 dk. sonra bir kez ve sonrasında her 5 dk.'da bir kez olacak şekilde toplamda 30 dk. boyunca yıkanmıştır. Ardından membran, iki farklı dalga boyundaki (680/800) IR boyları ile konjuge sekonder antikorum ile 1 saat oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edilmiştir. Sekonder antikorum toplandıktan sonra membran TBS-T (1X) ile 30 dk. boyunca yıkanmıştır (yukarıdakilerle aynı sayıda yıkama yapılarak). Li-COR cihazında (**Şekil 14**) infrared (IR) görüntüler alınmış ve bant yoğunlukları Odyssey V3.0 programı kullanılarak ölçülmüştür. Her bir örnek için ekspresyon düzeyleri, ilgili protein bandının gri alan yoğunluğunun (pixel intensity) GAPDH bandının yoğunluğuna oranlanmasıyla belirlenmiştir.

Western blot deneylerinde kullanılan tampon çözeltiler **Tablo 8**'de sunulmuştur.

Western blot deneylerinde kullanılan primer ve sekonder antikorum ve hazırlanışları **Tablo 9**'da belirtilmektedir.



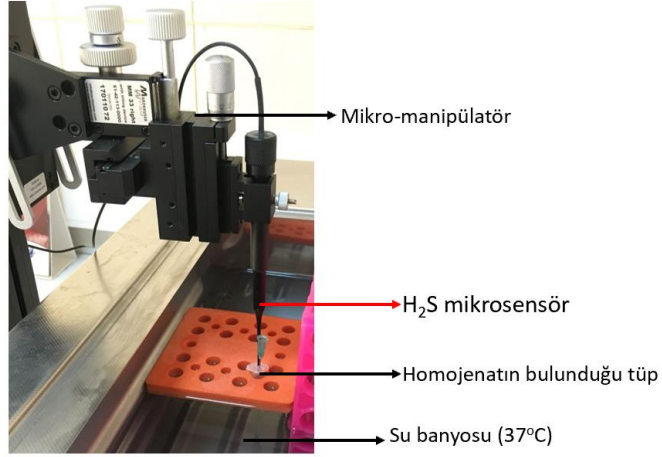
**Şekil 14. Li-COR IR görüntüleme cihazı**

### 3.2.1.7. Gerçek-zamanlı H<sub>2</sub>S üretiminin ölçülmesi

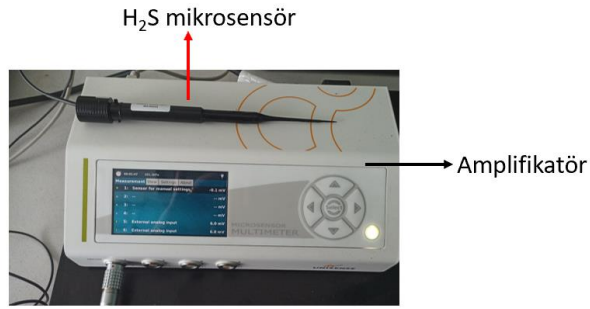
Ostolün FKK'de endojen H<sub>2</sub>S üretimini arttırıp arttırmadığı, Unisense Multimetre 2.02 amplifikatörüne bağlanan H<sub>2</sub>S mikrosensör (H<sub>2</sub>S-500LR, Unisense A/S, Aarhus, Danimarka) aracılığıyla gerçek zamanlı H<sub>2</sub>S üretimi ölçülerek araştırılmıştır. Sensör sıcaklığa duyarlı olduğundan tüm ölçümler 37°C'deki su banyosunda, kapalı bir tüpte gerçekleştirilmiştir (**Şekil 15**). Sensör, H<sub>2</sub>S gazının kısmi basıncını algılamakta ve sensörden gelen sinyal pikoamper (pA) olarak üretilmektedir. Amplifikatör ise (**Şekil 16**), sonuçları bir voltaj sinyaline dönüştürmektedir. H<sub>2</sub>S mikrosensörü, sinyal stabilize olana kadar her deneyden önce +0.085 V ile polarize edilmiştir. Mikrosensör, PBS içinde taze hazırlanmış Na<sub>2</sub>S çözeltileri (5-10-20-40-80 µM) ile kalibre edilmiş ve bu şekilde oluşturulan standart eğri kullanılarak H<sub>2</sub>S miktarı konsantrasyon olarak hesaplanmıştır.

30 dk. ostol inkübasyonunun değerlendirilmesi: Ostolün, H<sub>2</sub>S üretimi üzerindeki akut (30 dk.) etkisini değerlendirmek için; 25 µg protein içeren FKK homojenatlardaki H<sub>2</sub>S üretimi PBS (pH:7.4) içerisinde L-sistein (10 mM, 45 dk.) ve piridoksal 5-fosfat (PP, 2mM, 45 dk.) ile indüklenerek çözücü, ostol (EC<sub>50</sub>=20 µM ve EC<sub>maks</sub>=100 µM, 30 dk.) ve AOAA (10 mM, 45 dk.) varlığında/yokluğunda araştırılmıştır.

24 saat ostol inkübasyonunun değerlendirilmesi: Ostolün H<sub>2</sub>S sentezi üzerindeki kronik (24 saat) etkisini ve Western blot deneylerinden elde edilen bulguların aktiviteye yansıyor yansımadığını değerlendirmek amacıyla doku kültürü (+/- çözücü, ostol, 20 µM ve 100 µM) yapılan FKK homojenatlarında (25 µg protein), L-sistein (10 mM, 45 dk.) ile uyarılan H<sub>2</sub>S üretimi AOAA (10 mM, 45 dk.) varlığında/yokluğunda araştırılmıştır.



**Şekil 15. H<sub>2</sub>S mikrosensör sistemi**



**Şekil 16. Amplifikatör (Multimeter, Unisense) ve H<sub>2</sub>S mikrosensörü**

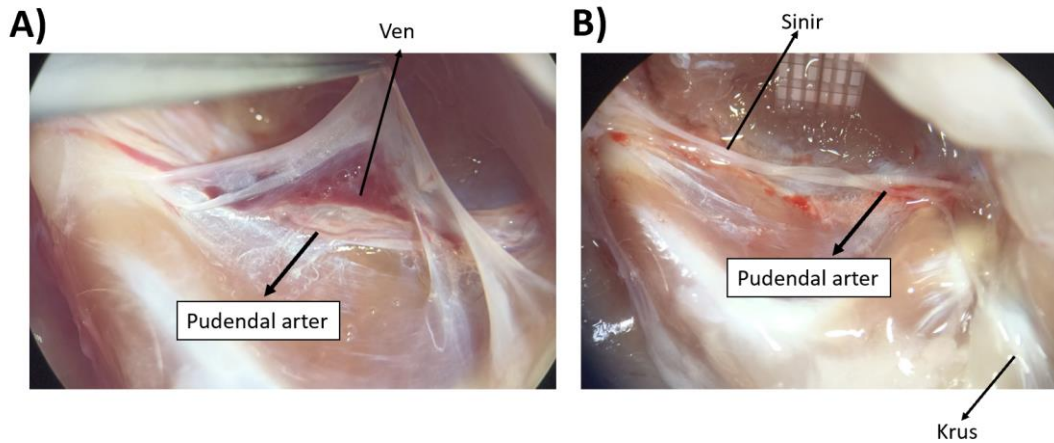
### 3.2.2. Sıçan pudendal arteriyle (SPA) yapılan deneyler

*Bu çalışmalar TÜBİTAK 2214-A projesi kapsamında Danimarka Aarhus Üniversitesi Biyotıp Anabilim Dalı'nda, Kardiyovasküler ve Pulmoner Farmakoloji Araştırma Laboratuvarında Prof. Ulf Simonsen danışmanlığında gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sırasında elde edilen veriler, LabChart programı kullanılarak kayıt altına alınmış ve analiz edilmiştir.*

### 3.2.2.1. Deney hayvanları ve pudendal arter izolasyonu

Erkek Wistar sıçanlar (12-14 hafta), CO<sub>2</sub> anestezisi altında servikal dislokasyon ile ötenazi edilmiştir. Aarhus Üniversitesi'ndeki 2214-A proje partneri, erkek sıçanlardan doku izolasyonu için etik kurul iznine sahiptir. İlk olarak sıçanın kalçası, kuyruk çıkarılarak soğuk PSS içerisine alınmıştır. Kalçadan mikroskop altında rektum çıkarılmış ve soğuk PSS eklenerek SPA'nın (**Şekil 17**) çevresindeki bağ/yağ dokular, venler, sinirler temizlenerek SPA izole edilmiştir. SPA mikroskop altında kesilerek 2 mm uzunluktaki segmentler elde edilmiştir.

Pudendal arter, korpus kavernozum gevşemelerinde dolayısıyla erektil fonksiyonda önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca SPA çapının (~400 µm), H<sub>2</sub>S mikrosensörünün arter lümenine yerleşebilecek kadar büyük olması nedeniyle tez kapsamında tercih edilmiştir.



**Şekil 17. Erkek sıçanın sol kalçasında bulunan pudendal arterin izole edilmeden önceki (A) ve izole edildikten sonraki (B) görüntüleri (mikroskop altında)**

### 3.2.2.2. H<sub>2</sub>S mikrosensörlerinin kalibrasyonu

H<sub>2</sub>S mikrosensörleri kullanılarak yapılan tüm deneyler, elektriksel değişikliklerden etkilenmemek ve elektriksel gürültüyü azaltmak için Faraday kafesi (**Şekil 18**) içerisinde gerçekleştirilmiştir.

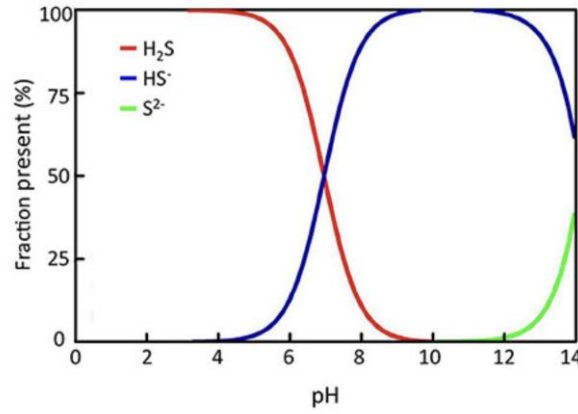


**Şekil 18. Faraday kafesi, kafesin içerisindeki H<sub>2</sub>S mikrosensörü takılı izole organ banyosu sistemi ve mikroskop**

H<sub>2</sub>S mikrosensörleri kullanılmadan önce sensör sinyali stabil hale gelene kadar Unisense pikoampermetre (PA2000) amplifikatörüne bağlanmış ve polarize edilmişlerdir (+200 mV). Ostol ve L-sistein yanıtları değerlendirirken nM düzeylerde olan endojen H<sub>2</sub>S üretiminin ölçülmesi hedeflendiği için, bu ölçekte ölçüm yapabilen bir SULF-H<sub>2</sub>S mikrosensörü lümen içine yerleştirilmek üzere satın alınmıştır. Na<sub>2</sub>S yanıtlarını değerlendirirken bir H<sub>2</sub>S donörü (ekzojen H<sub>2</sub>S) ile çalışıldığından, 20 nA aralığında (range) çalışılmış ve kalibrasyon eğrisi sırasıyla 10 µM, 20 µM, 30 µM, 50 µM, 100 µM ve 500 µM Na<sub>2</sub>S'e karşılık gelen nA sinyallerden oluşturulmuştur. Ostol ve L-sistein yanıtları alınırken endojen üretim araştırıldığından 2000 pA

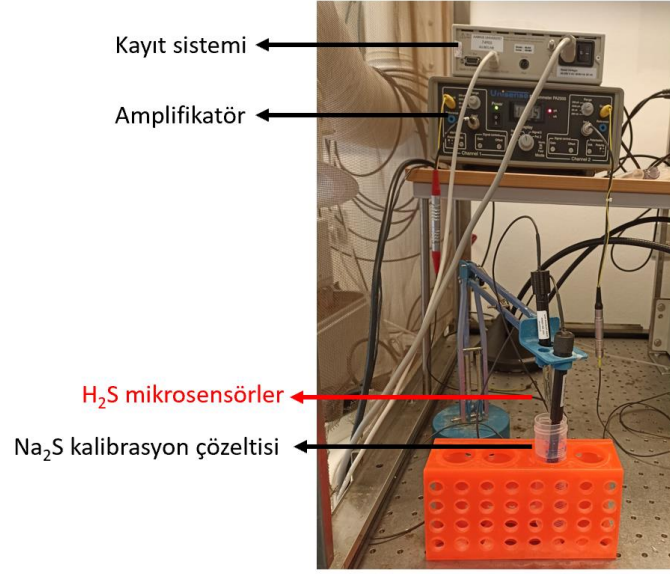
range'de çalışılmış ve 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM ve 500 nM Na<sub>2</sub>S'e karşılık gelen pA sinyaller ile kalibrasyon eğrileri çizilmiştir.

Tüpler, H<sub>2</sub>S düzeylerini tespit edebilmek amacıyla pH değeri 4'ün altına ayarlanmış (Şekil 19) ve N<sub>2</sub> ile gazlandırılmış 40 mL PSS ile doldurulmuş ve 37°C'ye ısıtılmıştır. 1 M Na<sub>2</sub>S çözeltisi PSS<sub>0.0</sub> içinde hazırlanmış ve PSS<sub>0.0</sub> ile 10 mM'a kadar seyreltilmiştir. Na<sub>2</sub>S çözeltileri, 10 mM Na<sub>2</sub>S çözeltiden hazırlanarak final konsantrasyonlara ulaştırılmıştır. Sensörler çözeltilere yerleştirilmiş ve sinyallerin stabil hale gelmesi beklenmiştir (Şekil 20). Her konsantrasyona karşı elde edilen pA (range=2000 pA) veya nA sinyalleri (range=20 nA) ile bir kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.



Şekil 19. Farklı pH değerlerindeki sülfür türlerinin oranı

(Holmer ve Hasler-Sheetal, 2014)



**Şekil 20. H<sub>2</sub>S mikrosensörlerin kalibrasyonu**

### **3.2.2.3. İzole organ banyosu ve H<sub>2</sub>S mikrosensör deneyleri**

#### **A. SPA'nın miyografa asılması ve stabilizasyonu**

İlk olarak, SPA segmentlerinin (2 mm); ostol, Na<sub>2</sub>S ve L-sistein tarafından uyarılan vasküler yanıtlarını incelemek ve bu ajanlar için gevşeme konsantrasyon aralığını belirlemek amacıyla, mikrosensör takılmayan iki kanallı standart miyograf kullanılarak bir dizi deney yapılmıştır. Bu deneyler sırasında segmentler, her biri 40 µm çapında iki adet paslanmaz çelik tel kullanılarak miyograflara asılmıştır.

Vasküler yanıtlarla eş zamanlı olarak H<sub>2</sub>S düzeylerinin ölçülmesi için ise, SPA segmenti, PSS içeren tek kanallı mikrosensör takılabilen miyografa, iki adet 100 µm paslanmaz çelik tel ile asılmıştır.

Arter segmenti, 30 dk. boyunca %5 CO<sub>2</sub>, %21 O<sub>2</sub> ve %74 N<sub>2</sub> ile gazlandırılarak stabilize edilmiştir.

Her arter segmentinin uygun ön gerilimini belirlemek için aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir:

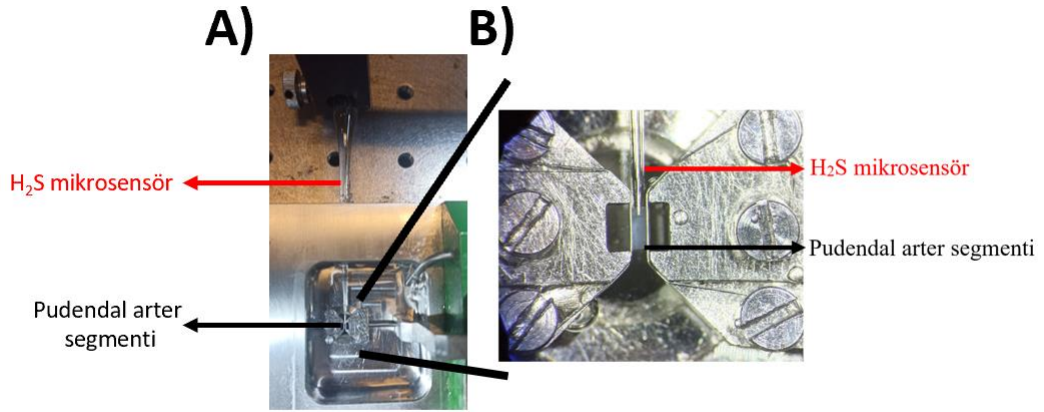
SPA segmentleri, LabChart yazılım programının normalizasyon modülü kullanılarak normalize edilmiştir. Özetle, teller neredeyse temas ettiğinde başlangıç mikrometre değeri ve kuvvet ölçümleri kaydedilmiş ve "sıfır duvar kuvveti" belirlenmiştir. Teller mikrometre kullanılarak birbirlerinden yavaşça uzaklaştırılmış (gerilim verilmiş) ve 1 dk. sonra, Mulvany ve Halpern yöntemi (Mulvany ve Halpern, 1977) takip edilerek transmural kuvveti hesaplamak için yeni ölçümler kaydedilmiştir. Bu işlem, basınç 100 mmHg (13.3 kPa)'yi aşana kadar tekrarlanmıştır. Damarın iç çevresi, duvar gerilimi elde etmek için grafiksel olarak çizilmiştir. Lümen çevresi (IC<sub>100</sub>), 100 mm Hg ile kesişim noktası olarak belirlenmiştir. IC<sub>1</sub>, IC<sub>100</sub>'ün %90'ı olarak hesaplanmış ve mikrometre buna göre ayarlanmıştır. Ardından arter segmentinin bu ön gerilimde 30 dk. boyunca stabilize olması sağlanmıştır.

#### **B. Pudental arterin endotel/düz kas fonksiyonunun değerlendirilmesi**

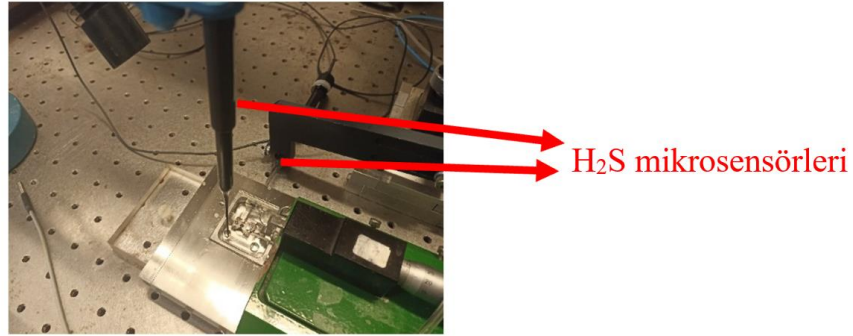
SPA segmentinin düz kas fonksiyonunu değerlendirmek amacıyla segment KPSS ile üç kez kastırılmıştır. Arter, fen ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) ile KPSS tarafından oluşturulan kasılmanın %70-80'ine eşit bir kasılma seviyesinde kastırılarak, tek doz asetilkolin (ACh, 10  $\mu$ M) gevşemesi alınmıştır. Arter segmentinin ACh'ye yanıtı, %80'den fazla ise, endotel sağlam kabul edilmiştir. Bu gevşeme yanıtına sahip olmayan arterler çalışmadan çıkartılmıştır. Damar segmenti daha sonra PSS ile yıkanmış ve diğer konsantrasyon-yanıt protokolleri için hazır hale getirilmiştir.

#### **C. H<sub>2</sub>S mikrosensörlerinin miyograf sistemine yerleştirilmesi**

H<sub>2</sub>S mikrosensörü dikkatlice mikromanipülatöre yerleştirilmiştir. Organ banyosunun (Miyograf) deliğini kaplayan kapak çıkarılmış ve SULF-H<sub>2</sub>S mikrosensörü mikromanipülatör kullanılarak organ banyosuna dikkatlice yerleştirilmiştir. Mikrosensörün, pudental arter lümeninin 1 mm içine yerleştirilmesi için mikroskop ve mikromanipülatör kullanılmıştır (**Şekil 21**). Diğer H<sub>2</sub>S mikrosensörü, ayarlanabilir bir elektrod tutucu kullanılarak organ banyosuna yerleştirilmiştir (**Şekil 22**). Organ banyosunun gazlandırılması, mikrosensörlerin sinyalini etkilememek için en düşük düzeyde tutulmuştur (Nielsen, Winther ve Simonsen, 2019).



**Şekil 21. SPA lümenine yerleştirilen H<sub>2</sub>S mikrosensörünün uzaktan (A) ve mikroskop altındaki (B) görüntüleri**



**Şekil 22. Miyografa yerleştirilen iki adet H<sub>2</sub>S mikrosensörünün görüntüsü**

#### **D. Konsantrasyon-yanıt protokolleri**

##### **D.1. Ostolün gevşetici etkisinde H<sub>2</sub>S'nin rolünün araştırılması**

İlk olarak, fen ile kastırılmış SPA'da çözücü/ostol ile ilişkili vasküler yanıtlar, kanal sayısını artırmak amacıyla standart wire (tel) miyograflar kullanılarak (mikrosensör takılmamış, iki adet 40 µm tel üzerine asılmış) araştırılmıştır. Ostol gevşemeleri, H<sub>2</sub>S sentez inhibitörü AOAA (2 mM ve 10 mM) varlığında tekrarlanmıştır. SPA'da ostolün gevşetici etkisine ilişkin EC<sub>50</sub> değeri 5 µM olarak hesaplanmış ve bu

konsantrasyon, sonraki protokollerde inkübasyon konsantrasyonu olarak kullanılmıştır. 5  $\mu$ M ostol varlığında/yokluğunda; Na<sub>2</sub>S ve L-sisteine verilen vasküler yanıtlar araştırılmış ve eş zamanlı olarak arter lümenindeki H<sub>2</sub>S seviyeleri ölçülmüştür.

H<sub>2</sub>S mikrosensörü takılmış miyografta, ostol ile gevşeme yanıtları alınırken, mikrosensörlerle damar lümenindeki ve organ banyosundaki H<sub>2</sub>S konsantrasyonu ölçülmüştür. Endojen H<sub>2</sub>S'nin çok düşük seviyelerde olması (nM düzeyde) nedeniyle organ banyosundaki H<sub>2</sub>S konsantrasyonunda önemli bir değişiklik tespit edilememiştir. Bu nedenle, sonraki protokollerde sadece arter içinde yerleştirilen H<sub>2</sub>S mikrosensörü kullanılmış ve özellikle ostolün arter içindeki endojen H<sub>2</sub>S üretimi üzerindeki etkisine odaklanılmıştır.

#### D.2. L-sistein yanıtlarının ve H<sub>2</sub>S seviyelerinin değerlendirilmesi

L-sisteinin gevşeme oluşturduğu konsantrasyon aralığını belirlemek için SPA, standart bir miyografa asılmış (mikrosensör olmadan) ve 1  $\mu$ M ila 100 mM aralığındaki konsantrasyonlarda yanıtlar alınmıştır. Gevşeme yanıtı 1 mM'ın üzerinde başladığı için H<sub>2</sub>S mikrosensör deneylerinde, Na<sub>2</sub>S'nin 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 20 mM ve 30 mM konsantrasyonlarda kümülatif olarak uygulanmasına karar verilmiştir. H<sub>2</sub>S mikrosensörü takılı miyografta, SPA segmenti fen ile kastırılmış ve kümülatif L-sistein (1 mM-30 mM) yanıtları alınmıştır. Böylece, arterin L-sisteine bağlı vasküler yanıtı ve damar lümenindeki H<sub>2</sub>S seviyeleri, çözücü/ostol varlığında/yokluğunda eş zamanlı olarak araştırılmıştır.

#### D.3. Pudental arter Na<sub>2</sub>S yanıtlarının ve H<sub>2</sub>S seviyelerinin değerlendirilmesi

SPA, standart miyograflara asılarak Na<sub>2</sub>S'in arteri gevşettiği konsantrasyon aralığı belirlenmiştir. Na<sub>2</sub>S'nin vasküler yanıtları  $10^{-6}$ – $3 \times 10^{-2}$  M ve  $10^{-5}$ – $3 \times 10^{-3}$  M olmak üzere iki farklı konsantrasyon aralığında alınmıştır. Kasılmaya neden olmadan yalnızca gevşeme yanıtı oluşturması nedeniyle mikrosensör deneyleri için Na<sub>2</sub>S'nin  $10^{-5}$  M ile  $3 \times 10^{-3}$  M arasındaki konsantrasyon aralığı, tercih edilmiştir.

H<sub>2</sub>S mikrosensör takılmış organ banyosunda, SPA fen ile kastırılmış ve ardından kümülatif olarak Na<sub>2</sub>S ( $10^{-5}$  M– $3 \times 10^{-3}$  M) uygulanmıştır. Arterden Na<sub>2</sub>S'ye bağlı vasküler yanıtlar alınırken, eş zamanlı olarak damar lümenindeki H<sub>2</sub>S seviyeleri, çözücü/ostol varlığında/yokluğunda ölçülmüştür.

#### D.4. Ostolün SPA'daki gevşetici etki mekanizmasını aydınlatmak için dahil edilen çalışmalar

Aşağıda listelenen inhibitörler varlığında fen ile kastırılmış SPA'dan, kümülatif ostol gevşemeleri alınmıştır:

- CSE enzim inhibitörü PAG (10 mM)
- PAG ve AOAA (her ikisi de 10 mM) kombinasyonu
- NO sentaz inhibitörü L-NAME (300 µM)
- BK<sub>Ca</sub> kanal inhibitörü iberitoksin (100 nM)
- KV<sub>7</sub> kanal inhibitörü linopirdin (10 µM)
- Ayrıca, ostolün potasyum kanalları üzerindeki etkisini değerlendirmek için 60 mM ve 125 mM KPSS ile kastırılmış SPA'dan ostol gevşeme yanıtları alınmıştır.

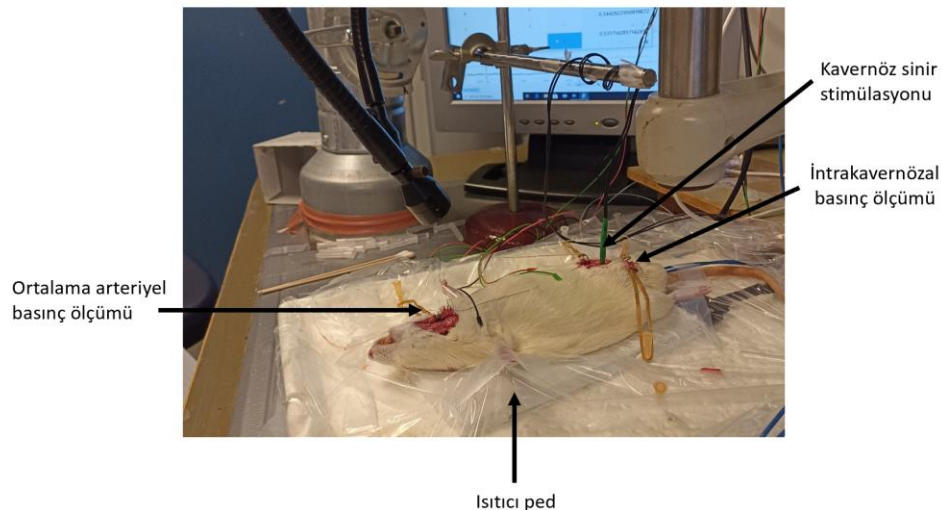
#### **3.2.3. *İn vivo* intrakavernözal basınç (İKB) ve ortalama arteriyel kan basıncı (OAB) ölçümü**

*Bu çalışmalar, TÜBİTAK 2214-A Projesi kapsamında ex vivo mikrosensör deneylerini gerçekleştirmek amacıyla gidilen Danimarka Aarhus Üniversitesi'nde yapılmıştır. Proje kapsamında elde edilen olumlu sonuçlar nedeniyle in vivo çalışmalara başlanmış ancak istatistiksel analiz için yeterli hayvan sayısına ulaşamadığından veriler orijinal traseler olarak sunulmuştur. Gerekli hayvan sayısına ulaşmak amacıyla deneyler devam etmektedir.*

10-12 haftalık Wistar sıçanlar intraperitoneal olarak pentobarbital (50 mg/kg) anestezisine alınmış ve vücut sıcaklıkları, sıçanların altına yerleştirilen ısıtıcı ped ile 37°C'de sabit tutulmuştur. İntrakavernözal basıncı (İKB) ölçmek için, penil dokular deri ve fasyadan ayrılmış, heparinize (100 IU/mL) edilen polietilen-50 kanüle takılan iğne (25 G) sol korpuse yerleştirilmiş ve kanül basınç transdüserine bağlanmıştır. Ortalama arteriyel basıncı (OAB) ölçmek için ise karotid artere yerleştirilen polietilen-50 kanül basınç transdüserine bağlanmıştır. Bazal İKB ve OAB kaydından önce 20-30 dk. boyunca stabilizasyon için beklenmiştir. OAB ve İKB'nin sürekli ölçümleri, karotide ve korpus kavernozauma yerleştirilen kanüllerin basınç dönüştürücü ve amplifikatöre bağlanması ile LabChart programı kullanılarak elde edilmiştir.

Kavernöz sinir, abdominal orta hatta bir kesi oluşturulmasının ardından, mesane ve prostat bölgesi üzerinde seyreden sinir ve gangliyon bulunarak izole edilmiştir. Elektriksel uyarım, S48 stimülatöre bağlı uç kısmı kıvrımlı bipolar platin elektrot ile gerçekleştirilmiştir. Kavernöz sinir, ilk olarak maksimum erektile yanıtı oluşturan elektriksel parametrelerle (30 saniye boyunca 6 Volt, 10 Hz, 1 ms'lik dalga darbeleri), benzer yanıt elde edilene kadar uyarılmıştır. Maksimum yanıtın %60-80'ine karşılık gelen erektile yanıtı oluşturan elektriksel parametreler (0.6-1.6 V) tespit edilmiş ve böylece submaksimal erektile yanıt elde edilmiştir. *İn vivo* OAB ve İKB ölçümü düzeneği **Şekil 23**'de sunulmuştur.

Ostol %55 PEG400 içerisinde çözülerek hazırlanmış (0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg) ve juguler ven kataterize edilerek infüzyon pompası ile (**Şekil 24**) 1 dakika boyunca uygulanmıştır. Ostolün erektile fonksiyon üzerinde bir etkisi olup olmadığını gözlemlemek için infüzyon sırasında OAB ve İKB kaydedilmiş ve ardından ostolün ereksiyona yardımcı olup olmadığını araştırmak için infüzyondan 3 dk., 10 dk., 15 dk. ve 20 dk. sonra submaksimal ve maksimal elektriksel stimülasyon yanıtları elde edilmiştir. Elektriksel stimülasyonla indüklenen her erektile yanıt için, maksimum (tepe) İKB (mmHg) / OAB (mmHg)  $\times$  100 oranı hesaplanmıştır (S. G. Comerma-Steffensen ve diğerleri, 2017).



**Şekil 23. *İn vivo* OAB ve İKB ölçümü düzeneği**



**Şekil 24. İnfüzyon pompası**

#### **3.2.4. İstatistiksel analiz**

İstatistiksel analiz ve sunulan tüm grafiklerin çizimi için GraphPad Prism programı kullanılmıştır. Verilerin tamamı ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası (SEM, standard error of the mean) olarak verilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar, Bonferroni post-hoc testi ile birlikte tek veya çift yönlü varyans analizi (ANOVA) ve iki ortalama arasındaki farkı karşılaştırmak için Student'ın  $t$  testi (eşleştirilmemiş) kullanılarak yapılmıştır.  $P$  değerleri 0.05'ten küçükse anlamlı olarak kabul edilmiştir. İzole organ banyosu deneylerinde, dokulardan alınan gevşeme yanıtları, maksimum ön-kasılma düzeyi %100 olarak kabul edildikten sonra, her bir gevşeme yanıtının maksimum kasılmadan farkı maksimum kasılma düzeyine yüzdelenerek hesaplanmıştır. Maksimum gevşeme yanıtının ( $E_{maks}$ ) yarısını oluşturan konsantrasyonun negatif logaritması nonlinear regresyon analizi yapılarak hesaplanmış ve  $-\log EC_{50}$  veya  $pD_2$  olarak ifade edilmiştir.

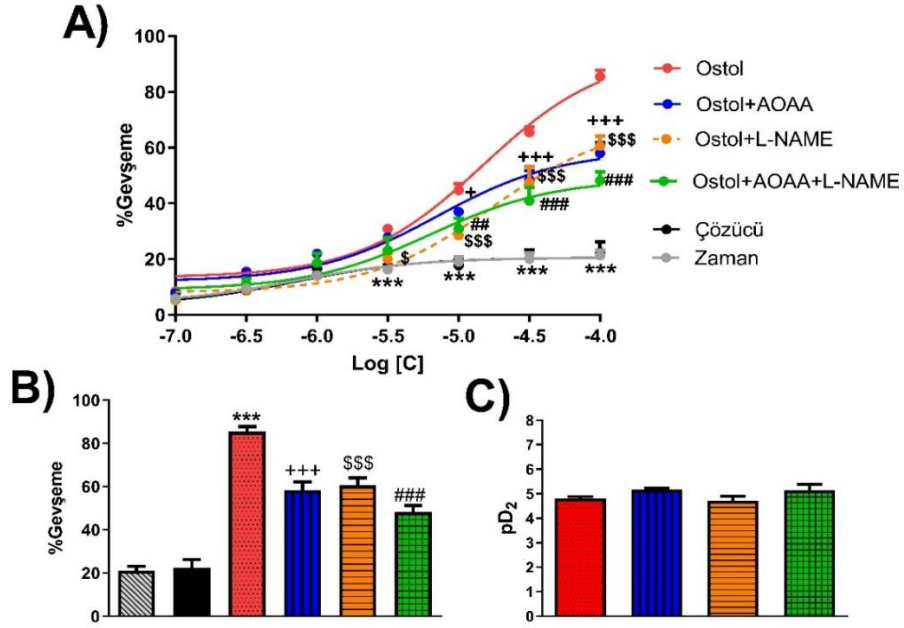
## 4. Bulgular

### 4.1. Fare korpus kavernozum (FKK) ile yapılan deneylerin sonuçları

#### 4.1.1. İzole organ banyosu deneyleri

##### 4.1.1.1. Ostolün gevşetici etkisinde H<sub>2</sub>S ve NO sentezinin rolü

Ostolün çözücüsü (DMSO-etanol-salin), FKK'nın zaman-kontrol yanıtları ile aynı yanıtları oluşturmuştur. Bu durum çözücünün, vasküler dokuda herhangi bir yanıtı neden olmadığını göstermektedir. Ostol, çözücü kontrole kıyasla anlamlı gevşeme yanıtları oluşturmuş ve bu gevşetici etki, H<sub>2</sub>S sentez inhibitörü AOAA (10 mM) ve NOS enzim inhibitörü L-NAME (100 µM) varlığında geri dönmüştür. Bu sonuçlar, ostolün FKK'yi gevşetici etkisinde hem H<sub>2</sub>S hem de NO üretiminin rol oynadığını göstermektedir (**Şekil 25**). AOAA ve L-NAME'in birlikte verilmesi ostol gevşeme yanıtlarını tamamen ortadan kaldırmamıştır. Bu durum, ostolün FKK'de H<sub>2</sub>S ve NO üretimi dışında farklı mekanizmalar üzerinden de gevşetici etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ostol gevşeme yanıtlarına ilişkin E<sub>maks</sub> değerleri, AOAA ve/veya L-NAME inkübasyonu ile azalırken; pD<sub>2</sub> değerleri ise değişmemiştir (**Tablo 15**). Ostolün FKK'deki EC<sub>50</sub> değeri 18 µM olarak hesaplanmış ve bu nedenle izleyen organ banyosu deney protokollerinde, **20 µM ostol inkübasyon** konsantrasyonu olarak seçilmiştir.



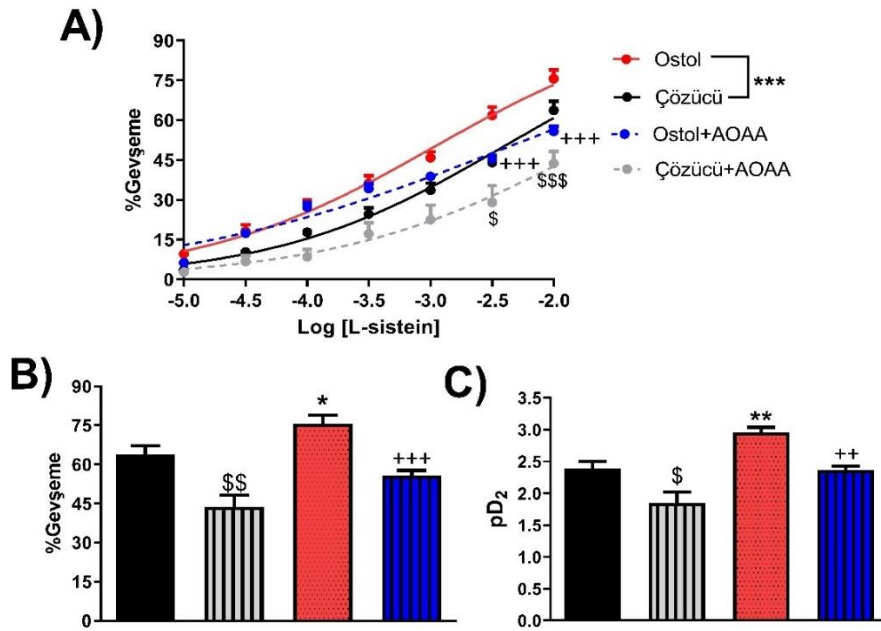
**Şekil 25.** Çözücünün ve ostolün, FKK'de AOAA ve/veya L-NAME varlığında/yokluğunda, oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşemelerin (A),  $E_{maks}$ 'ın (B) ve  $pD_2$  değerlerinin (C) grafikleri.

Ostol, fen ile kastırılmış FKK'de konsantrasyona bağlı gevşetici etki oluşturmuştur. Bu gevşeme, AOAA ve/veya L-NAME ile geri çevrilmiştir. \*\*\* $P < 0.001$ , çözücü ile ostol; \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , ostol ile ostol+AOAA; \$ $P < 0.05$ , \$\$\$ $P < 0.001$ , ostol ile ostol+L-NAME; ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , ostol ile ostol+AOAA+L-NAME, Tek-Yönlü ( $E_{maks}$  ve  $pD_2$ ) ve İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Zaman, n=9; çözücü, n=9; ostol, n=13; ostol+AOAA, n=9; ostol+L-NAME, n=6; ostol+AOAA+L-NAME, n=6.

**Tablo 15.** Çözücünün ve ostolün, FKK'de AOAA ve/veya L-NAME varlığında/yokluğunda oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerleri

| Çözücü/Ostol                                         | $E_{maks}$ | $pD_2$    |
|------------------------------------------------------|------------|-----------|
| Çözücü                                               | 22.40±3.81 |           |
| Ostol                                                | 85.46±2.30 | 4.81±0.08 |
| Ostol+AOAA                                           | 58.35±3.83 | 5.17±0.07 |
| Ostol+L-NAME                                         | 60.59±3.43 | 4.72±0.17 |
| Ostol+AOAA+L-NAME                                    | 48.20±3.12 | 5.15±0.24 |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |            |           |

**L-sistein gevşeme yanıtları**, ostol (20  $\mu$ M, 15 dk.) varlığında çözücüye kıyasla artmıştır. AOAA (10 mM, 30 dk.) inkübasyonu hem çözücü hem de ostol varlığında oluşan L-sistein gevşeme yanıtlarını inhibe etmiştir (**Şekil 26**). Ostol, L-sistein gevşemelerine ilişkin  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerlerini arttırırken, bu değerler AOAA varlığında azalmıştır (**Şekil 26, Tablo 16**). Bu sonuçlar, farklı bir protokol ile ostolün gevşetici etkisinde  $H_2S$  sentezinin rol oynadığını kanıtlar niteliktedir. Özellikle ostol varlığında L-sistein gevşemelerine ilişkin  $pD_2$  değerinin artması, ostolün  $H_2S$  üretiminden sorumlu enzimleri L-sisteine duyarlı hale getirdiğini ortaya koymaktadır.



**Şekil 26.** L-sisteinin, FKK'de çözücü, ostol ve/veya AOAA varlığında oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A),  $E_{maks}$ 'ın (B) ve  $pD_2$  değerlerinin grafikleri.

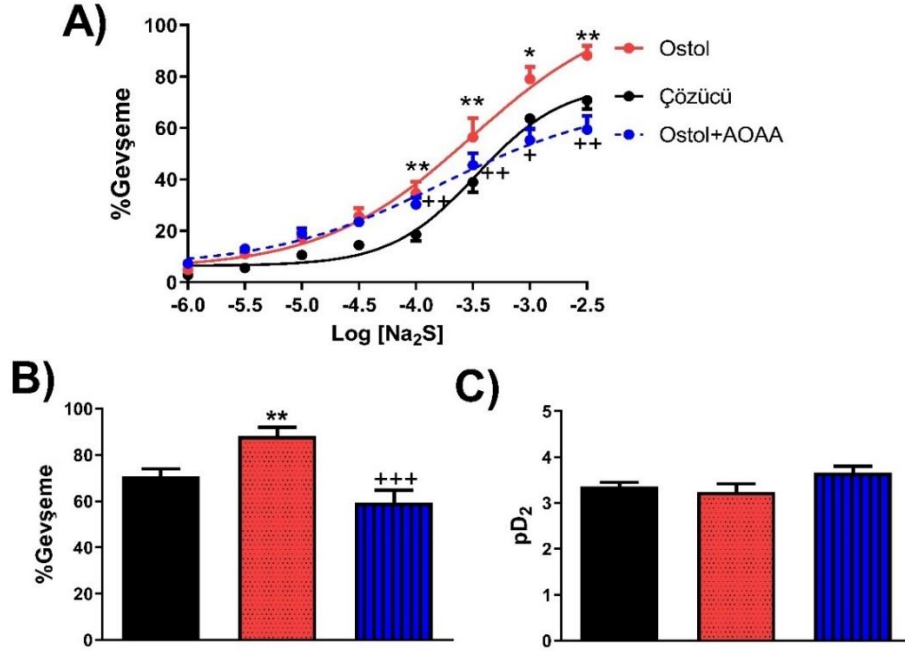
Ostol (20  $\mu$ M), fen ile kastırılmış FKK'de, L-sistein gevşeme yanıtlarını arttırmış, AOAA bu artışı inhibe etmiştir. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , çözücü ile ostol; ++ $P < 0.01$ , +++ $P < 0.001$ , ostol ile ostol+AOAA; \$ $P < 0.05$ , \$\$ $P < 0.01$ , \$\$\$ $P < 0.001$ , çözücü ile çözücü+AOAA; Tek-Yönlü ( $E_{maks}$  ve  $pD_2$ ) ve İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Çözücü, n=7; ostol, n=9; çözücü+AOAA, n=6; ostol+AOAA, n=8.

**Tablo 16. L-sisteinin, FKK’de çözücü, ostol ve/veya AOAA varlığında oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerleri.**

| <b>L-sistein</b>                                     | <b><math>E_{maks}</math></b> | <b><math>pD_2</math></b> |
|------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Çözücü                                               | 63.70±3.45                   | 2.39±0.11                |
| Ostol                                                | 75.62±3.31                   | 2.96±0.08                |
| Çözücü+AOAA                                          | 43.77±4.45                   | 1.86±0.17                |
| Ostol+AOAA                                           | 55.83±1.90                   | 2.37±0.07                |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |                              |                          |

#### **4.1.1.2. Ostolün gevşetici etkisinde $H_2S$ alt mekanizmalarının rolü**

**$H_2S$  donörü  $Na_2S$ ’e bağlı gevşeme yanıtları**, ostol (20  $\mu M$ , 15 dk.) varlığında çözücüye kıyasla artmıştır. AOAA (10 mM, 30 dk.) inkübasyonu, ostol varlığında artan  $Na_2S$  gevşemelerini azaltmıştır (**Şekil 27**).  $Na_2S$ ’e bağlı gevşeme yanıtlarında görülen istatistiksel anlamlılıklar,  $E_{maks}$  değerlerine yansımış, ancak  $pD_2$  değerlerine yansımamıştır (**Şekil 27, Tablo 17**). Bu sonuçlar, ostolün; endojen  $H_2S$  sentezini arttırarak, ekzojen  $H_2S$ ’nin,  $K^+$  kanal aktivasyonu, sGC aktivasyonu, PDE-5 inhibisyonu gibi alt mekanizmalar üzerinden gösterdiği etkiyi güçlendirdiğini ortaya koymaktadır.

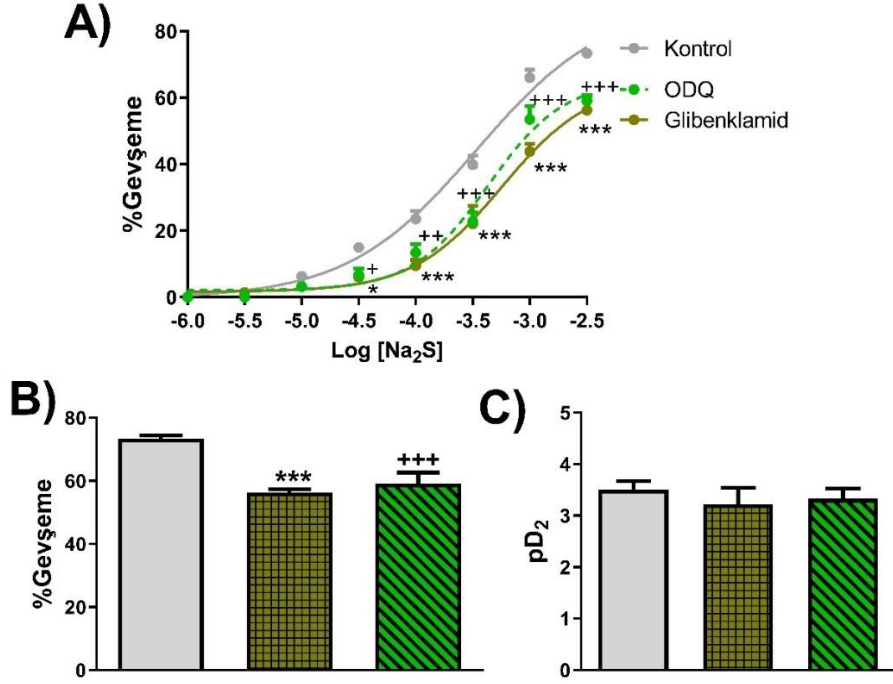


**Şekil 27.** Na<sub>2</sub>S'nin, FKK'de çözücü, ostol ve ostol+AOAA varlığında oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E<sub>maks</sub>'ın (B) ve pD<sub>2</sub> değerlerinin grafikleri.

Ostol, fen ile kastırılan FKK'de Na<sub>2</sub>S gevşeme yanıtlarını arttırmış, bu artış AOAA varlığında geri dönmüştür. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 çözücü ile ostol; +*P*<0.05, ++*P*<0.01, +++*P*<0.001, ostol ile ostol+AOAA; Tek-Yönlü (E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub>) ve İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Çözücü, n=10; ostol, n=10; AOAA+ostol, n=6.

**H<sub>2</sub>S'nin gevşetici etkisinden sorumlu alt mekanizmalardan olan K<sub>ATP</sub> kanal aktivasyonunun ve sGC enzim aktivasyonunun, ostol gevşemeleri ile ilişkisi araştırılmıştır.**

Ancak literatürde, K<sub>ATP</sub> kanallarının ve sGC enziminin, H<sub>2</sub>S gevşemelerine katkısıyla ilişkili dokuya spesifik değişebilen çelişkili sonuçlar yer aldığından; ilk olarak bu alt mekanizmaların FKK'de H<sub>2</sub>S gevşemeleri ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla K<sub>ATP</sub> kanal inhibitörü glibenklamid (10 µM, 30 dk.) ve sGC inhibitörü ODQ (10 µM, 30 dk.) varlığında Na<sub>2</sub>S gevşeme yanıtları tekrarlanmıştır. Glibenklamid ve ODQ, Na<sub>2</sub>S'e bağlı gevşemeleri inhibe etmiştir. Maksimum Na<sub>2</sub>S gevşemeleri, glibenklamid varlığında %23.41 ve ODQ varlığında %24.9 oranında azalırken; inhibitörler, Na<sub>2</sub>S gevşemelerine ilişkin pD<sub>2</sub> değerlerini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir miktar azaltmıştır (**Şekil 28, Tablo 17**). Sonuç olarak, H<sub>2</sub>S'nin FKK'de oluşturduğu gevşetici etkide K<sub>ATP</sub> ve sGC aktivasyonunun benzer oranda rol oynadığı anlaşılmaktadır.



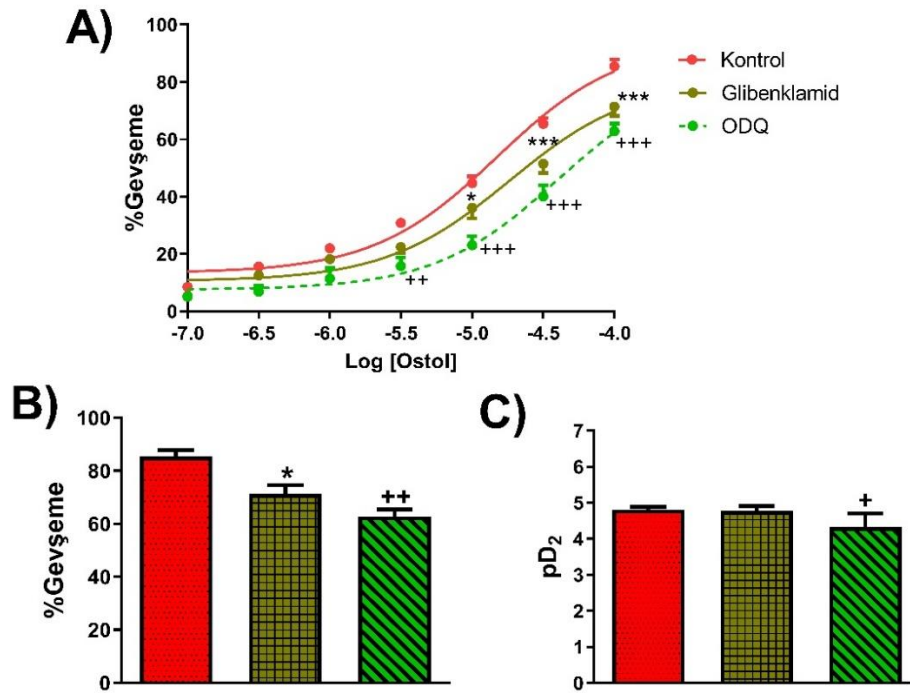
**Şekil 28.** Na<sub>2</sub>S'in, FKK'de glibenklamid ve ODQ varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E<sub>maks</sub>'ın (B) ve pD<sub>2</sub> değerlerinin grafikleri.

Glibenklamid ve ODQ, fen ile kastırılan FKK'de, Na<sub>2</sub>S'e bağlı gevşeme yanıtlarını inhibe etmiştir. \**P*<0.05, \*\*\**P*<0.001 kontrol ile glibenklamid; +*P*<0.05, ++*P*<0.01, +++*P*<0.001, kontrol ile ODQ, Tek-Yönlü (E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub>) ve İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Her biri için, n=5.

**Tablo 17.** Na<sub>2</sub>S'in, FKK'de çözücü, ostol ve inhibitörler varlığında oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub> değerleri

| Na <sub>2</sub> S                                    | E <sub>maks</sub> | pD <sub>2</sub> |
|------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|
| Çözücü                                               | 70.78±3.30        | 3.36±0.09       |
| Ostol                                                | 88.17±3.81        | 3.24±0.18       |
| Ostol+AOAA                                           | 59.41±5.31        | 3.66±0.14       |
| Kontrol                                              | 73.38±0.99        | 3.50±0.06       |
| Glibenklamid                                         | 56.20±1.10        | 3.22±0.16       |
| ODQ                                                  | 59.09±1.60        | 3.33±0.09       |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |                   |                 |

**K<sub>ATP</sub> kanal aktivasyonunun ve sGC enzim aktivasyonunun, ostol gevşemeleri ile ilişkisini araştırmak amacıyla; FKK'den glibenklamid ve ODQ varlığında/yokluğunda ostol gevşemeleri alınmıştır.** Konsantrasyona bağlı ostol gevşeme yanıtları, glibenklamid ve ODQ varlığında inhibe olmuştur. Maksimum ostol gevşemeleri glibenklamid varlığında %16.44, ODQ varlığında ise %26.5 oranında azalmıştır. Ostol gevşeme yanıtlarına ilişkin pD<sub>2</sub> değerlerinin, glibenklamid varlığında değişmemesi ve ODQ varlığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalması dikkat çekmektedir (**Şekil 29, Tablo 18**). Bu sonuçlar, ostolün H<sub>2</sub>S aracılığıyla K<sub>ATP</sub> kanallarını ve sGC'yi aktive edebileceğini düşündürmektedir.



**Şekil 29. Ostolün, FKK'de glibenklamid ve ODQ varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E<sub>maks</sub>'ın (B) ve pD<sub>2</sub> değerlerinin grafikleri.**

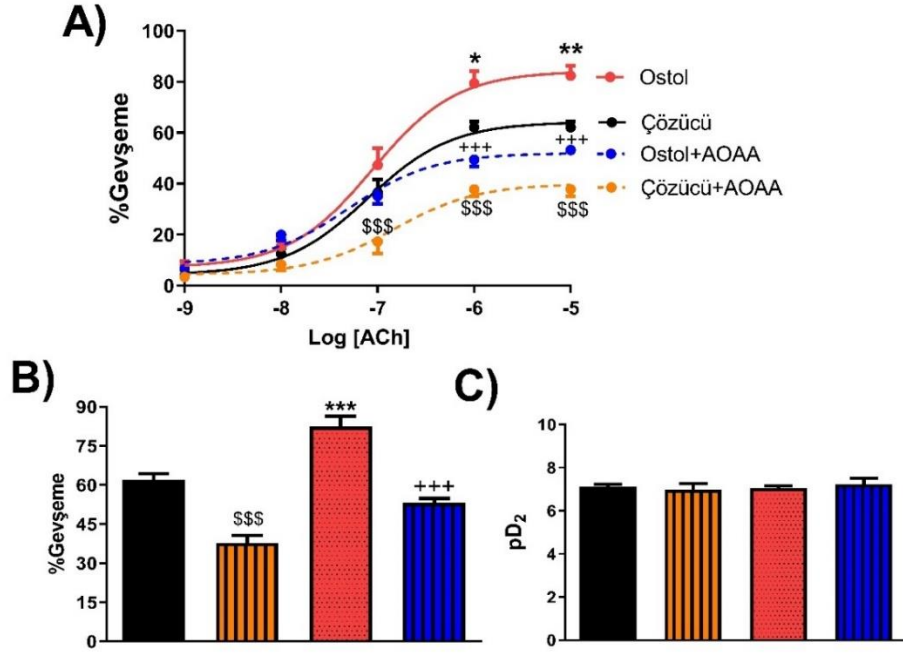
Glibenklamid ve ODQ varlığında, fen ile kastırılan FKK'de ostole bağlı gevşeme yanıtları inhibe olmuştur. \**P*<0.05, \*\*\**P*<0.001 kontrol ile glibenklamid; +*P*<0.05, ++*P*<0.01, +++*P*<0.001, kontrol ile ODQ, Tek-Yönlü (E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub>) ve İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Kontrol, n=10; glibenklamid, n=7; ODQ, n=4.

**Tablo 18. Ostolün, FKK’de glibenklamid ve ODQ varlığında/yokluğunda oluşturduğu gevşemelere ilişkin E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub> değerleri.**

| <b>Ostol</b>                                         | <b>E<sub>maks</sub></b> | <b>pD<sub>2</sub></b> |
|------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Kontrol                                              | 85.46±2.30              | 4.81±0.08             |
| Glibenklamid                                         | 71.41±3.25              | 4.77±0.14             |
| ODQ                                                  | 62.82±2.67              | 4.33±0.19             |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |                         |                       |

#### **4.1.1.3. Ostolün NO ile ilişkili gevşetici etkisinde H<sub>2</sub>S’nin rolü**

**ACh gevşeme yanıtları**, ostol varlığında (20 µM, 15 dk.) çözücüye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak artmıştır. AOAA (10 mM, 30 dk.) inkübasyonu, ostol ve çözücü varlığında alınan ACh gevşemelerini azaltmıştır. ACh gevşeme yanıtlarında görülen istatistiksel anlamlılıklar, E<sub>maks</sub>’a yansırken pD<sub>2</sub> değerleri değişmemiştir (**Şekil 30, Tablo 19**). Bu sonuçlar, fare penil dokusundaki endojen H<sub>2</sub>S üretiminin, NO aracılı gevşemelere katkı sağladığını göstermektedir. Ayrıca ostolün NO üzerinden gösterdiği gevşemelerde, H<sub>2</sub>S sentezini arttırmasının rol oynadığını ortaya koymaktadır.



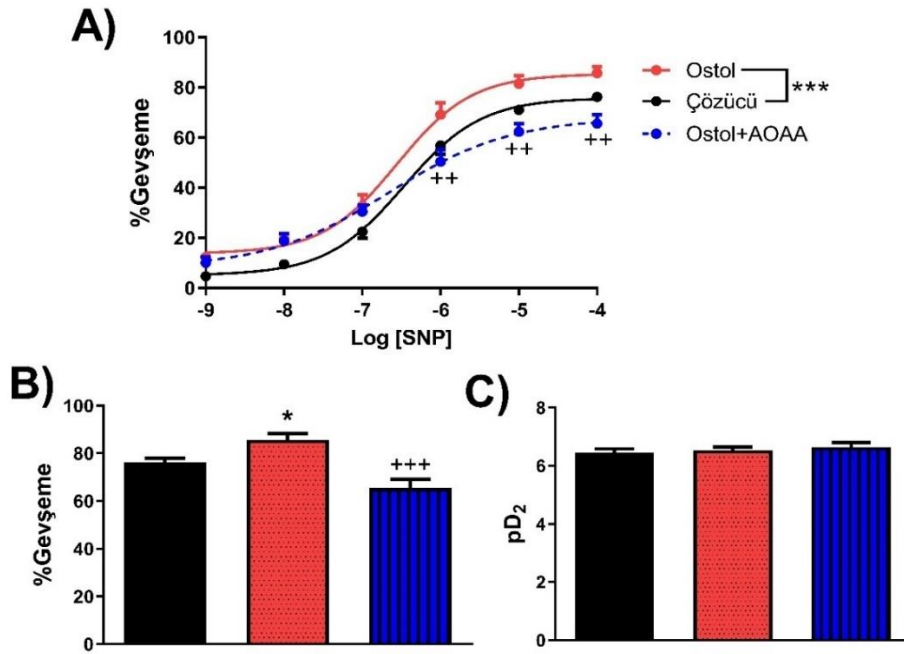
**Şekil 30.** ACh'nin, FKK'de çözücü, ostol ve AOAA varlığında oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A),  $E_{maks}$ 'ın (B) ve  $pD_2$  değerlerinin grafikleri.

Ostol, fen ile kastırılmış FKK'de ACh gevşeme yanıtlarını arttırmış, bu artış AOAA varlığında geri dönmüştür. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  çözücü ile ostol; +++ $P < 0.001$ , ostol ile ostol+AOAA; \$\$\$ $P < 0.001$ , çözücü ile çözücü+AOAA; Tek-Yönlü ( $E_{maks}$  ve  $pD_2$ ) ve İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Çözücü,  $n=4$ ; ostol,  $n=5$ ; çözücü+AOAA,  $n=4$ ; ostol+AOAA,  $n=6$ .

**Tablo 19.** ACh'nin, FKK'de çözücü, ostol ve AOAA varlığında oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerleri.

| ACh                                                  | $E_{maks}$ | $pD_2$     |
|------------------------------------------------------|------------|------------|
| Çözücü                                               | 62.12±2.20 | 7.11±0.13  |
| Ostol                                                | 82.40±3.99 | 7.043±0.12 |
| Çözücü+AOAA                                          | 37.80±2.86 | 6.969±0.30 |
| Ostol+AOAA                                           | 53.20±1.57 | 7.22±0.28  |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |            |            |

**Ostol (20  $\mu$ M, 15 dk.), NO donörü SNP'ye bağılı gevşeme yanıtlarını çözücüve kıyasla arttırmıştır.** AOAA (10 mM, 30 dk.) inkübasyonu, ostol varlığında artan SNP gevşemelerini azaltmıştır. Bu sonuç,  $E_{maks}$  değerlerine yansırken,  $pD_2$  değerlerine yansımamıştır (**Şekil 31, Tablo 20**). Ostolün SNP gevşemelerini arttırması, NO alt mekanizmaları üzerinden (sGC aktivasyonu, PDE inhibisyonu gibi) gevşetici etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ostol varlığında artan bu yanıtların AOAA ile geri dönmesi ise ostolün bu mekanizmaları  $H_2S$  sentezini arttırarak etkilediğini göstermektedir.



**Şekil 31. SNP'nin, FKK'de çözücü, ostol, AOAA varlığında oluşturduğu konsantrasyona bağılı gevşeme yanıtlarının (A),  $E_{maks}$ 'ın (B) ve  $pD_2$  değerlerinin grafikleri.**

Ostol, fen ile kastırılan FKK'de SNP gevşeme yanıtlarını arttırmış, bu artış AOAA varlığında geri dönmüştür. \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$  çözücü ile ostol; ++ $P<0.01$ , +++ $P<0.001$  ostol ile ostol+AOAA; Tek-Yönlü ( $E_{maks}$  ve  $pD_2$ ) ve İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Çözücü,  $n=10$ ; ostol,  $n=9$ ; AOAA+ostol,  $n=6$ .

**Tablo 20. SNP'nin, FKK'de çözücü, ostol ve AOAA varlığında oluşturduğu gevşemelere ilişkin  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerleri.**

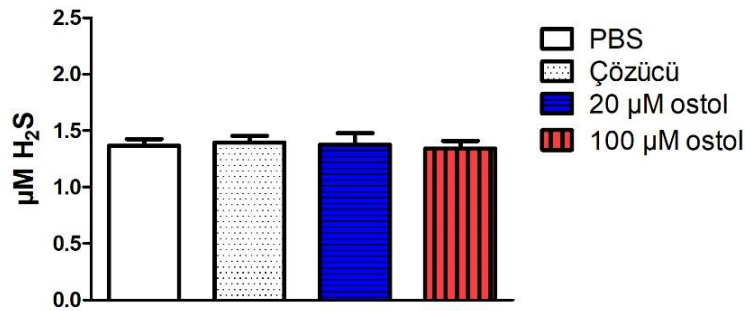
| SNP                                                  | $E_{maks}$ | $pD_2$    |
|------------------------------------------------------|------------|-----------|
| Çözücü                                               | 76.23±1.80 | 6.46±0.13 |
| Ostol                                                | 85.72±2.63 | 6.54±0.11 |
| Ostol+AOAA                                           | 65.54±3.52 | 6.65±0.16 |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |            |           |

#### 4.1.2. Gerçek-zamanlı $H_2S$ üretiminin ölçülmesi

Bu kapsamda yapılan deneylerde, yöntem kısmında da belirtildiği gibi FKK homojenatlarının **30 dk.** (akut etki) ve FKK dokularının **24 saat** (doku kültürü, kronik etki) ostol ile inkübasyonlarının  $H_2S$  düzeyleri üzerindeki etkisi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bu başlık altında ostolün akut etkisinin bulguları yer almaktadır.

Ostol (20  $\mu M$  ve 100  $\mu M$ , 30 dk.), PBS içerisinde homojenat yokken ve L-sistein ile uyarılmayan bazal koşullarda  $H_2S$  düzeylerini değiştirmemiştir (**Tablo 21, Şekil 32, Şekil 33**). Bu sonuçlar, ostolün  $H_2S$  donörü olmadığını göstermektedir.

Homojenatların 20  $\mu M$  ostol ve 100  $\mu M$  ostol ile 30 dk. inkübasyonu, çözücüye kıyasla L-sisteine (10 mM) bağlı  $H_2S$  üretimini anlamlı olarak arttırmıştır. AOAA (10 mM); çözücü, 20  $\mu M$  ostol ve 100  $\mu M$  ostol varlığında elde edilen  $H_2S$  üretimini inhibe etmiştir (**Tablo 21, Şekil 33**).



**Şekil 32. PBS içerisinde (homojenatsız ortamda) çözücünün ve ostolün maksimum  $H_2S$  düzeylerine etkileri.**

Çözücü ve ostol (20  $\mu M$  ve 100  $\mu M$ ), homojenatsız koşullarda  $H_2S$  düzeylerini değiştirmemiştir.

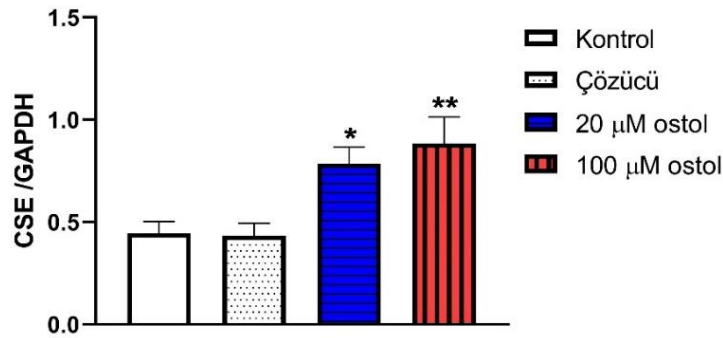


**Tablo 21. PBS (homojenatsız), bazal ve L-sistein ile uyarılmış ortamlarda; çözücünün ve ostolün, AOAA varlığında/yokluğunda maksimum H<sub>2</sub>S düzeyleri (E<sub>maks</sub>) ve reaksiyon hızı (eğim) üzerindeki etkilerine ilişkin değerler**

|                                                      |                     | E <sub>maks</sub><br>(μM H <sub>2</sub> S) | Eğim<br>(μM H <sub>2</sub> S /dk.) | N  |
|------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|----|
| <b>PBS</b>                                           | <b>PBS</b>          | 1.37±0.06                                  |                                    | 15 |
|                                                      | <b>Çözücü</b>       | 1.40±0.06                                  |                                    | 9  |
|                                                      | <b>100 μM ostol</b> | 1.34±0.07                                  |                                    | 7  |
|                                                      | <b>20 μM ostol</b>  | 1.38±0.10                                  |                                    | 6  |
| <b>BAZAL</b>                                         | <b>Çözücü</b>       | 1.27±0.14                                  |                                    | 10 |
|                                                      | <b>20 μM ostol</b>  | 1.52±0.13                                  |                                    | 4  |
|                                                      | <b>100 μM ostol</b> | 1.43±0.21                                  |                                    | 6  |
| <b>L-SİSTEİN</b>                                     | <b>Çözücü</b>       | 32.85±1.64                                 | 0.68±0.03                          | 13 |
|                                                      | <b>20 μM ostol</b>  | 43.76±3.58                                 | 0.96±0.06                          | 6  |
|                                                      | <b>100 μM ostol</b> | 45.94±3.71                                 | 0.96±0.07                          | 8  |
| <b>L-SİSTEİN<br/>AOAA</b>                            | <b>Çözücü</b>       | 15.64±0.8                                  | -0.51±0.04                         | 12 |
|                                                      | <b>20 μM ostol</b>  | 17.07±1.64                                 | -0.63±0.06                         | 6  |
|                                                      | <b>100 μM ostol</b> | 19.39±1.61                                 | -0.68±0.08                         | 8  |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |                     |                                            |                                    |    |

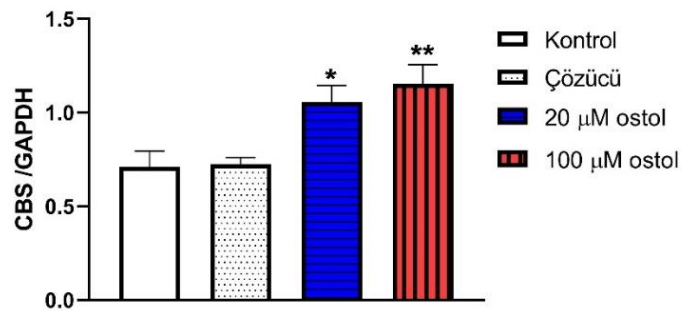
#### 4.1.3. Western blot deneyleri

FKK'nin, 20  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M ostol ile 24 saat inkübasyonu (37°C, doku kültürü), H<sub>2</sub>S üretiminden sorumlu enzimler olan CSE (Şekil 34, Şekil 36) ve CBS (Şekil 35, Şekil 36) proteinlerinin ekspresyonunu kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Çözücü inkübasyonu ise CSE ve CBS enzimlerinin ekspresyonunu değiştirmemiştir.



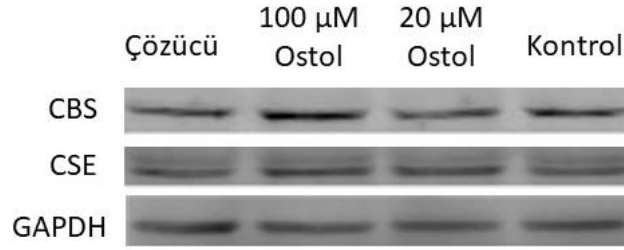
**Şekil 34. FKK'de çözücünün/ostolün CSE enzim ekspresyonu üzerindeki etkisi**

20  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M ostol FKK'de CSE enzim ekspresyonunu arttırmıştır. Çözücünün, CSE enziminin ekspresyonu üzerinde bir etkisi yoktur. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, kontrol ile karşılaştırmalar, Tek-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Kontrol, n=7; çözücü, n=7; 20  $\mu$ M ostol, n=8; 100  $\mu$ M ostol, n=6.



**Şekil 35. FKK'de çözücünün/ostolün CBS enzim ekspresyonu üzerindeki etkisi**

20  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M ostol, FKK'de CBS enzim ekspresyonunu arttırmıştır. Çözücü, CBS enzim ekspresyonunu değiştirmemiştir. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, kontrol ile karşılaştırmalar, Tek-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Kontrol, n=9; çözücü, n=8; 20  $\mu$ M ostol, n=6; 100  $\mu$ M ostol, n=5.



**Şekil 36. Çözücü/ostol uygulanmış ve kontrol FKK dokularına ait GAPDH, CSE ve CBS proteinlerinin temsili bant görüntüleri**

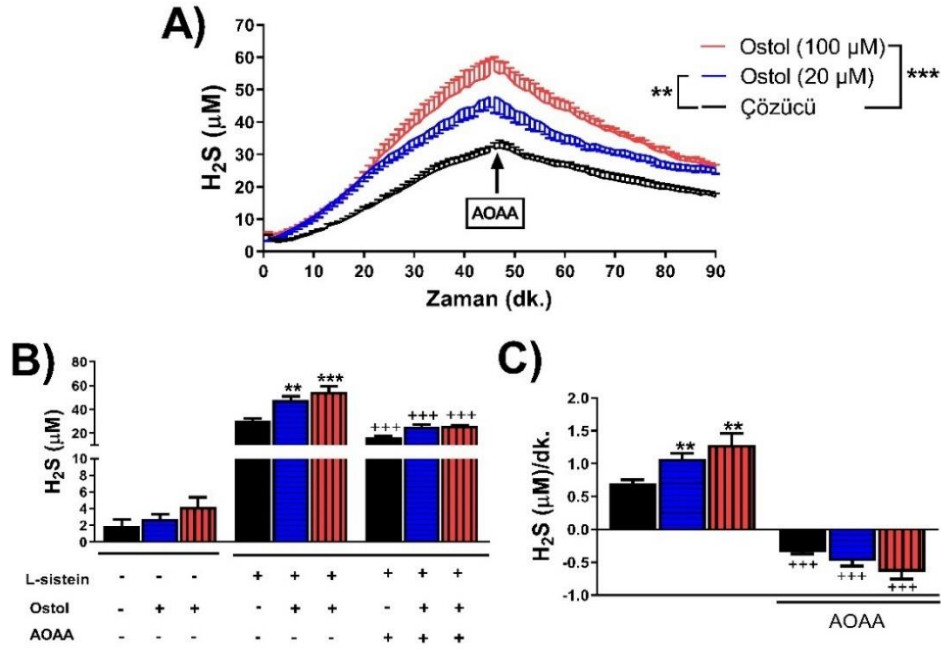
#### **4.1.4. Doku kültürü yapılan FKK'den elde edilen homojenatlarda gerçek-zamanlı H<sub>2</sub>S üretiminin ölçülmesi**

FKK'nin, 20 µM ve 100 µM ostol ile 24 saat inkübasyonu (37°C, doku kültürü), bazal koşullardaki H<sub>2</sub>S düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmemiştir. Ancak H<sub>2</sub>S düzeylerinin ostol konsantrasyonuna bağlı olarak bir miktar arttırdığı dikkat çekmekte ve sensörün ölçüm limitinin altında kalan bir artış olabileceğini düşündürmektedir (**Şekil 37, Tablo 22**).

Penil dokuların çözücü ile inkübasyonu, L-sistein (10 mM) ile uyarılan H<sub>2</sub>S üretimini değiştirmemiştir. 20 µM ostol ve 100 µM ostol, L-sisteine bağlı H<sub>2</sub>S üretimini anlamlı çözücüye kıyasla olarak arttırmıştır. AOAA (10 mM); çözücü, 20 µM ostol ve 100 µM ostol varlığında elde edilen H<sub>2</sub>S üretimini inhibe etmiştir (**Şekil 37, Tablo 22**).

Ostol ile 30 dk. inkübe edilen homojenatlardan elde edilen verilerle kıyaslandığında (**Tablo 21**), inkübasyon süresinin 24 saate çıkmasının (**Tablo 22**); L-sistein ile uyarılan H<sub>2</sub>S üretimini de paralel olarak arttığı dikkat çekmektedir.

Bu sonuçlar, Western blot deneylerinde, CSE ve CBS enzimlerinde ostol varlığında görülen ekspresyon artışının, bu enzimlerin aktivitesine yansıdığını ortaya koymaktadır.



**Şekil 37.** FKK'de, çözücünün ve ostolün, AOAA varlığında/yokluğunda, L-sistein ile uyarılmış zamana bağlı H<sub>2</sub>S üretimi (A), bazal/uyarılmış koşullarda maksimum H<sub>2</sub>S düzeyleri (B) ve H<sub>2</sub>S üretim hızı (eğim) (C) üzerindeki etkilerini gösteren grafikler.

Ostol her iki konsantrasyonda da (20 μM, 100 μM) L-sistein ile uyarılmış H<sub>2</sub>S üretimini arttırmıştır. Bu artış AOAA ile geri çevrilmiştir. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , çözücü ile karşılaştırmalar; +++ $P < 0.001$ , AOAA ile her birinin L-sistein grubunun karşılaştırılması; Tek-Yönlü ( $E_{maks}$  ve eğim) ve İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test.

**Tablo 22. PBS (homojenatsız), bazal ve L-sistein ile uyarılmış ortamlarda; çözücünün ve ostolün, AOAA varlığında/yokluğunda maksimum H<sub>2</sub>S düzeyleri (E<sub>maks</sub>) ve reaksiyon hızı (eğim) üzerindeki etkilerine ilişkin değerler.**

|                                                      |                     | E <sub>maks</sub><br>(μM H <sub>2</sub> S) | Eğim<br>(μM H <sub>2</sub> S/dk.) | N |
|------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|---|
| <b>BAZAL</b>                                         | <b>Çözücü</b>       | 1.96±0.7                                   |                                   | 7 |
|                                                      | <b>20 μM ostol</b>  | 2.76±0.6                                   |                                   | 7 |
|                                                      | <b>100 μM ostol</b> | 4.17±1.2                                   |                                   | 6 |
| <b>L-SİSTEİN</b>                                     | <b>Çözücü</b>       | 30.73±1.7                                  | 0.7±0.05                          | 5 |
|                                                      | <b>20 μM ostol</b>  | 47.82±3.3                                  | 1.08±0.08                         | 6 |
|                                                      | <b>100 μM ostol</b> | 54.52±5.0                                  | 1.29±0.2                          | 5 |
| <b>L-SİSTEİN<br/>AOAA</b>                            | <b>Çözücü</b>       | 16.9±1.0                                   | -0.34±0.02                        | 5 |
|                                                      | <b>20 μM ostol</b>  | 25.68±1.6                                  | -0.48±0.07                        | 6 |
|                                                      | <b>100 μM ostol</b> | 26.12±0.7                                  | -0.64±0.1                         | 5 |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |                     |                                            |                                   |   |

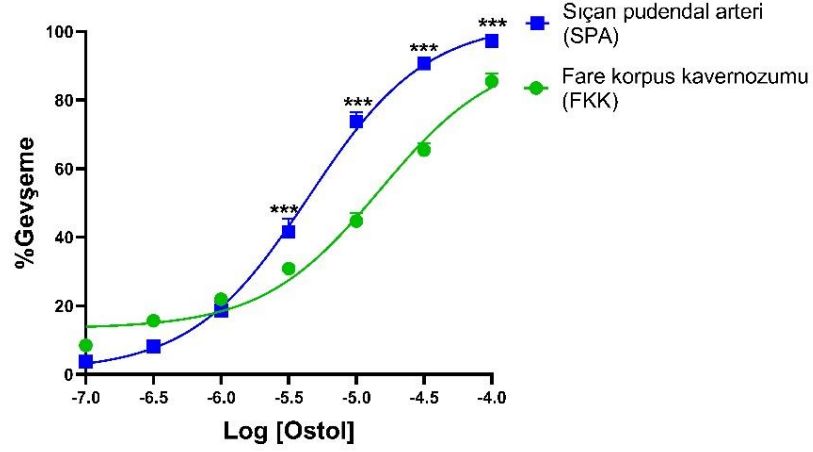
#### 4.2. Sıçan pudental arteri (SPA) ile yapılan deneylerin sonuçları

*Bu çalışmalar, TÜBİTAK 2214-A projesi kapsamında, Danimarka Aarhus Üniversitesi, Biyotıp Anabilim Dalı, Kardiyovasküler ve Pulmoner Farmakoloji Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.*

##### 4.2.1. Ostolün gevşetici etkisinde H<sub>2</sub>S'nin rolünün araştırılması

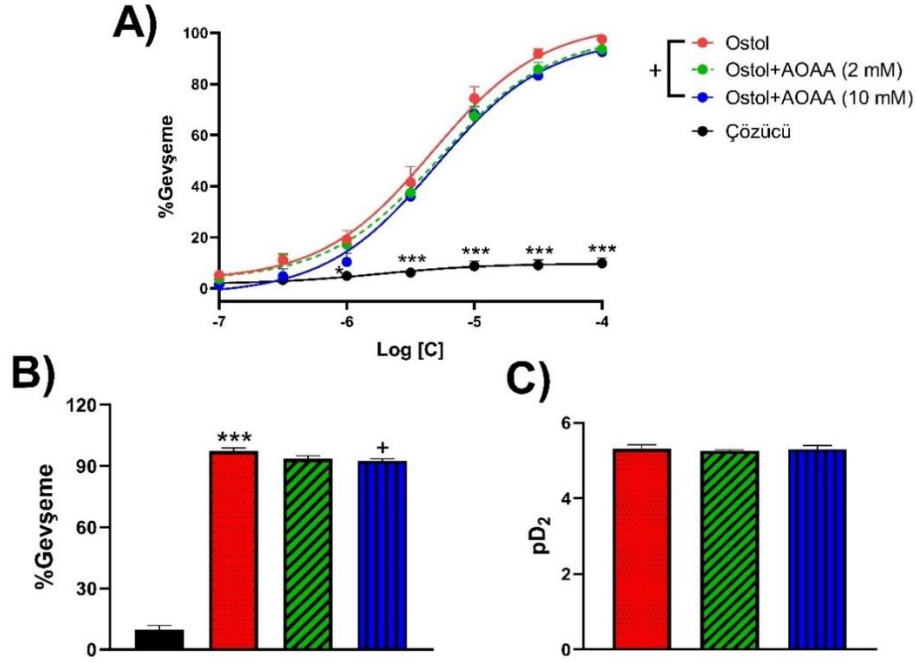
Çalışmamızda kullanılan SPA segmentlerinin çaplarının ortalaması, 516.1±10.80 μm olarak hesaplanmıştır.

Standart miyografa asılan SPA (40 μm teller ile asılan) ile yapılan çalışmalarda, ostol, çözücüye kıyasla konsantrasyona bağlı gevşemeye neden olmuştur. Ostolün, FKK (E<sub>maks</sub>=85.46±2.30, pD<sub>2</sub>=4.81±0.08) ve SPA (E<sub>maks</sub>=97.47±1.43, pD<sub>2</sub>=5.31±0.10) üzerindeki gevşetici etkileri kıyaslandığında, SPA'yı daha güçlü bir şekilde gevşettiği saptanmıştır (**Şekil 38**).



**Şekil 38. Ostolün, FKK ve SPA üzerindeki gevşetici etkilerinin karşılaştırılması**  
Ostol, SPA üzerinde, FKK'den daha güçlü gevşetici etkiye sahiptir. \*\*\* $P<0.001$ , FKK ile SPA; İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. SPA, n=10; FKK, n=13.

SPA'nın mikrovasküler damar olması nedeniyle öncelikle AOAA konsantrasyonu 2 mM olarak denenmiştir ancak, ostol tarafından indüklenen gevşemeler, 2 mM AOAA ile inhibe olmamış; 10 mM AOAA ise bu gevşemeleri etkili bir şekilde inhibe etmiştir. 10 mM AOAA, maksimum ostol gevşeme yanıtını anlamlı bir şekilde azaltırken  $pD_2$  değerini değiştirmemiştir (**Şekil 39, Tablo 23**). Ostolün SPA'daki  $EC_{50}$  değeri, nonlineer regresyon analizi kullanılarak  $5.31 \pm 0.10$   $\mu M$  olarak hesaplanmış ve ilerideki deneylerde ostol inkübasyonu 5  $\mu M$  konsantrasyonda yapılmıştır. 10 mM AOAA'nın ostol gevşemelerini inhibe etmesi nedeniyle, mikrosensör deneylerinde AOAA bu konsantrasyonda kullanılmıştır.



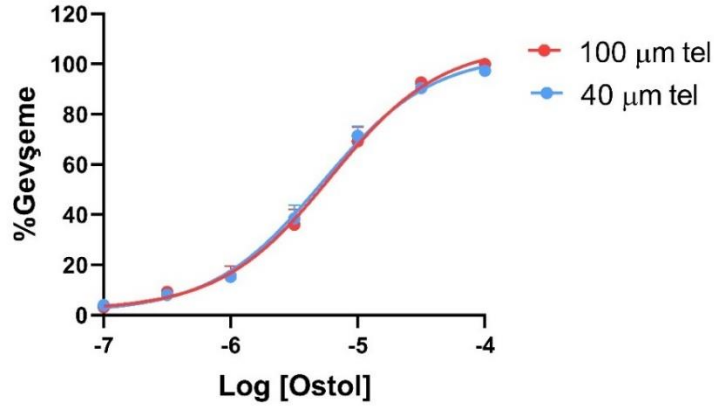
**Şekil 39.** Çözücü ve ostolün, SPA'da AOAA (2 mM, 10 mM) varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşemelerin (A),  $E_{maks}$  (B) ve  $pD_2$  değerlerinin (C) grafikleri.

Ostol, fen ile kastırılmış SPA'yı konsantrasyona bağlı olarak gevşetmiştir. Bu gevşeme, 10 mM AOAA varlığında inhibe olmuştur. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , çözücü ile ostolün karşılaştırılması; + $P < 0.05$ , ostol ve 10 mM AOAA+ostolün karşılaştırılması; İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test ve Student'ın  $t$ -testi (eşleştirilmemiş) ( $E_{maks}$  ve  $pD_2$ ). Çözücü,  $n=6$ ; ostol,  $n=10$ ; ostol+ 2 mM AOAA,  $n=5$ ; ostol+ 10 mM AOAA,  $n=7$ .

**Tablo 23.** Çözücünün/ostolün, SPA'da AOAA varlığında/yokluğunda oluşturduğu gevşemelere ilişkin  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerleri

| Çözücü/Ostol                                         | $E_{maks}$ | $pD_2$    |
|------------------------------------------------------|------------|-----------|
| Çözücü                                               | 9.83±1.99  |           |
| Ostol                                                | 97.47±1.43 | 5.31±0.10 |
| Ostol+AOAA (2 mM)                                    | 93.55±1.50 | 5.27±0.03 |
| Ostol+AOAA (10 mM)                                   | 92.48±1.05 | 5.30±0.11 |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |            |           |

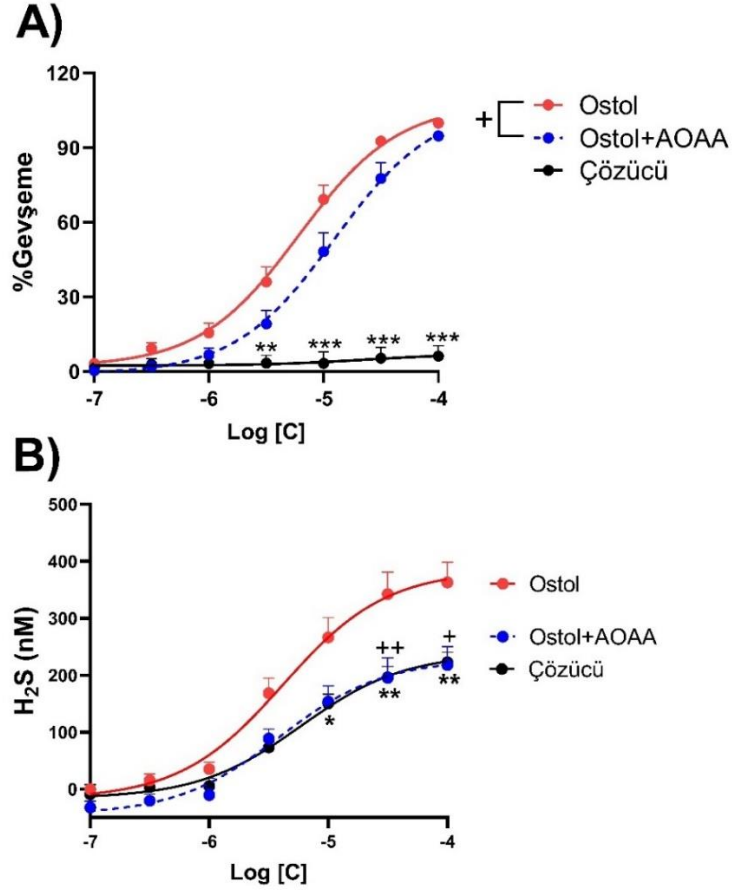
Mikrosensörü (200  $\mu\text{m}$ ) arter lümenine yerleştirebilmek için alan yaratmak amacıyla 100  $\mu\text{m}$  çapında tel kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle ilk olarak kullanılan 100  $\mu\text{m}$  tellerin, ostol gevşeme yanıtlarını etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. 40  $\mu\text{m}$  ve 100  $\mu\text{m}$  teller kullanılarak asılan SPA'larda, ostolün gevşeme yanıtları arasında bir fark olmadığı anlaşılmıştır (**Şekil 40**).



**Şekil 40. Tel çapının SPA'da ostol tarafından indüklenen gevşemeler üzerindeki etkisi.**

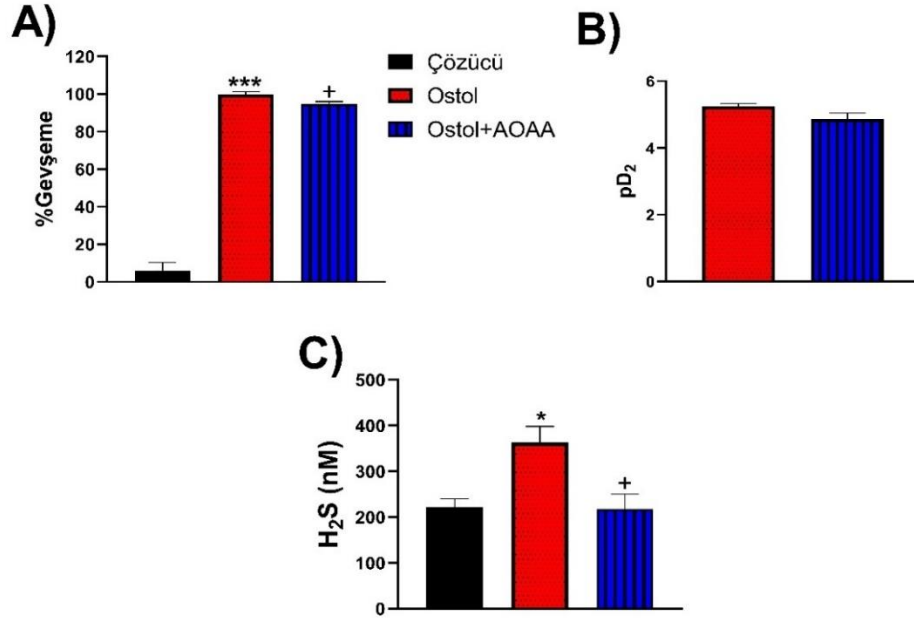
Tellerin çapı, ostolün gevşeme yanıtlarını değiştirmemiştir. Her biri için, n=10.

**Mikrosensör takılı tek kanallı miyografa asılan SPA üzerinde,** ostol çözücüyeye kıyasla gevşemeye neden olmuş ve endojen  $\text{H}_2\text{S}$  üretimini artırmıştır.  $\text{H}_2\text{S}$  sentez inhibitörü AOAA hem ostol aracılı gevşemeleri hem de SPA lümeninde ostole bağlı artan  $\text{H}_2\text{S}$  düzeylerini azaltmıştır (**Şekil 41, Şekil 43, Tablo 24**). AOAA varlığında, ostol tarafından indüklenen maksimum gevşeme yanıtında ve maksimum  $\text{H}_2\text{S}$  konsantrasyonunda azalma gözlenmiştir (**Şekil 42**). Ostol tarafından indüklenen gevşemelerin ve  $\text{H}_2\text{S}$  seviyelerinin AOAA ile azalması, SPA'da CSE ve/veya CBS enzimlerinin varlığını ve ostol gevşemelerinde rol oynadığını göstermektedir.



**Şekil 41. Çözücü ve ostolün, SPA'da AOAA varlığında/ yokluğunda oluşturduğu vasküler yanıtları (A) ve arter lümenindeki H<sub>2</sub>S seviyelerini (B) gösteren grafikler**

Ostol, fen ile kastırılmış SPA'yı gevşetmiş ve eş zamanlı olarak H<sub>2</sub>S seviyelerini artırmıştır, bu etkiler AOAA tarafından inhibe edilmiştir. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , çözücü ile ostolün karşılaştırılması; + $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$ , ostol ve ostol+AOAA'nın karşılaştırılması, İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Çözücü,  $n=7$ , ostol,  $n=12$ , AOAA+ostol,  $n=5$ .



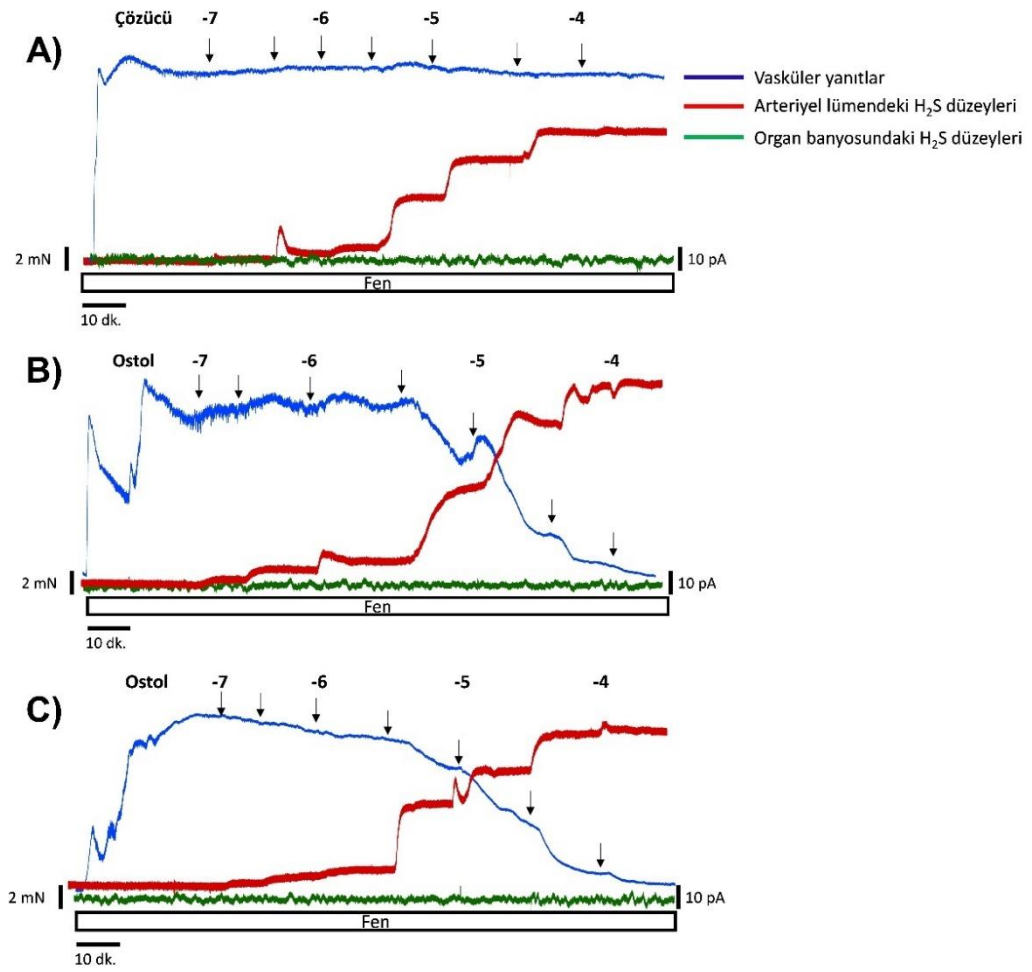
**Şekil 42. SPA’da çözücü/ostol tarafından, AOAA varlığında/ yokluğunda indüklenen maksimum gevşeme yanıtlarının (A), pD<sub>2</sub> değerlerinin (B) ve arter lümenindeki maksimum H<sub>2</sub>S seviyelerinin (C) grafikleri**

AOAA, ostole bağlı maksimum gevşeme yanıtlarını inhibe etmiş ve H<sub>2</sub>S seviyelerini azaltmıştır. \**P*<0.05, \*\*\**P*<0.001, çözücü ile ostolün karşılaştırılması; +*P*<0.05, ostol ile AOAA+ostolün karşılaştırılması, Student’ın *t*-testi (eşleştirilmemiş). Çözücü, n=7, ostol, n=12, AOAA+ostol, n=5.

**Tablo 24. Çözücünün/ostolün, AOAA varlığında/yokluğunda SPA’da oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub> değerleri ile arter lümeninde ölçülen maksimum H<sub>2</sub>S değerleri**

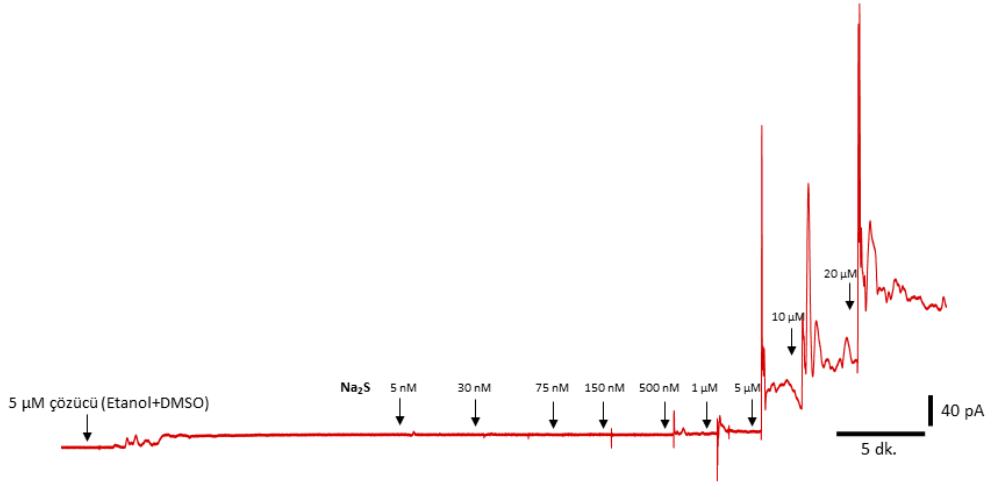
|                                                      | Gevşeme yanıtları |                 | H <sub>2</sub> S       |
|------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|------------------------|
|                                                      | E <sub>maks</sub> | pD <sub>2</sub> | E <sub>maks</sub> (nM) |
| Çözücü                                               | 6.17±4.27         |                 | 222.9±17.38            |
| Ostol                                                | 99.96±1.34        | 5.24±0.10       | 363±35.46              |
| Ostol+AOAA (10 mM)                                   | 94.69±1.33        | 4.86±0.19       | 217.7±32.73            |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |                   |                 |                        |

SPA'daki endojen  $H_2S$  seviyelerinin düşük olması nedeniyle, organ banyosuna yerleştirilen  $H_2S$  mikrosensörünün sinyalinde herhangi bir değişiklik görülmemiş, yalnızca arteriyel lümene yerleştirilen sensörle  $H_2S$  düzeylerini ölçmek mümkün olmuştur (Şekil 43). Bu nedenle, L-sistein ve  $Na_2S$  için konsantrasyon-yanıt eğrileri alınırken, organ banyosundaki sensör çıkarılmış ve yalnızca ostolün arterdeki endojen  $H_2S$  üretimi üzerindeki etkisine odaklanılmıştır.



Şekil 43. Fen ile kastırılmış SPA'da, çözücüye (A), ostole (B) ve AOAA varlığında ostole (C) verilen yanıtların gösterildiği orijinal traseler

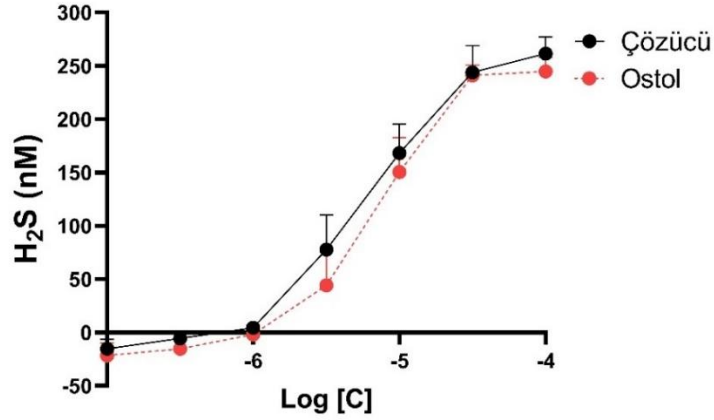
**Şekil 43**'teki orijinal trase görüntülerinden anlaşılacağı üzere, çözücü (DMSO-Etanol-Salin) SPA'da vasküler bir yanıt oluşturmamış, ancak mikrosensör ile etkileşime girerek sensör sinyalini artırmıştır. Bu durumun, sensörün hassasiyetini etkilemediği; PSS içerisinde (arter yokken) çözücü varlığında, artan  $\text{Na}_2\text{S}$  konsantrasyonlarının, paralel olarak  $\text{H}_2\text{S}$  mikrosensör sinyalini arttırması ile kanıtlanmıştır (**Şekil 44**).



**Şekil 44. Arter olmayan PSS içerisinde, çözücü varlığında  $\text{Na}_2\text{S}$ 'in artan konsantrasyonlarına karşılık  $\text{H}_2\text{S}$  mikrosensör sinyalinin gözlenmesi**

Çözücü varlığında,  $\text{Na}_2\text{S}$ 'nin artan konsantrasyonları,  $\text{H}_2\text{S}$  mikrosensörünün sinyalini orantılı olarak artırmıştır.

Ayrıca, ostol ( $244.8 \pm 13.17$  nM) ve çözücünün ( $261.3 \pm 15.91$  nM) PSS içerisinde (arter yokken) aynı düzeylerde sinyal oluşturması; ostolün arter lümeninde endojen  $\text{H}_2\text{S}$  üretimini artırarak çözücüye kıyasla daha yüksek  $\text{H}_2\text{S}$  düzeyleri oluşturduğunu ortaya koymaktadır (**Şekil 45**).



**Şekil 45. PSS'de (arter olmayan) çözücü ve ostolün H<sub>2</sub>S mikrosensör sinyalleri üzerindeki etkileri**

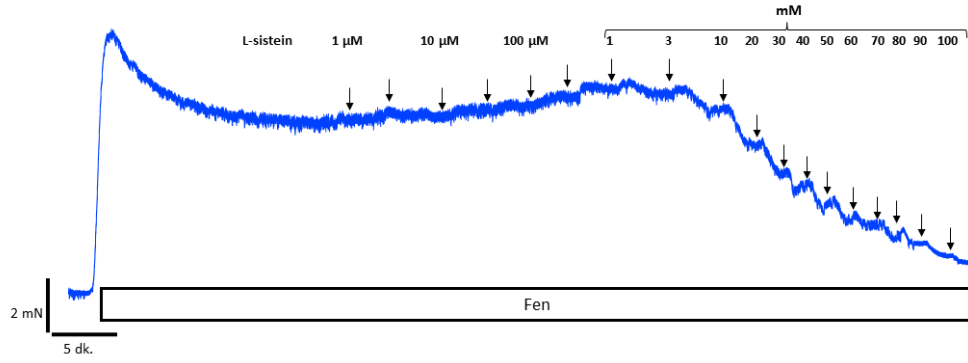
Arter olmayan ortamda, çözücü ve ostol H<sub>2</sub>S mikrosensörünün sinyalini eşit düzeyde artırmıştır. Her biri için, n=3.

Ayrıca, ostol PEG400'de çözülerek yanıtlar tekrarlanmıştır. Ostol DMSO-Etanol-Salin çözücüsünde ve PEG400'de çözündüğünde aynı gevşeme yanıtını oluşturmuş, ancak PEG400 kullanıldığında H<sub>2</sub>S seviyelerinde bir değişiklik tespit edilmemiştir (veriler gösterilmemiştir). Bu nedenle, mikrosensörün ölçüm limitine ulaşmada, DMSO-Etanol-Salin çözücüsünün yararlı bir etkisi olduğunu düşünülmüştür.

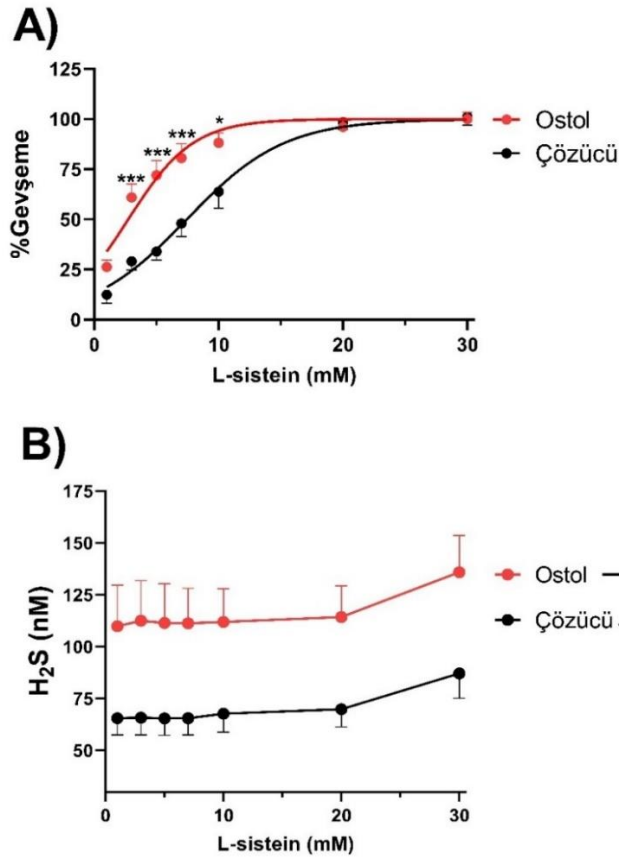
#### 4.2.2. L-sistein yanıtlarının ve H<sub>2</sub>S seviyelerinin değerlendirilmesi

L-sisteinin SPA'da gevşemeye neden olduğu konsantrasyon aralığını belirlemek için, fen ile kastırılmış SPA'dan L-sistein (1  $\mu$ M-100 mM) yanıtları alınmıştır (**Şekil 46**). Gevşeme yanıtı, 1 mM'dan sonra başladığı için, Na<sub>2</sub>S'nin H<sub>2</sub>S mikrosensör deneylerinde; 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 20 mM ve 30 mM konsantrasyonlarda kümülatif olarak uygulanmasına karar verilmiştir.

Ostol (5  $\mu$ M, 15 dk.), SPA'da hem L-sistein ile indüklenen gevşemeleri hem de H<sub>2</sub>S üretimini artırmıştır (**Şekil 47, Şekil 49**). Ostol, L-sisteine bağlı maksimum gevşeme yanıtlarını değiştirmezken, pD<sub>2</sub> değerlerini ve maksimum H<sub>2</sub>S seviyelerini artırmıştır (**Şekil 48, Tablo 25**). Bu sonuçlar, ostolün SPA'daki gevşetici etkilerini H<sub>2</sub>S üretimini artırarak gösterdiğine işaret etmektedir.

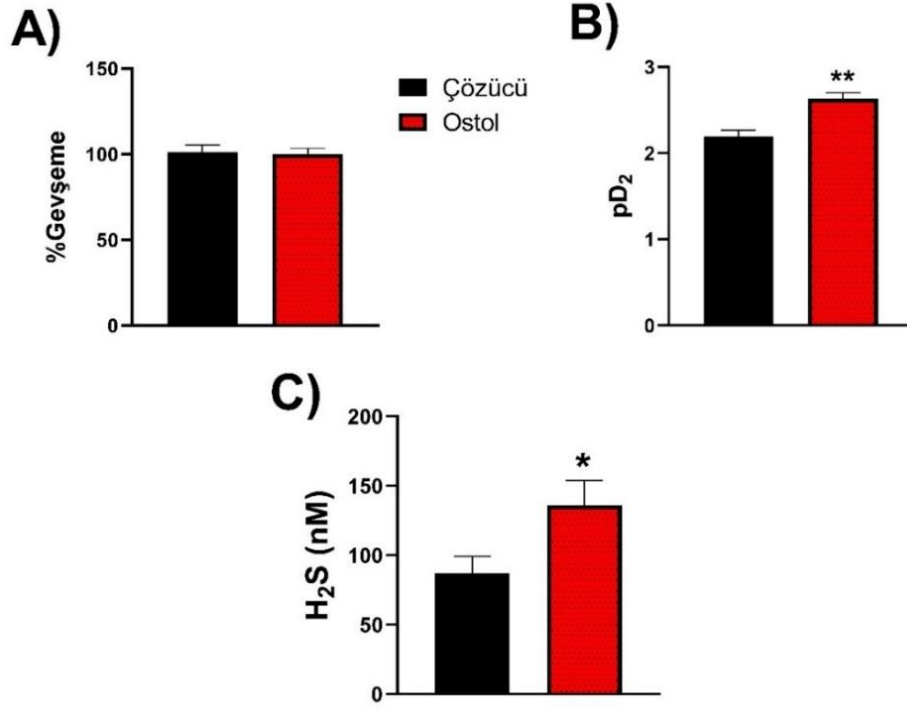


**Şekil 46. Fen ile kastırılmış SPA’da, L-sisteine bağlı vasküler yanıtları gösteren orijinal trase**



**Şekil 47. SPA’da, çözücü ve ostol varlığında L-sistein tarafından indüklenen konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarını (A) ve arter lümenindeki H<sub>2</sub>S düzeylerini (B) gösteren grafikler**

Ostol, L-sistein tarafından indüklenen gevşemeleri ve H<sub>2</sub>S oluşumunu çözücüye kıyasla artırmıştır. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , çözücü ile ostolün karşılaştırılması; İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Her biri için,  $n = 6$ .

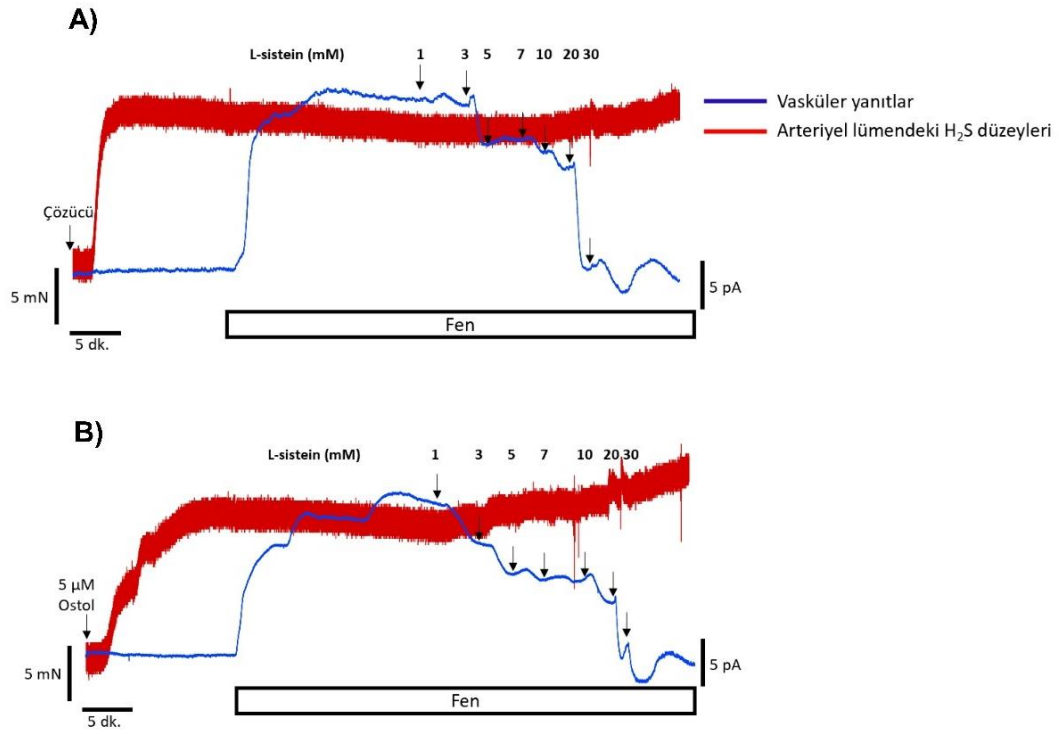


**Şekil 48. SPA’da, çözücü ve ostol varlığında, L-sistein tarafından indüklenen maksimum gevşemelerin (A), pD<sub>2</sub> değerlerinin (B) ve maksimum H<sub>2</sub>S seviyelerinin (C) grafikleri**

Ostol, çözücüye kıyasla pD<sub>2</sub> değerlerini ve maksimum H<sub>2</sub>S seviyelerini artırmıştır. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, çözücü ile ostolün karşılaştırılması; Student’ın *t*-testi (eşleştirilmemiş). Her biri için, n=6.

**Tablo 25. L-sisteinin, SPA’da çözücü ve ostol varlığında oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub> değerleri ile arter lümenindeki maksimum H<sub>2</sub>S değerleri**

| L-sistein                                            | Gevşeme yanıtları |                 | H <sub>2</sub> S       |
|------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|------------------------|
|                                                      | E <sub>maks</sub> | pD <sub>2</sub> | E <sub>maks</sub> (nM) |
| Çözücü                                               | 101.20±4.15       | 2.02±0.07       | 87.13±11.95            |
| Ostol                                                | 99.99±3.45        | 2.37±0.07       | 135.9±17.77            |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |                   |                 |                        |



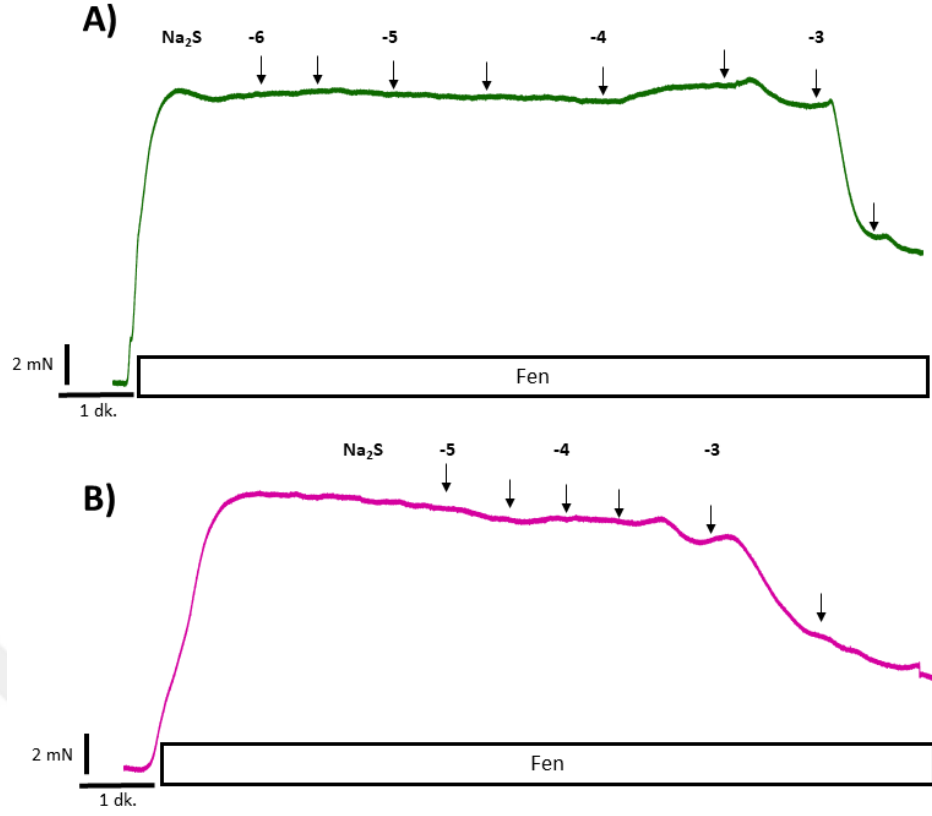
**Şekil 49. Fen ile kastırılmış SPA’da, çözücü (A) ve ostol (B) varlığında L-sistein tarafından indüklenen yanıtları gösteren orijinal traseler**

Ostol varlığında, L-sistein tarafından indüklenen gevşeme yanıtları ve H<sub>2</sub>S üretimi çözücüye kıyasla artmıştır.

#### 4.2.3. Na<sub>2</sub>S yanıtlarının ve H<sub>2</sub>S seviyelerinin değerlendirilmesi

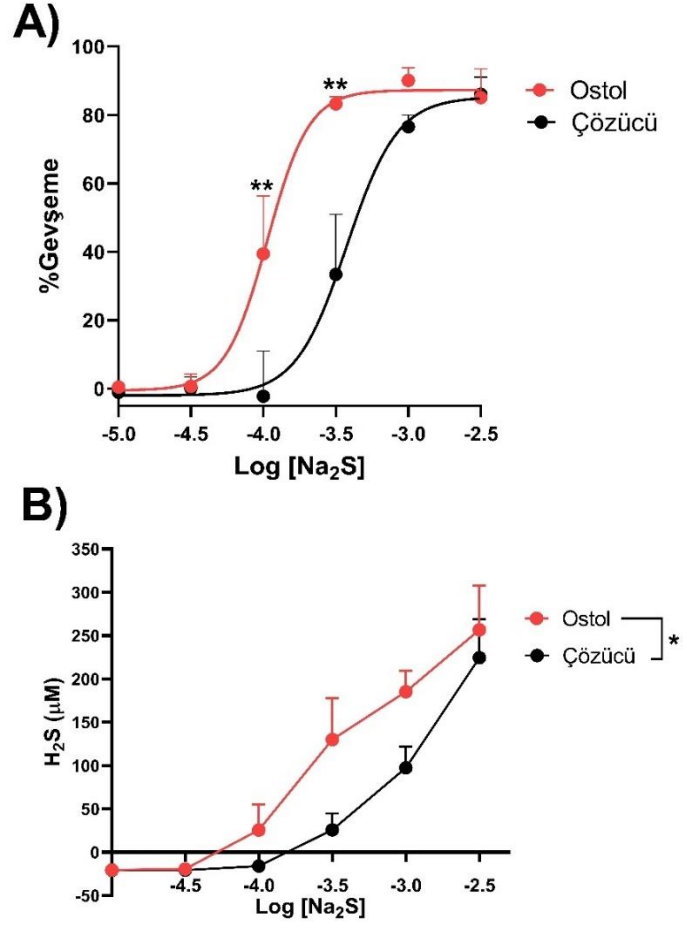
H<sub>2</sub>S vasküler dokuya spesifik trifazik yanıtlar oluşturmaktadır. Bu nedenle, SPA’dan Na<sub>2</sub>S’ye vasküler yanıtları önce  $10^{-6}$ - $3 \times 10^{-2}$  M (**Şekil 50A**) konsantrasyon aralığında ve sonra  $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-3}$  M (**Şekil 50B**) konsantrasyon aralığında olacak şekilde iki farklı aralıkta alınmıştır. Na<sub>2</sub>S,  $10^{-5}$  M-  $3 \times 10^{-3}$  M olan konsantrasyon aralığında yalnızca gevşeme yanıtı oluşturmuş, kasılmaya neden olmamıştır. Bu nedenle, mikrosensör deneyleri için bu aralık tercih edilmiştir. Ostol, H<sub>2</sub>S donörü Na<sub>2</sub>S tarafından indüklenen gevşeme yanıtlarını ve H<sub>2</sub>S düzeylerini artırmıştır (**Şekil 51, Şekil 53**). Ostol, Na<sub>2</sub>S’e bağlı maksimum gevşemeleri ve H<sub>2</sub>S seviyelerini değiştirmezken, gevşeme yanıtıyla ilişkili pD<sub>2</sub> değerini artırmıştır (**Şekil 52, Tablo 26**).

Ostol tarafından Na<sub>2</sub>S’ye verilen vasküler yanıtların artması ve sonuçta eğrinin sola kayması, ostolün, H<sub>2</sub>S’nin gevşetici etkisinde rol oynayan alt mekanizmalar üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.



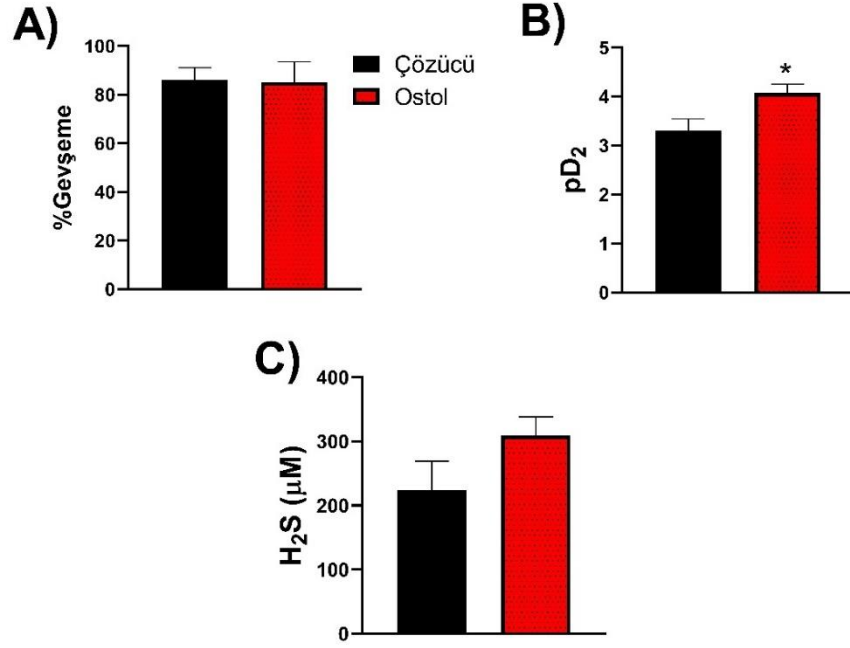
**Şekil 50. Fen ile kastırılmış SPA’da, iki farklı konsantrasyon aralığında  $\text{Na}_2\text{S}$  tarafından indüklenen vasküler yanıtları gösteren orijinal traseler:  $10^{-6}$ - $3 \times 10^{-2}$  M (A) ve  $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-3}$  M (B)**

$\text{Na}_2\text{S}$ ,  $10^{-5}$  M'den başlayan konsantrasyonlarda uygulandığında yalnızca gevşemeye neden olmaktadır.



**Şekil 51.** SPA'da, çözücü ve ostol varlığında, Na<sub>2</sub>S tarafından indüklenen konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarını (A) ve arter lümenindeki H<sub>2</sub>S düzeylerini (B) gösteren grafikler

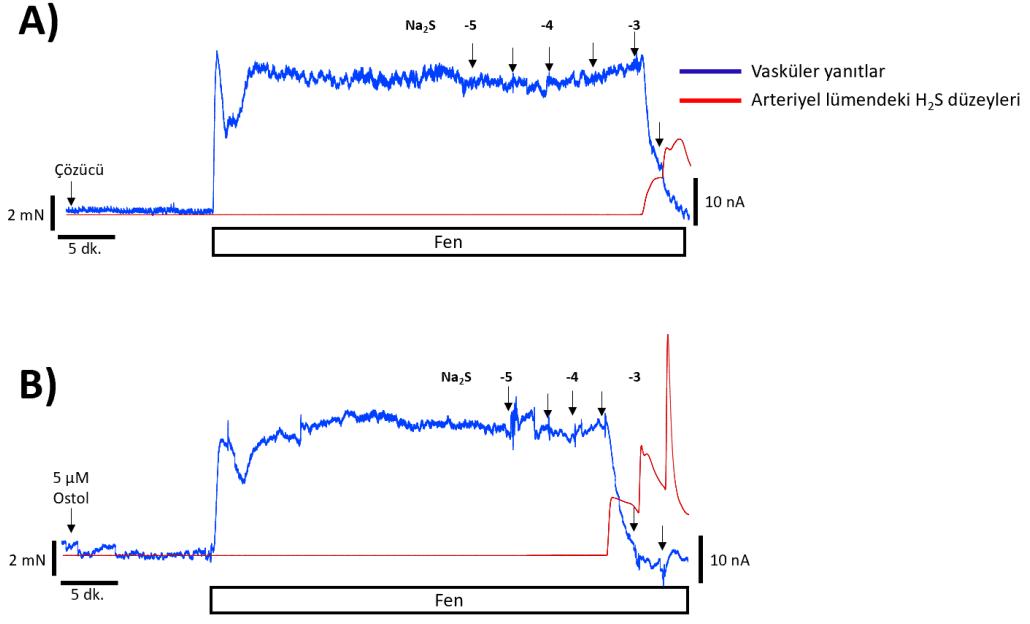
Ostol, Na<sub>2</sub>S gevşemelerini ve eş zamanlı olarak H<sub>2</sub>S seviyelerini artırmıştır. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, çözücü ile ostolün karşılaştırılması; İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test. Her biri için, n=5.



**Şekil 52. SPA’da, çözücü/ostol varlığında, Na<sub>2</sub>S’ye bağlı maksimum gevşemeleri (A), pD<sub>2</sub> değerlerini (B) ve maksimum H<sub>2</sub>S seviyelerini (C) gösteren grafikler**  
 Ostol varlığında, Na<sub>2</sub>S gevşemelerine ilişkin pD<sub>2</sub> değerleri artmıştır. \**P*<0.05, çözücü ile ostolün karşılaştırılması; Student’ın *t*-testi (eşleştirilmemiş). *n*=5.

**Tablo 26. Na<sub>2</sub>S’nin, çözücü ve ostol varlığında SPA’da oluşturduğu gevşeme yanıtlarına ilişkin E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub> değerleri ile arter lümenindeki maksimum H<sub>2</sub>S değerleri**

| Na <sub>2</sub> S                                    | Gevşeme yanıtları |                 | H <sub>2</sub> S       |
|------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|------------------------|
|                                                      | E <sub>maks</sub> | pD <sub>2</sub> | E <sub>maks</sub> (μM) |
| Çözücü                                               | 86.09±5.05        | 3.30±0.24       | 224.5±44.66            |
| Ostol                                                | 85.09±8.42        | 4.07±0.19       | 309.3±28.94            |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |                   |                 |                        |



**Şekil 53. Fen ile kastırılmış SPA'da, çözücü (A) ve ostol (B) varlığında, Na<sub>2</sub>S tarafından indüklenen yanıtları gösteren orijinal traseler**

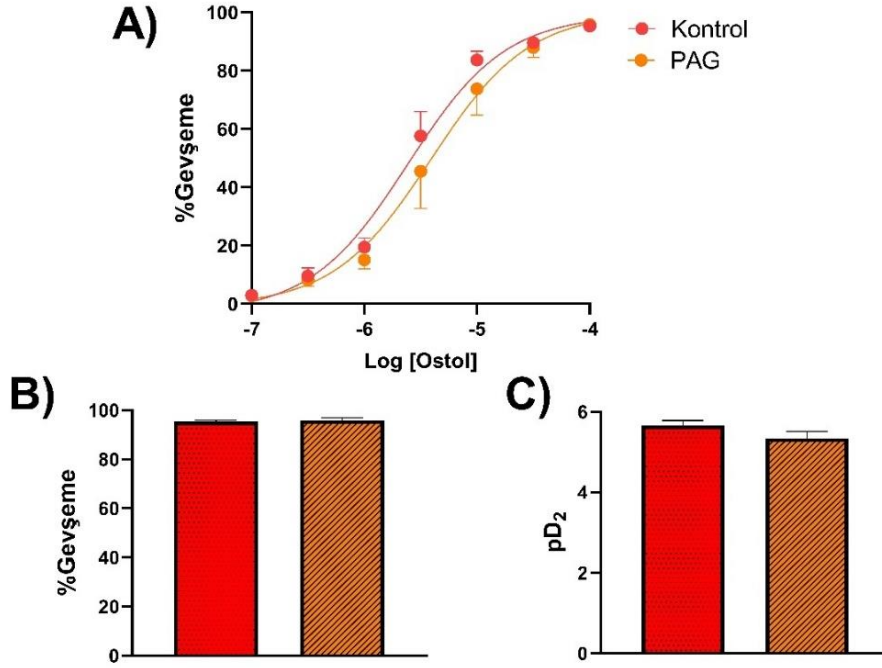
#### 4.2.4. Ostolün SPA'daki gevşetici etki mekanizmasını aydınlatmak amacıyla yapılan deneyler

40 µm çapındaki teller ile standart miyograflara (mikrosensör olmayan) asılan SPA'lardan, farklı inhibitörler varlığında ostol gevşemeleri alınmıştır.

##### 4.2.4.1. Ostol gevşemesinde CSE enzimi ile ilişkili H<sub>2</sub>S sentezinin rolü

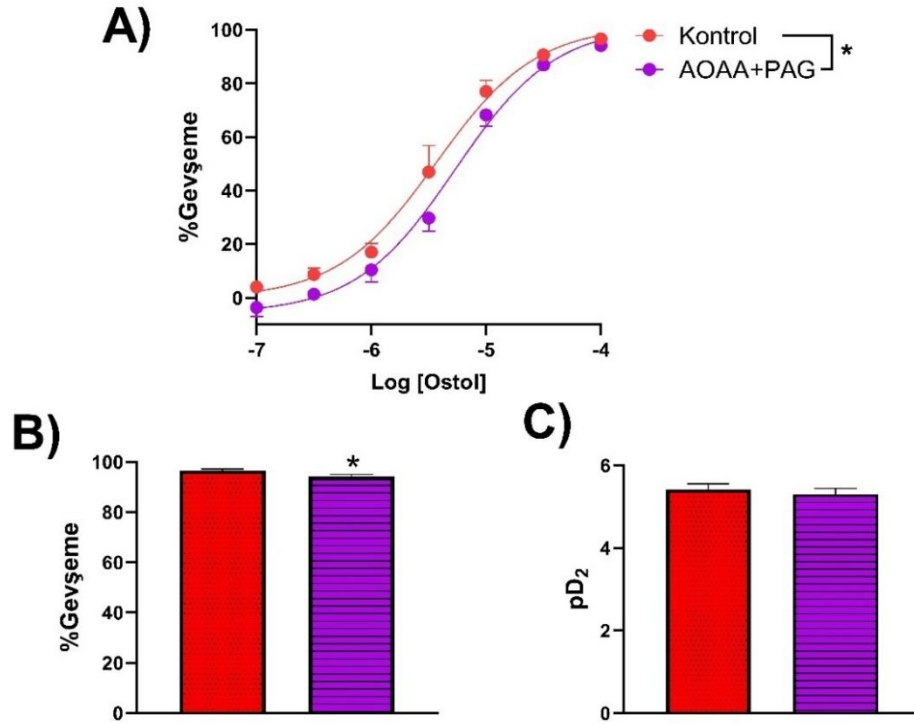
Ostolün, H<sub>2</sub>S sentezinden sorumlu enzimlerden biri olan CSE üzerindeki etkilerini araştırmak için, ostol gevşemeleri, CSE enzim inhibitörü PAG (10 mM, 30 dk.) varlığında tekrarlanmıştır. PAG, ostol yanıtlarını değiştirmemiştir (**Şekil 54**).

Ancak, PAG (10 mM, 30 dk.) ve AOAA (10 mM, 30 dk.) birlikte kullanıldığında, ostole bağlı gevşeme yanıtları inhibe olmuştur. AOAA ve PAG kombinasyonu, ostol tarafından indüklenen maksimum gevşeme yanıtlarını inhibe etmiştir (**Şekil 55, Tablo 27**). AOAA, H<sub>2</sub>S enzimlerinin non-spesifik inhibitörü olduğundan bu sonuç, ostolün SPA'da CSE enziminden daha çok CBS enzimi üzerinden etki gösterdiğine işaret etmektedir.



**Şekil 54. Ostolün, SPA'da PAG varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E<sub>maks</sub> (B) ve pD<sub>2</sub> değerlerinin grafikleri**

PAG, ostole bağlı gevşeme yanıtlarını değiştirmemiştir. Her biri için, n=6.

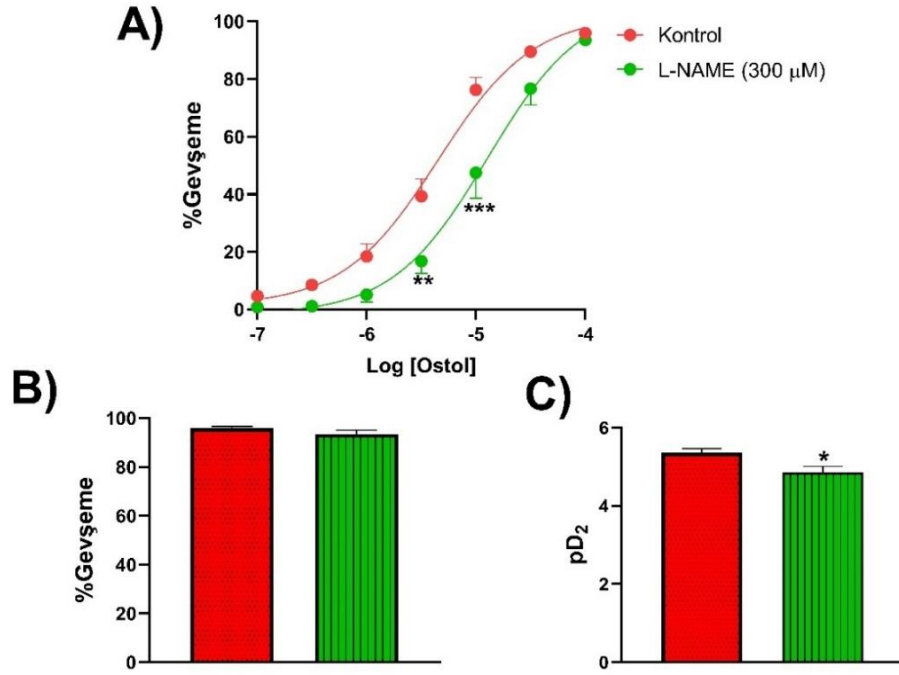


**Şekil 55. Ostolün, SPA’da AOAA+PAG varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E<sub>maks</sub> (B) ve pD<sub>2</sub> değerlerinin grafikleri.**

AOAA+PAG, ostol tarafından indüklenen konsantrasyona bağlı gevşemeleri ve maksimum gevşemeleri inhibe etmiştir. \* $P < 0.05$ , kontrol ile AOAA+PAG karşılaştırması; İki-Yönlü ANOVA, Student’ın  $t$ -testi (eşleştirilmemiş) (E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub>). Her biri için,  $n=6$ .

#### 4.2.4.2. Ostol tarafından indüklenen gevşemelerde NO sentezinin rolü

Ostolün, NO sentaz (NOS) enzimi üzerindeki etkisini araştırmak için, NOS inhibitörü L-NAME (300  $\mu$ M, 30 dk.) varlığında ostol gevşemeleri tekrarlanmıştır. L-NAME, ostol tarafından indüklenen gevşemeleri inhibe etmiş ve bu sonuç ostolün SPA’da NOS enzim aktivitesini arttırdığını göstermiştir (Şekil 56, Tablo 27).

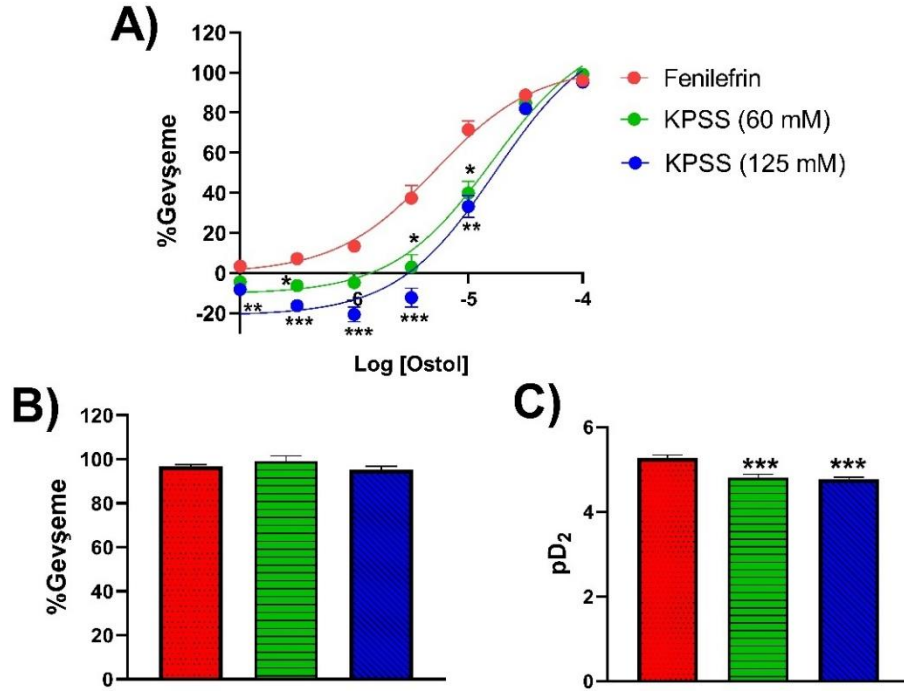


**Şekil 56.** Ostolün, SPA’da L-NAME varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E<sub>maks</sub> (B) ve pD<sub>2</sub> değerlerinin grafikleri.

L-NAME, ostole bağlı gevşemeleri azaltmıştır. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , kontrol ile L-NAME’in karşılaştırılması, İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test, Student’ın  $t$ -testi (eşleştirilmemiş) (E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub>). Her biri için,  $n=6$ .

#### 4.2.4.3. Potasyum kanallarının ostol gevşemelerindeki rolü

Ostolün potasyum kanalları üzerindeki etkisi, iki farklı konsantrasyondaki (60 mM ve 125 mM KCl) KPSS ile kastrılmış SPA’dan, ostol gevşeme yanıtları alınarak incelenmiştir. Fen ön-kastırması ile karşılaştırıldığında, ostol tarafından indüklenen gevşemeler hem 60 mM hem de 125 mM KPSS ile kasılan SPA’larda azalmıştır (**Şekil 57**). Ayrıca, gevşeme yanıtları ile ilişkilendirilen pD<sub>2</sub> değerlerini karşılaştırırken, pD<sub>2</sub> değerlerinin KPSS ile kasılan arterlerde azaldığı gözlemlenmiştir (**Şekil 57, Tablo 27**). KCl konsantrasyonunun artmasıyla, ostol tarafından indüklenen gevşemelerin azalması, ostolün gevşetici etkilerinde potasyum kanallarının rol oynadığı göstermektedir.

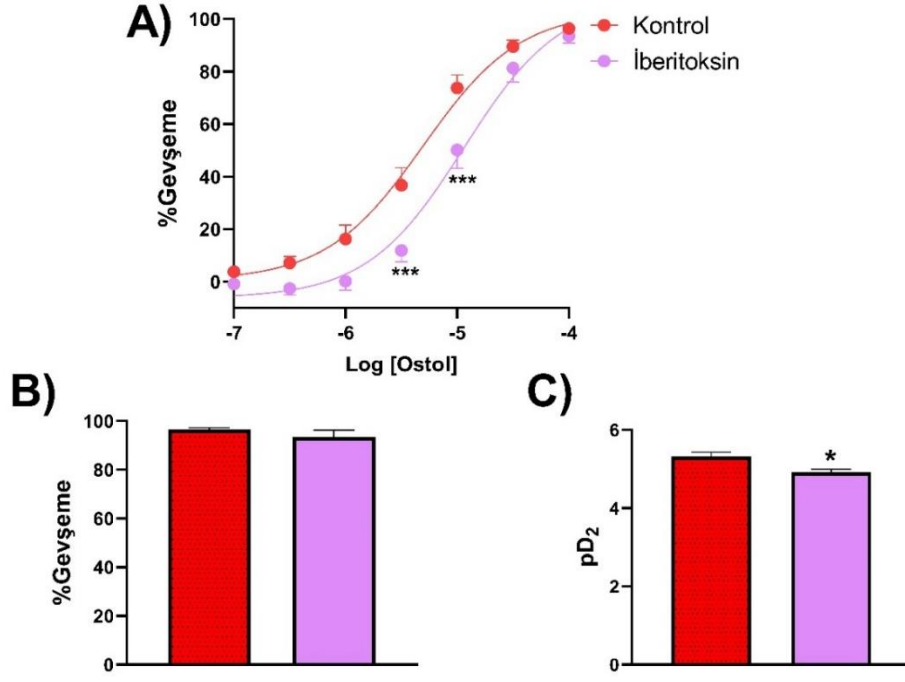


**Şekil 57. Ostolün, fen, 60 mM KPSS ve 125 mM KPSS ile kastırılmış SPA’larda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E<sub>maks</sub> (B) ve pD<sub>2</sub> değerlerinin grafikleri**

Ostol tarafından indüklenen gevşemeler, KPSS ile kastırılmış arterlerde, fen ile kastırılmış arterlere kıyasla azalmıştır.

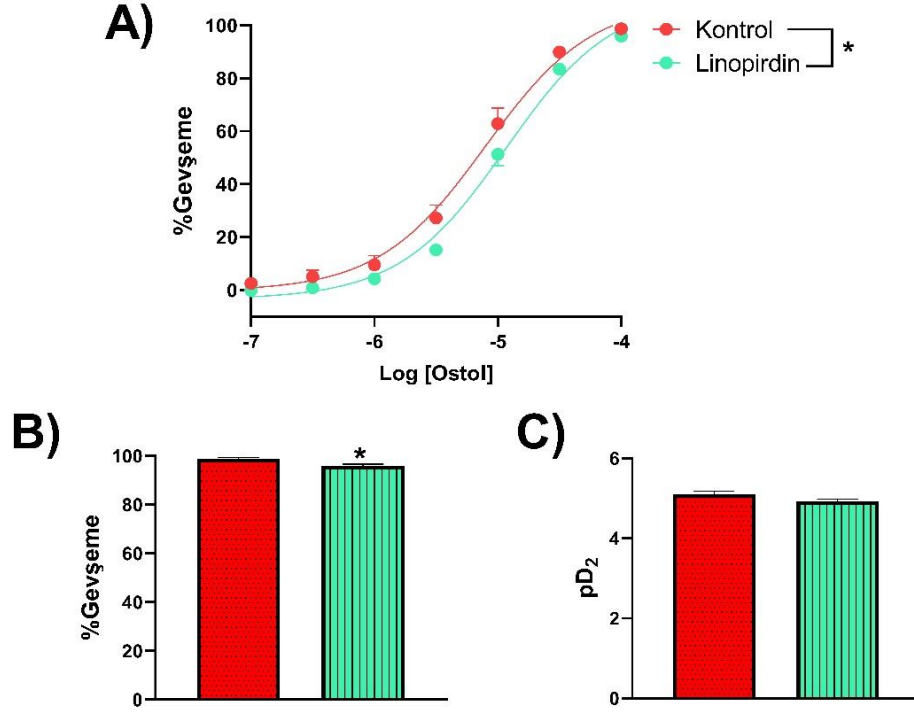
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , fen ile karşılaştırmalar; İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test, Student’ın  $t$ -testi (eşleştirilmemiş) (E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub>). Fen,  $n=8$ ; 60 mM KPSS,  $n=6$ ; 125 mM KPSS,  $n=6$ .

Ostolün BK<sub>Ca</sub> kanalları üzerindeki etkisi, ostol gevşemelerinin, bu kanalın inhibitörü iberitoksin (100 nM, 45 dk.) varlığında elde edilmesiyle; KV<sub>7</sub> kanalları üzerindeki etkisi ise bu kanalların inhibitörü linopirdin (10  $\mu$ M, 30 dk.) varlığında araştırılmıştır. İberitoksin, ostol tarafından indüklenen gevşemeleri inhibe etmiş ve pD<sub>2</sub> değerini azaltmıştır (**Şekil 58, Tablo 27**). Linopirdin, ostol tarafından indüklenen konsantrasyona bağlı gevşemeleri ve maksimum gevşeme yanıtlarını azaltmıştır (**Şekil 59, Tablo 27**). Bu sonuçlar, ostolün gevşetici etkilerinde BK<sub>Ca</sub> ve KV<sub>7</sub> kanallarının rol oynadığını ortaya koymaktadır.



**Şekil 58. Ostolün, SPA’da iberitoksin varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E<sub>maks</sub> (B) ve pD<sub>2</sub> değerlerinin grafikleri**

Iberitoksin, ostol kaynaklı gevşemeleri ve pD<sub>2</sub> değerlerini azaltmıştır. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , kontrol ile iberitoksinin karşılaştırılması; İki-Yönlü ANOVA, Bonferroni post-hoc test, Student’ın  $t$ -testi (Eşleştirilmemiş) (E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub>). Her biri için,  $n=6$ .



**Şekil 59. Ostolün, SPA'da linopirdin varlığında/yokluğunda oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtlarının (A), E<sub>maks</sub> (B) ve pD<sub>2</sub> değerlerinin grafikleri**

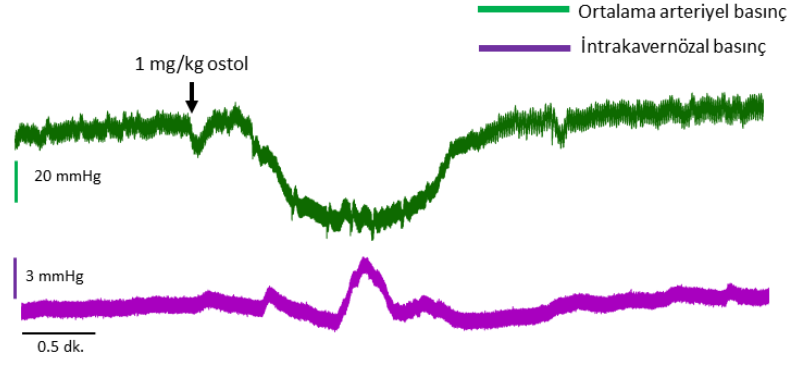
Linopirdin, ostol kaynaklı konsantrasyona bağlı gevşemeleri ve maksimum gevşemeleri azaltmıştır. \* $P < 0.05$ , kontrol ile linopirdinin karşılaştırılması; İki-Yönlü ANOVA, Student'ın  $t$ -testi (eşleştirilmemiş) (E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub>). Her biri için,  $n=7$ .

**Tablo 27. Ostolün, SPA’da çeşitli inhibitörler varlığında/yokluğunda oluşturduğu gevşemelere ilişkin E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub> değerleri.**

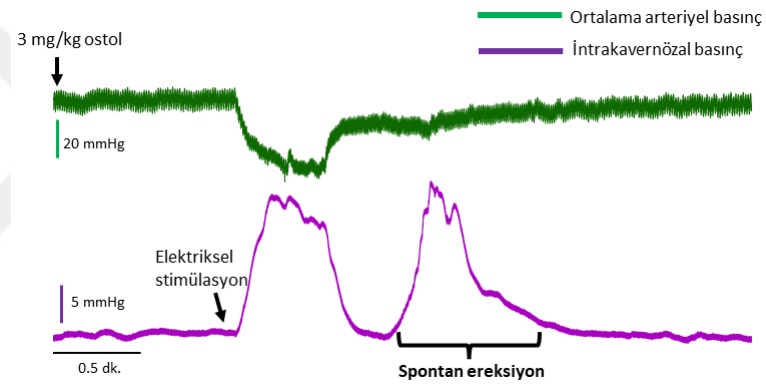
| Ostol                                                | E <sub>maks</sub> | pD <sub>2</sub> |
|------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|
| Kontrol                                              | 97.25±0.55        | 5.35±0.07       |
| PAG                                                  | 95.91±0.96        | 5.34±0.18       |
| AOAA+PAG                                             | 94.15±0.90        | 5.30±0.14       |
| L-NAME                                               | 93.57±1.52        | 4.85±0.16       |
| KPSS (60 mM)                                         | 99.04±2.48        | 4.77±0.07       |
| KPSS (125 mM)                                        | 95.23±1.49        | 4.81±0.05       |
| İberitoksin                                          | 93.54±2.71        | 4.92±0.08       |
| Linopirdin                                           | 95.97±0.67        | 4.92±0.06       |
| Tablodaki veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. |                   |                 |

#### **4.3. *İn vivo* İKB ve OAB ölçümü deneylerinin sonuçları**

FFK’den elde edilen bulgular, TÜBİTAK 2214-A projesi kapsamında Aarhus Üniversitesi’nde SPA üzerinde yürütülen çalışmalar ile daha da geliştirilmiş ve ostolün vasküler yanıtlar üzerindeki etkilerinin *in vivo* koşullarda da desteklenmesi amacıyla, *in vivo* ortamda erektil fonksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ancak, istatistiksel analizler için gerekli olan hayvan sayısına ulaşamadığından, elde edilen veriler orijinal trase formatında sunulmuştur. Ostolün 1 mg/kg ve daha yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında hem bazal hem de submaksimal elektriksel stimülasyon sonrası İKB/OAB oranını arttırıcı etkiler gösterdiği ve ayrıca spontan ereksiyona neden olduğu iki hayvan üzerinde yapılan deneylerde görülmüştür (**Şekil 60, Şekil 61**). Sonuçları kesinleştirmek amacıyla, bu konudaki ek deneyler devam etmektedir.



**Şekil 60. 1 mg/kg ostolün, spontan olarak İKB/OAB'yi (erektile fonksiyonu) arttırdığını gösteren orijinal traseler**



**Şekil 61. 3 mg/kg ostolün spontan ereksiyona neden olduğunu gösteren orijinal traseler**

## Tartışma

Dünya genelinde milyonlarca erkeği etkileyen erektil disfonksiyon (ED), ereksiyonun sağlanamaması veya sağlıklı bir şekilde sürdürülememesi olarak tanımlanmaktadır. ED etiyolojisinde, psikolojik faktörlerin yanı sıra, hipertansiyon, diyabet ve hiperlipidemi gibi hastalıklar ve metabolik bozukluklar yer almaktadır. En sık karşılaşılan ED, endotel disfonksiyona bağlı gelişen vaskülojenik ED'dir (Argiolas, Argiolas, Argiolas ve Melis, 2023; Yafi ve diğerleri, 2016). ED tedavisinde ilk sıra kullanılan ilaç grubu PDE-5 inhibitörleridir. Oral PDE-5 inhibitörleri, önceleri başarılı etkileriyle dikkat çekerken daha sonra genel ED hasta popülasyonunun %30-40'ının, diyabetli ED hastalarının ise %50'sinin bu inhibitörlere yanıt vermediği rapor edilmiştir (Goldstein ve diğerleri, 2012; Kendirci ve diğerleri, 2006; Porst ve diğerleri, 2013). Bu inhibitörlerin etkilerini gösterebilmeleri için, endotel fonksiyonunda (NO üretiminde) bozukluk olmaması gerekmektedir. Özellikle vaskülojenik ED tedavisinde, endotelden bağımsız etki gösterebilen yeni ilaç adaylarının kliniğe kazandırılması zorunluluğu nedeniyle bu konuda yapılan çalışmalar yıllar içerisinde artmıştır (Manfredi ve diğerleri, 2022).

H<sub>2</sub>S, endotelden bağımsız gevşetici etkileriyle dikkat çeken ve vücutta L-sistein aminoasidinden endojen olarak üretilen yeni bir gazotransmitterdir. L-sisteinin ve NaHS'nin (ekzojen H<sub>2</sub>S donörü), insan korpus kavernozumunu (İKK) endotelden bağımsız olarak gevşettiklerinin gösterilmesi, H<sub>2</sub>S'nin özellikle vaskülojenik ED tedavisinde potansiyel yararlı etkiler gösterebileceğini ortaya koymaktadır (Di Villa Bianca ve diğerleri, 2009). H<sub>2</sub>S, etkilerini hem doğrudan düz kastaki K<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> kanalları, sGC aktivasyonu, PDE-5 inhibisyonu gibi NO ile ortak alt mekanizmalar üzerinden (La Fuente ve diğerleri, 2019) hem de PI<sub>3</sub>K/Akt/NO yolağı aracılığıyla NO sentezini arttırarak göstermektedir (Coletta ve diğerleri, 2012). Bu da özellikle endotel disfonksiyonla ilişkili birçok hastalığın tedavisinde H<sub>2</sub>S'yi potansiyel terapötik hedef haline getirmektedir.

Ostol, dokulardaki güçlü gevşetici etkisiyle dikkat çeken doğal bir kumarindir. Bu bileşiğin farmakolojik etkilerinin büyük bir kısmının H<sub>2</sub>S ile ortak mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiği, buna karşın ostol-H<sub>2</sub>S ilişkisinin daha önce hiçbir çalışmaya konu olmadığı literatür taramalarımızda fark edilmiştir. Ostolün, tavşan korpus kavernozumunu (TKK), ED tedavisinde kullanılan papaverinden daha güçlü gevşetmesi (W. F. Chiou ve diğerleri, 2001) ve gevşetici etkisinin hiçbir

inhibitörle/fiziksel işlemle tamamen bloke olmaması (J. Chen ve diğerleri, 2000; Hou, Zhou, Jiang, Wang ve He, 2009; Ko ve diğerleri, 1992), ostolün etki mekanizmasına yönelik detaylı araştırmalar yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu bilgiler ışığında, çalışmamız ostolün erektile fonksiyon üzerindeki yararlı etkilerini ve bu etkilerinde H<sub>2</sub>S'nin rolünü araştırmayı hedeflemiştir.

### **Çözücünün vasküler yanıtlar ve H<sub>2</sub>S düzeyleri üzerindeki etkileri**

İzole organ banyosu deneylerinde, çözücünün (DMSO-Etanol-Salin) FKK'de zaman-kontrol ile aynı gevşemeye ve SPA'da yalnızca %9.83±1.99 oranında gevşemeye neden olması, seçilen çözücünün önemli bir vasküler etkisi olmadığını ortaya koymaktadır.

SPA çalışmalarında; çözücü, arter lümenindeki H<sub>2</sub>S mikrosensörü ile etkileşerek mikrosensör sinyalini arttırmıştır. Bu artış, SPA lümeninde maksimum 222.9±17.38 nM, SPA bulunmayan PBS içerisinde ise 261.3±15.91 nM olarak bulunmuştur. SPA bulunmayan ortamda daha yüksek sinyalin elde edilmesinin, sensörün etrafının arterle çevrili olmamasından ve çözücünün sensöre daha kolay ulaşmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sonuçta çözücünün neden olduğu bu sinyal artışının, endojen H<sub>2</sub>S üretimiyle ilişkili olmadığı anlaşılmaktadır.

Çözücünün sensörün sinyal artışına neden olduğundan emin olmak için, ostol farklı bir çözücü olan PEG400 içerisinde hazırlanmış ve yine SPA gevşemeleri ile eş zamanlı olarak H<sub>2</sub>S sinyal ölçümü yapılmıştır. PEG400 varlığında, SPA'dan benzer ostol gevşeme yanıtları alındığı halde sensördeki H<sub>2</sub>S sinyalinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu durum, çalışmamızda ostol çözücüsü olarak seçilen DMSO-Etanol-Salin çözücüsünün, mikrosensörün H<sub>2</sub>S ölçüm limitine ulaşılmasında yardımcı olduğunu göstermektedir. Ayrıca sadece çözücü (DMSO-Etanol-Salin) varlığında, artan Na<sub>2</sub>S konsantrasyonlarına karşı sensör sinyalinin de paralel olarak artması, çözücünün mikrosensörün H<sub>2</sub>S'ye karşı duyarlılığını etkilemediğini ortaya koymaktadır.

Çözücü (DMSO-Etanol-Salin), SPA lümenine yerleştirilen mikrosensörün sinyalini arttırırken, FKK homojenatlarında yapılan H<sub>2</sub>S mikrosensör çalışmalarında herhangi bir sinyal değişimine neden olmamıştır. Bu durum, SPA lümenine yerleştirilen mikrosensörün nM düzeylerde ölçüm yapan oldukça hassas bir sensör olmasından, FKK homojenatları ile çalışılırken kullanılan mikrosensörün ise µM düzeylerde

ölçüm yapan klasik bir sensör olmasından kaynaklanabilir. Sonuç olarak, çözücü FKK'de ve SPA'da herhangi bir vasküler yanıt oluşturmamış, ayrıca SPA lümenine yerleştirilen H<sub>2</sub>S mikrosensörünün ölçüm limitine ulaşılmasını sağlamıştır.

### **Ostolün ex vivo çalışmalardaki düz kas gevşetici etkisi**

Çalışmamızda, ostol, hem FKK ( $E_{maks} = 88.42 \pm 2.93$ ,  $EC_{50} = 18 \mu M$ ) hem de SPA ( $E_{maks} = 97.25 \pm 0.55$ ,  $EC_{50} = 4.47 \mu M$ ) üzerinde konsantrasyona bağlı gevşetici etki oluşturmuştur. Ostol, FKK'ye kıyasla SPA üzerinde daha güçlü gevşetici etki göstermiştir. Bu durumun, pudental arterin mikrodamar yapısında olmasından, agonistlerin/antagonistlerin hedef proteinlere ulaşmasının daha hızlı/kolay gerçekleşmesinden ve dokunun/hayvan türünün ostole yanıtının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Chen ve ark. ve Chiou ve ark. tarafından yapılan iki farklı çalışmada, *Cnidium monnieri* (L.) meyvelerinden izole edilen ostolün, fen ile kastırılan tavşan korpus kavernozumunu (TKK) konsantrasyona bağlı gevşettiği ( $EC_{50} = 2.6 \mu M$ ,  $EC_{50} = 2.14 \pm 0.73 \mu M$ ) ve maksimum gevşeme yanıtlarının %100'e ulaştığı bildirilmiştir (J. Chen ve diğerleri, 2000; W. Chiou, Huang, Chen ve Chen, 2001). Chiou ve ark., çalışmalarında ostol ana stoğunu DMSO içerisinde, ileri dilüsyonları ise su içerisinde hazırladıklarını ve çözücünün vasküler yanıtı neden olmadığını bildirmişlerdir. Chen ve ark. ise, çalışmalarında ostolü hangi çözücü içerisinde hazırladıklarını belirtmemişlerdir. *Angelica pubescens* Maxim. bitkisinden izole edilen ostolün, sıçan aortasını (Ko ve diğerleri, 1992); ticari olarak alınan ve DMSO'da çözündürülen ostolün, sıçan pulmoner arterini ( $EC_{50} = 3.01 \pm 0.64 \mu M$ ) (L. Yao ve diğerleri, 2013) konsantrasyona bağlı gevşettiği bildirilmiştir. Bunun dışında ostolün, izole trakea (Teng ve diğerleri, 1994), uterus (Sadraei, Shokoohinia, Sajjadi ve Ghadirian, 2012) ve ileum (Sadraei, Shokoohinia, Sajjadi ve Mozafari, 2013) gibi dokularda da gevşetici etki gösterdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Ostolün çeşitli düz kaslar üzerinde güçlü gevşetici etkiye sahip olduğu, bu çalışmaların sonuçları ile görülmekte ve tez kapsamında elde ettiğimiz bulgularla uyumlu olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışmalardaki ve tez kapsamında elde edilen ostol gevşemelerinin  $EC_{50}$  değerleri karşılaştırıldığında; ostolün, TKK ve sıçan pulmoner arterinde, FKK'den ve SPA'dan daha etkili olduğu görülmektedir. Ancak  $EC_{50}$  değerlerinin çalışmalar arasında

farklılık göstermesinin nedeni, hayvan/doku çeşitliliği yanında ostolün farklı kaynaklardan (bitkiden izole edilen/ticari) kullanılması, ostol çözücüsü olarak sadece DMSO kullanılması, bu çözücüye ilişkin vasküler yanıtların gösterilmemesi ve önkastırma düzeyleri ile ilişkilendirilebilir.

### **Ostolün gevşetici etkisinde H<sub>2</sub>S'nin rolü**

Ostolün gevşeme yanıtları, FKK'de ve SPA'da AOAA varlığında inhibe olmuştur. Ostol, SPA'da gevşetici etki gösterirken eş zamanlı olarak arter lümenindeki H<sub>2</sub>S düzeylerini arttırmış; gevşeme yanıtları ve H<sub>2</sub>S düzeyindeki bu artış AOAA varlığında inhibe olmuştur. Ostol, L-sistein gevşeme yanıtlarını her iki dokuda da arttırmış; bu artış FKK'da AOAA ile geri dönmüştür. SPA'da ise ostol, L-sistein gevşemelerini arttırırken, eş zamanlı olarak arter lümenindeki H<sub>2</sub>S üretiminde artış gözlenmiştir. Bu durum ostolün bazal ve L-sistein ile indüklenen H<sub>2</sub>S sentezini arttırarak erektile dokuyu gevşettiğini kanıtlamaktadır.

Ayrıca, Na<sub>2</sub>S'ye bağlı gevşemeler, FKK'de ve SPA'da ostol varlığında artmıştır. FKK'de Na<sub>2</sub>S gevşemelerindeki bu artış, AOAA varlığında azalmıştır. SPA'da ise ostol, Na<sub>2</sub>S'ye bağlı gevşemeleri arttırırken eş zamanlı olarak arter lümenindeki H<sub>2</sub>S düzeylerini de arttırmıştır. Bu bulgular, ostolün endojen H<sub>2</sub>S sentezini arttırarak H<sub>2</sub>S gevşemelerinden sorumlu alt mekanizmaları etkilediğini ve böylece erektile fonksiyona katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

### **H<sub>2</sub>S mikrosensörü ile gerçek-zamanlı H<sub>2</sub>S üretiminin ölçülmesi**

PBS içerisinde yani homojenatsız ortamda ostolün, mikrosensör ile ölçülen H<sub>2</sub>S düzeylerini değiştirmemesi, ostolün H<sub>2</sub>S donörü olmadığını göstermektedir.

Aynı çözücüü kullanarak FKK homojenatlarında yaptığımız önceki çalışmamızda (Sevin ve diğerleri, 2022), çözücü varlığında L-sistein ile indüklenen maksimum H<sub>2</sub>S düzeylerinin 33.77±1.34 µM olduğu gösterilmiştir. Tez kapsamında ise bu değerin 32.85±1.64 µM olarak bulunması; FKK'de H<sub>2</sub>S üretiminden sorumlu enzimlerin aktivitesinin her iki çalışmada da benzer olduğunu ve laboratuvarımızda geliştirilen bu yöntemin tutarlı sonuçlar verdiğini ortaya koymaktadır.

Tez kapsamında FKK'de, ostolün kısa süreli inkübasyonunun (30 dk., akut etki), L-sistein ile uyarılan H<sub>2</sub>S sentezini arttırdığı; daha uzun süreli inkübasyonunun ise (24 saat, kronik etki), CSE ve CBS enzim ekspresyonlarını arttırdığı ve bu artışın enzim

aktivitesine yansıdığı gösterilmiştir. FKK dokularının 24 saat, FKK homojenatlarının 30 dk. süreyle ostol ile inkübasyonu kıyaslandığında, maksimum H<sub>2</sub>S düzeylerinin ve H<sub>2</sub>S üretim hızının inkübasyon süresiyle ilişkili olarak arttığı görülmüştür. FKK dokularının 24 saat, FKK homojenatlarının 30 dk. süreyle çözücü ile inkübasyonu kıyaslandığında ise L-sistein ile uyarılan maksimum H<sub>2</sub>S düzeylerinin ve H<sub>2</sub>S üretim hızının benzer olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, ostol ile inkübasyon süresi arttıkça H<sub>2</sub>S üretiminin de aynı oranda arttığını ortaya koymaktadır.

Hedegaard ve ark., sıçan mezenterik arterinde ekzojen H<sub>2</sub>S vasküler yanıtları alırken eş zamanlı olarak arter lümenine ve organ banyosuna yerleştirdikleri H<sub>2</sub>S mikrosensörleri ile H<sub>2</sub>S düzeylerini ölçmüşlerdir. Bu çalışmada, 300 µM konsantrasyonda uygulanan NaHS'nin, %61±1.9 gevşemeye neden olurken arter lümeninde 15.6±1.6 µM, organ banyosunda ise 6.5±0.5 µM serbest H<sub>2</sub>S olduğu bildirilmiştir (Hedegaard ve diğerleri, 2016).

Çalışmamızda SPA'da, çözücü varlığında, 300 µM Na<sub>2</sub>S'nin %33 gevşemeye neden olurken, eş zamanlı olarak ölçülen lümen içindeki H<sub>2</sub>S düzeyinin ise 25 µM olduğu bulunmuştur. SPA'dan elde ettiğimiz bulgular ile Hedegaard ve ark.'nın (2016) sıçan mezenterik arterinden elde ettikleri sonuçlar karşılaştırıldığında; 300 µM Na<sub>2</sub>S'nin, SPA'da daha az gevşemeye neden olduğu, ancak lümendeki H<sub>2</sub>S miktarının daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Bu gevşeme oranındaki değişiklik, iki arterin H<sub>2</sub>S'ye duyarlılığının farklı olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca, aynı konsantrasyonda uygulanan H<sub>2</sub>S donörü ile, SPA ve mezenterik arter lümenindeki H<sub>2</sub>S düzeylerinin farklı bulunması, arterlerin endojen H<sub>2</sub>S üretim düzeylerindeki farklılıktan ve SPA ile çalışırken kullanıldığımız H<sub>2</sub>S mikrosensörünün Hedegaard ve ark.'nın kullandığı klasik tip sensörden çok daha duyarlı olmasından kaynaklanabilir.

Çalışmamızda, ostolün 100 µM maksimum konsantrasyonda, SPA lümenine yerleştirilen H<sub>2</sub>S mikrosensörünün sinyalini, maksimum 363±35.46 nM'a yükselttiği, arter olmayan ortamda ise çözücü ile benzer şekilde 244.8±13.17 nM sinyal oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, ostolün SPA'daki bazal H<sub>2</sub>S üretimini arttırarak, çözücüye kıyasla daha yüksek sinyal oluşturduğunu göstermektedir. SPA lümeninde ostol varlığında oluşan H<sub>2</sub>S düzeylerinin, çözücü varlığında elde edilen H<sub>2</sub>S miktarından yaklaşık 140 nM fazla olduğu ve böylece ostolün %100'e yakın gevşemeye neden olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda, çözücü varlığında, L-sistein ile uyarılan H<sub>2</sub>S düzeyinin SPA lümeninde maksimum 87.13±11.95 nM olarak ölçüldüğü, 5 µM (EC<sub>50</sub>) ostol varlığında ise bu değerin 135.9±17.77 nM'a yükseldiği gösterilmiştir. Aradaki fark hesaplandığında, 5 µM ostolün, L-sistein ile uyarılan endojen H<sub>2</sub>S sentezini yaklaşık 48.77 nM arttırdığı anlaşılmaktadır. SPA lümenindeki (**Tablo 25**) ve FKK homojenatlarındaki (**Tablo 22**) H<sub>2</sub>S ölçümleri kıyaslandığında, ostolün L-sistein ile uyarılan H<sub>2</sub>S sentezini SPA'da nM düzeyde, FKK homojenatlarında ise µM düzeyde arttırdığı görülmektedir. Bu fark, FKK dokusundaki CSE ve CBS enzim düzeylerinin, mikroarter yapısındaki SPA'dan çok daha fazla olmasıyla ilişkili olabilir. Ayrıca, FKK homojenatlarının L-sistein ile 40 dk. inkübe edildiği ve bu sırada zamana bağlı üretimin izlendiği; SPA'de ise vasküler yanıtlar alınırken her bir konsantrasyonda yalnızca 2-3 dk. beklendiği göz ardı edilmemelidir.

5 µM ostol varlığında, SPA'dan alınan Na<sub>2</sub>S gevşeme yanıtları çözücüye kıyasla artmış ve eğri sola kaymıştır. Bu esnada eş zamanlı olarak ölçülen SPA lümenindeki H<sub>2</sub>S düzeyleri de ostol varlığında (309.3±28.94 µM), çözücüye kıyasla (224.5±44.66 µM) artmıştır. Na<sub>2</sub>S gevşemelerinin ostol varlığında artması, ostolün H<sub>2</sub>S alt mekanizmaları ile etkileştiğini düşündürse de; ostol varlığında, lümendeki H<sub>2</sub>S düzeyinin gevşemeyle eş zamanlı olarak artması, Na<sub>2</sub>S gevşemelerindeki bu artışın, ostolün endojen H<sub>2</sub>S üretimini arttırması ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, FKK'de ostolün, Na<sub>2</sub>S gevşemelerini arttırması ve bu artışın AOAA ile geri dönmesi; FKK'de de ostol aracılı endojen H<sub>2</sub>S üretiminin Na<sub>2</sub>S gevşemelerine katkısını göstermektedir. Bu sonuçlar, ostolün endojen H<sub>2</sub>S sentezini arttırarak, ekzojen H<sub>2</sub>S'nin, K<sup>+</sup> kanal aktivasyonu, sGC aktivasyonu, PDE-5 inhibisyonu gibi alt mekanizmalar üzerinden gösterdiği etkiyi güçlendirdiğini ortaya koymaktadır. Hedegaard ve ark.'nın çalışmasında da benzer bir sonuçla karşılaşmış, Na<sub>2</sub>S uygulandığında sıçan mezenterik arter lümenindeki H<sub>2</sub>S düzeylerinin, organ banyosundakine kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Hedegaard ve diğerleri, 2016). Bu durum da endojen H<sub>2</sub>S üretiminin katkısının bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Sonuçlarımız, ostolün SPA'da, hem bazal hem de L-sistein ile uyarılan H<sub>2</sub>S üretimini arttırarak gevşetici etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. FKK homojenatlarının 30 dk. ostol ile inkübasyonu sonrasında bazal H<sub>2</sub>S düzeylerinin değişmemesi, bu deneylerde kullanılan klasik tip H<sub>2</sub>S mikrosensörün ancak µM düzeyde ölçüm

yapabilmesi nedeniyle bazal seviyelerdeki artışı tespit edememesinden kaynaklanabilir. Ancak FKK dokularının 24 saat ostol ile inkübasyonu sonrası yapılan ölçümlerde, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da ostol konsantrasyonu ile orantılı olarak bazal H<sub>2</sub>S seviyelerinin bir miktar arttığı dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda, SPA'dan, ostol, L-sistein ve Na<sub>2</sub>S vasküler yanıtları alınırken, ilk kez lümendeki endojen H<sub>2</sub>S üretimi vasküler yanıtlarla eş zamanlı olarak ölçülmüştür. Literatür incelendiğinde, vasküler yanıtlarla eş zamanlı olarak damar lümeninde endojen H<sub>2</sub>S üretiminin veya herhangi bir gazotransmitterin ölçüldüğü bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu metodoloji, araştırmamızın bilimsel alandaki özgünlüğünü oluşturmakta ve yenilikçi bir yaklaşım sunmaktadır.

Tez kapsamında ostolün neden olduğu H<sub>2</sub>S artışı, klinik çalışmalar açısından da tartışılabilir: Sağlıklı insan kan plazmasındaki serbest H<sub>2</sub>S düzeylerinin  $1.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$  olduğu (Tan ve diğerleri, 2017), vasküler hastalığı olanlarda  $368.53 \pm 20.87 \text{ nM}$ 'dan  $441.04 \pm 15.40 \text{ nM}$ 'a yükseldiği (Peter ve diğerleri, 2013) ve son dönem kalp yetmezliği olan hastaların serumunda ise yaklaşık  $0.2 \mu\text{M}$ 'dan  $0.1 \mu\text{M}$ 'a düştüğü gösterilmiştir (Polhemus, Calvert, Butler ve Lefer, 2014). Hastalık koşullarında, H<sub>2</sub>S düzeylerindeki değişikliklerin kardiyovasküler hastalığın türü/şiddeti gibi birçok faktöre bağlı olduğu görülmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken, insan serumundaki/plazmasındaki bazal serbest H<sub>2</sub>S düzeylerinin ( $0.1\text{-}1.3 \mu\text{M}$ ) ostolün neden olduğu H<sub>2</sub>S artış düzeyleri ile benzer olmasıdır. Bu klinik çalışmalardan, bazal H<sub>2</sub>S düzeylerindeki  $100\text{-}200 \text{ nM}$ 'lık değişimin H<sub>2</sub>S'nin fonksiyonu açısından son derece önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle ostolün serbest H<sub>2</sub>S düzeylerinde oluşturduğu  $50\text{-}100 \text{ nM}$ 'lık artışın ED başta olmak üzere, birçok vasküler hastalığın tedavisinde yararlı olabileceği açıktır.

Literatürde ostol gevşemelerinin, endotel fonksiyonu/NO üretimi ve NO alt mekanizmaları ile ilişkili olduğu bildirildiğinden, tez kapsamında ostolün NO ile ilişkili gevşetici etkilerine H<sub>2</sub>S'nin katkısı; izole organ banyosu deneyleriyle araştırılmış ve aşağıdaki başlıklar altında tartışılmıştır:

- Ostol gevşemelerinde NO'nun rolü
- Ostol gevşemelerinin NO ve H<sub>2</sub>S alt mekanizmaları ile ilişkisi
- H<sub>2</sub>S-NO ilişkisi
- Ostolün NO ile ilişkili gevşetici etkisine H<sub>2</sub>S'nin katkısı
- Ostol gevşemelerinde K<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup> kanallarının rolü
- Ostolün K<sup>+</sup> kanalları ile ilişkili gevşetici etkilerinde H<sub>2</sub>S'nin rolü

### **Ostol gevşemelerinde NO'nun rolü**

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda FKK'de ve SPA'da ostol gevşemeleri, sırasıyla 100 µM ve 300 µM L-NAME varlığında bir miktar inhibe olmuş ancak gevşemeler tamamen geri dönmemiştir.

Chen ve ark.'nın TKK'da yaptıkları bir çalışmada, endotelin sıyrılması, konsantrasyona bağlı ostol gevşemelerini bir miktar inhibe etmiş ancak E<sub>maks</sub>'ı (%100) değiştirmemiştir. 100 µM L-NAME inkübasyonu, ostole bağlı gevşemeleri değiştirmezken, L-NAME konsantrasyonunun 300 µM'a çıkartılması, ostol gevşemelerini inhibe etmiş (E<sub>maks</sub>≈%70) fakat yine de ostol gevşemeleri tamamen bloke olmamıştır (J. Chen ve diğerleri, 2000). Bahsedilen çalışmada, L-NAME ile ostolün maksimum gevşetici etkisinde gözlenen yaklaşık %30'luk inhibisyon, çalışmamızda FKK'de L-NAME (100 µM) ile elde edilen inhibisyon oranı (%29.1) ile benzerdir. Çalışmamızda ayrıca FKK'deki ACh gevşemeleri, ostol varlığında yaklaşık %33 oranında artmıştır. Ostolün korpus kavernozumdaki gevşetici etkisinde endotelyumun/NOS'ların rol oynadığı (yaklaşık %30) ancak gevşetici etkinin tamamından sorumlu olmadıkları çıkarımı yapılabilir.

Çalışmamızda, TKK'ya benzer şekilde (J. Chen ve diğerleri, 2000), önce 100 µM L-NAME denenmiş, bu konsantrasyonun ostolün SPA'da oluşturduğu gevşemeleri inhibe etmekte yetersiz kalması üzerine (sonuçlar gösterilmemiştir) konsantrasyon 300 µM'a çıkartıldığında inhibisyon görülmüştür. 300 µM L-NAME'in, SPA'da konsantrasyona bağlı ostol gevşemelerini ve pD<sub>2</sub> değerlerini azalttığı ancak E<sub>maks</sub>'ı değiştirmedeği saptanmıştır.

Ko ve ark. tarafından sıçan aortasında yapılan bir çalışmada, 200  $\mu$ M ostol gevşemelerinin endotelin sıyrılmasıyla çok düşük düzeyde (%17) inhibe olduğu bildirilmiştir (Ko ve diğerleri, 1992). Yao ve arkadaşları tarafından insan ve sıçan pulmoner arterleri üzerinde yapılan çalışmalarda ise arterlerde endotelyumun sıyrılması ve L-NAME inkübasyonu, ostol gevşemelerini inhibe etmiştir. Pulmoner arteriyel endotel hücrelerinde floresan indikatör ile ölçülen NO salıverilmesi, ostol (5  $\mu$ M) ile 2. dakikadan itibaren artarak 120 dakika boyunca yüksek düzeyde kalmıştır. Bu çalışmada ostolün gevşetici etki mekanizması, PI<sub>3</sub>K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu aracılığıyla Akt (protein kinaz B) ve eNOS proteinlerinin fosforilasyonuna neden olması ve dolayısıyla NO sentezini arttırması ile açıklanmıştır (L. Yao ve diğerleri, 2013).

Tez kapsamında, ostol gevşemelerinin hem FKK'de hem de SPA'da L-NAME ile bir miktar inhibe olması ve ayrıca ostolün FKK'de ACh gevşemelerini arttırması; literatürle uyumlu olarak ostol gevşemelerine endotelyumun/NOS'ların katkısını göstermektedir. Bununla birlikte çalışmamızda ostol gevşemelerinin L-NAME ile tamamen inhibe olmaması, ostol gevşemelerinde farklı mekanizmaların rol oynadığını ortaya koymaktadır.

### **Ostol gevşemelerinin NO ve H<sub>2</sub>S alt mekanizmaları ile ilişkisi**

Kobay trakeasında yapılan bir çalışmada ostol inkübasyonu, forskolin (adenilat siklaz aktivatörü) ve SNP ile indüklenen cAMP/cGMP oluşumunu ve dolayısıyla gevşemeleri arttırmıştır. Ostolün yüksek konsantrasyonda (100  $\mu$ M) kendisinin cAMP ve cGMP oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ostol varlığında konsantrasyona bağlı olarak cAMP ve cGMP PDE'ler inhibe olmuştur (Teng ve diğerleri, 1994).

İnsan havayolu düz kas hücrelerinde, cAMP'ye bağlı lusiferaz raportör deneylerinde (luciferase reporter assay), 0.1  $\mu$ M ostol, cAMP düzeylerini 3.2 kat arttırmıştır. Ostolün *in vitro* (0.1-10  $\mu$ M), *in vivo* (2.5 mg/ml) ve *ex vivo* (3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) çalışmalarda PDE4 enzimini inhibe ederek bronkodilatör etki gösterdiği bildirilmiş ve ostolün bu etkisini PDE4D5'in katalitik domainine bağlanarak oluşturduğu kristalografik çalışmalarla kanıtlanmıştır (S. Wang ve diğerleri, 2020).

Çalışmamızda FKK'de, 0.3  $\mu$ M SNP'nin yaklaşık %32 gevşemeye neden olduğu, gösterilmiştir. Bu sonuç, Chen ve ark. (2000) tarafından TTK'den elde edilen bulgu

ile aynıdır. Tez kapsamında, 20  $\mu\text{M}$  ostolün ( $\text{EC}_{50}$ ) FKK'de, konsantrasyona bağı SNP gevşemelerini ve ayrıca  $E_{\text{maks}}$ 'ı arttırdığı tespit edilmiştir. Chen ve ark.'nın çalışmasında, 3  $\mu\text{M}$  ostolün ( $\text{EC}_{50}$ ) endoteli sıyrılmış TKK'da SNP konsantrasyon-yanıt eğrisini sola kaydırıldığı, konsantrasyona bağı gevşemeleri çalışmamızdakine benzer şekilde arttırdığı, buna karşın maksimum gevşemeyi değıştirmedığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada,  $\text{EC}_{50}$  değıerinin çok üstündeki bir konsantrasyonda ostol (30  $\mu\text{M}$ ) uygulandığında, SNP (0.3  $\mu\text{M}$ ) gevşemesinin 3 katına çıktığı bildirilmiştir. Ayrıca endoteli sıyrılmış TKK'da, zaprinast (cGMP spesifik PDE inhibitörü) ile birlikte inkübe edildiğinde ostolün, SNP gevşemelerini arttırıcı etkisi ortadan kaybolmuştur. Ostol, düşük konsantrasyonlarda (1-10  $\mu\text{M}$ ), forskolin gevşemesini değıştirmezken, yüksek konsantrasyonda (30  $\mu\text{M}$ ), forskolin gevşemelerini iki kat arttırmıştır. Bu durum ostolün yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında, cAMP ve cGMP için non-spesifik PDE inhibisyonu yapabileceğini göstermektedir (J. Chen ve diğeri, 2000).

Ostolün, SNP gevşemelerini arttırması, sGC, PKA, PDE gibi NO alt mekanizmaları üzerinden gevşetici etki gösterdiğine işaret etmektedir. Bu alt mekanizmalardan sGC'nin etkisini araştırmak amacıyla çalışmamızda FKK'de, sGC inhibitörü ODQ varlığında ostol gevşemeleri alınmış, ostole bağı maksimum gevşemeler, ODQ ile %26.5 oranında inhibe olmuş ve böylece sGC'nin, ostolün gevşetici etkisinde rol oynadığı ortaya konmuştur. Chen ve ark.'nın (2000) TKK'daki çalışmasında, maksimum ostol yanıtlarının ODQ ile yaklaşık %30 inhibe olduğunun gösterilmesi çalışmamızın sonuçlarıyla benzerdir. Ayrıca Ko ve ark. (1992) tarafından sıçan aortasında yapılan çalışmada, ostole bağı gevşemelerdeki ve cGMP düzeyindeki artışının metilen mavisi ile inhibe olması tez kapsamında elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir.

Literatürde ostole bağı gevşemelerin etki mekanizmasını aydınlatmak üzere yapılan tüm çalışmalarda, ostolün konsantrasyonu yükseldikçe, non-spesifik PDE inhibitörü etki gösterdiği ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda ise kendisinin cAMP ve cGMP düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir. Bu sonuçlardan, ostolün konsantrasyonu arttıkça, birden fazla mekanizma üzerinden gevşetici etki gösterebileceği çıkarımı yapılabilir. Ostolün  $\text{H}_2\text{S}$  alt mekanizmaları ile ilişkili olarak  $\text{Na}_2\text{S}$  gevşemelerini arttırıcı etkisi, yukarıda 'Ostolün gevşetici etkisinde  $\text{H}_2\text{S}$ 'nin rolü' başlığı altında tartışıldığından burada bir kez daha değinilmemiştir.

## **H<sub>2</sub>S ve NO ilişkisi**

Literatürde H<sub>2</sub>S-NO etkileşiminin araştırıldığı birçok çalışmadan elde edilen bulgular birbirleriyle çelişkilidir. Ancak son yıllarda, H<sub>2</sub>S'nin ve NO'nun birbirlerinin üretimini/aktivitelerini destekleyici bir etkileşim içerisinde oldukları vurgulanmaktadır.

Sıçan korpus kavernozaumu ile yapılan bir çalışmada, NaHS inkübasyonunun eNOS mRNA/protein ekspresyonunu ve NO üretimini arttırdığı gösterilerek ekspresyondaki bu artışın NOS aktivitesine yansıdığı ortaya konmuştur (Meng ve diğerleri, 2012). Olivencia ve ark. tarafından C57BL/6 farelerle yapılan bir çalışmada, CSE knockout farelerden (CSE<sup>-/-</sup>) izole edilen FKK'de, eNOS/NO/sGC/PDE yolağının fonksiyonunun bozulduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, CSE<sup>-/-</sup> FKK'den alınan ACh gevşemeleri ile fosforile eNOS ve NO düzeyleri azalmıştır. CSE<sup>-/-</sup> farelerde, sGC/cGMP yolağı ile ilişkili gevşemeler azalmış ve yapılan ileri çalışmalarda korpus kavernozaumda endojen H<sub>2</sub>S'nin, sGC'nin redoks durumunu düzenlemede görev aldığı rapor edilmiştir (Olivencia ve diğerleri, 2023). Zhou ve ark. tarafından yapılan çalışmada benzer şekilde, C57Bl farelerinden elde edilen aortada, ekzojen H<sub>2</sub>S'nin, sGC'nin redoks durumunu modüle ettiği ve H<sub>2</sub>S'nin, sGC'nin hem demirini ferrik (Fe<sup>+3</sup>, NO bağlanamayan) halden, ferröz (Fe<sup>+2</sup>, NO bağlanmasına uygun) hale indirgediği bildirilmiştir (Z. Zhou ve diğerleri, 2016).

La Fuente ve arkadaşlarının insan penil arteri (İPA) ve İKK üzerinde yaptıkları çalışmada, NaHS'e bağlı gevşemeler, cGMP düzeyindeki artış ve L-sisteine bağlı gevşeme yanıtları ODQ varlığında inhibe olmuştur. İPA'da L-sistein inkübasyonu, ACh ve sildenafil gevşemelerini arttırmış ve bu etki CSE/CBS enzim inhibisyonu ile ortadan kalkmıştır (La Fuente ve diğerleri, 2019). Sıçan torasik aortasında yapılan başka bir çalışmada, ACh ve SNP gevşemeleri, PAG ve CBS inhibitörü β-siyano-L-alanin (BSLA) varlığında sağa kaymıştır; PAG/BSLA, cGMP düzeylerini azaltmış ve ekzojen H<sub>2</sub>S/CSE over-ekspresyonu azalan cGMP seviyelerini yükseltmiştir. PDE inhibitörü 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX) varlığında, H<sub>2</sub>S'nin cGMP düzeylerini arttırıcı etkisi inhibe olmuştur (Bucci ve diğerleri, 2010).

Coletta ve ark., endotel hücrelerini H<sub>2</sub>S ile inkübe ettiklerinde, PI3K/Akt yolağının aktivasyonu aracılığıyla NO üretiminin, cGMP ve aktif PKG düzeylerinin arttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada, CSE inhibisyonu, NO ile uyarılan cGMP oluşumunu engellemiş ve ACh kaynaklı gevşemeleri azaltmıştır (Coletta ve diğerleri, 2012).

CSE knockout farelerde, eNOS tarafından üretilen NO düzeylerinin azaldığı ve bu farelerde görülen oksidatif stres ve miyokart hasarının ekzojen H<sub>2</sub>S tedavisi ile eNOS fonksiyonunun/NO seviyelerinin artmasına bağlı olarak iyileştiği gösterilmiştir (King ve diğerleri, 2014).

Yukarıda bahsedilen tüm çalışmalar tez kapsamında, FKK'den elde edilen H<sub>2</sub>S-NO ilişkisini destekler niteliktedir. FKK'de, ACh gevşemelerinin AOAA varlığında inhibe olması, endojen H<sub>2</sub>S'nin, NO sentezini arttırdığını göstermektedir. Aydınoglu ve ark. tarafından Swiss albino FKK'de yapılan bir çalışmada, çalışmamıza benzer şekilde AOAA, ACh gevşemelerini inhibe etmiştir (yaklaşık %35) (Aydinoglu, Dalkir, Demirbag ve Ogulener, 2017). Tüm bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, H<sub>2</sub>S'nin PI<sub>3</sub>K/Akt/eNOS yolağı üzerinden NO sentezini ve ayrıca NO alt mekanizmalarından sGC'ı aktive ederek cGMP düzeylerini arttırdığı anlaşılmaktadır.

### **Ostolün NO ile ilişkili gevşetici etkilerinde H<sub>2</sub>S'nin rolü**

FKK'de ACh yanıtlarının ostol varlığında artması ve bu artışın AOAA ile inhibe olması, ostolün NO sentezini arttırıcı etkisinin bir kısmını H<sub>2</sub>S üretimini arttırarak gösterdiğini ortaya koymaktadır. Hem ostolün (Yan, Li, Li, Lin ve Yang, 2017) hem de H<sub>2</sub>S'nin (Coletta ve diğerleri, 2012; Meng ve diğerleri, 2012; Olivencia ve diğerleri, 2023) PI<sub>3</sub>K/Akt/eNOS yolağını aktive ettiğini gösteren çalışmalar; ostolün H<sub>2</sub>S sentezini arttırarak bu yolak üzerinden NO üretimini arttırabileceği fikrini desteklemektedir.

Tez kapsamına yapılan çalışmalarda, ostolün FKK'de, Na<sub>2</sub>S ve SNP yanıtlarını arttırdığı ve bu etkinin AOAA varlığında geri döndüğü gösterilmiştir. Böylece ostolün H<sub>2</sub>S ve NO alt mekanizmaları üzerinden gösterdiği gevşetici etkiye endojen H<sub>2</sub>S üretimini arttırmasının katkı sağladığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, ostolün, SPA'da Na<sub>2</sub>S gevşemelerini ve eş zamanlı olarak arter lümenindeki H<sub>2</sub>S düzeylerini arttırması, ostolün endojen H<sub>2</sub>S üretimini arttırarak, ekzojen H<sub>2</sub>S'nin alt mekanizmalar üzerindeki etkisini güçlendirdiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda, FKK'de ostol gevşemelerinin sGC inhibitörü ODQ ile geri döndüğüne yukarıda değinilmişti. Literatürde sGC'nin H<sub>2</sub>S gevşemelerinde rol oynadığına (La Fuente ve diğerleri, 2019; Olivencia ve diğerleri, 2023; Z. Zhou ve diğerleri, 2016) ve H<sub>2</sub>S gevşemelerinde rol oynamadığına (Di Villa Bianca ve

diğerleri, 2009; Kubo ve diğerleri, 2007) dair çelişkili sonuçlar yer almaktadır. Bu nedenle ostolün, sGC aktivitesini arttırıcı etkisinde, H<sub>2</sub>S'nin rolünü araştırmak amacıyla ilk olarak FKK'den ODQ varlığında/yokluğunda Na<sub>2</sub>S gevşemeleri alınmıştır. Çalışmamızda, ODQ, Na<sub>2</sub>S'ye bağlı gevşemeleri %24.9 oranında inhibe etmiştir. ODQ ile Na<sub>2</sub>S gevşemelerinde görülen bu inhibisyonun, ostol gevşemelerinde görülen inhibisyon oranı (%26.5) ile benzer olması, ostolün H<sub>2</sub>S aracılığıyla sGC enzimini aktive edebileceğini indirekt yolla göstermektedir. Bu etki ile ilişkili diğer bir olasılık ise, ostolün literatürde sıklıkla rastlanan PDE inhibitörü etkinliği (J. Chen ve diğerleri, 2000; Teng ve diğerleri, 1994; S. Wang ve diğerleri, 2020) ile cGMP düzeylerini arttırarak gevşetici etki göstermesi ve sGC inhibitörü varlığında bu gevşemelerin azalmasıdır. H<sub>2</sub>S'nin de PDE enzim inhibitörü olduğu bilinmektedir (Bucci ve diğerleri, 2010), bu nedenle ostolün PDE enzimini, H<sub>2</sub>S sentezini arttırarak inhibe edebileceği düşünülebilir. Ostolün, PDE enzimi üzerindeki etkisi ve H<sub>2</sub>S ile ilişkisi diğer bir araştırma konumuzu oluşturmaktadır.

#### **Ostol gevşemelerinde K<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup> kanallarının rolü**

K<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup> kanalları, H<sub>2</sub>S ve NO için ortak alt mekanizmalar olduğundan, bu kanalların ostol gevşemelerindeki rolü de tez kapsamında araştırılmıştır.

Çalışmamızda ostol gevşemelerinin, KPSS ile kastırılmış SPA'da, fen ile kastırılmış SPA'dan daha az olduğu ve K<sup>+</sup> konsantrasyonu arttıkça gevşemenin azaldığı gösterilmiştir. Maksimum ostol gevşeme yanıtları değişmemiş ancak KPSS ön-kastırmasında ostol gevşemelerine ilişkin pD<sub>2</sub> değerleri azalmıştır. Chen ve ark. tarafından TKK'da yapılan çalışmada, ostole bağlı gevşemelerin, KCl ile kastırılan TKK'da, fen ile kastırılana kıyasla yarı yarıya azalması, bulgularımızı desteklemektedir (J. Chen ve diğerleri, 2000). Tez kapsamında elde edilen bulgular ile bu çalışmanın sonuçları bir arada değerlendirildiğinde, ostolün gevşetici etkilerinde K<sup>+</sup> kanallarının rol oynadığı sonucuna varılmaktadır.

Çalışmamızda, ostolün FKK'yi gevşetici etkisi, glibenklamid (K<sub>ATP</sub> kanal inhibitörü, 10 µM) varlığında inhibe olmuştur. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak, Teng ve ark. tarafından kobay trakeasında yapılan bir çalışmada ise ostol gevşemeleri, glibenklamidden (10 µM) etkilenmemiş ve ostol inkübasyonu kromakalim (K<sub>ATP</sub> kanal açıcı) gevşemelerini değiştirmemiştir (Teng ve diğerleri, 1994). Bulgularımızın bu çalışmadan farklı olması, hayvan türüne özgü yanıtların farklılığından,

trakea/korpus kavernozum dokularının farklı moleküler yapılar/efektörler içermelerinden ve  $K_{ATP}$  düzeyindeki/fonksiyonundaki değişikliklerden kaynaklanabilir.

Ostolün SPA'yı gevşetici etkisinde  $BK_{Ca}$  ve  $KV_7$  kanallarının rolü, ilk kez çalışmamız kapsamında araştırılmıştır. Ostol gevşemelerinin iberitoksin ve linopirdin ile inhibe olması,  $BK_{Ca}$  ve  $KV_7$  kanallarının ostole bağlı gevşeme yanıtlarında rol oynadığını göstermektedir.

Sıçan torasik aortasında (Ko ve diğerleri, 1992) ve kobay trakeasında (Teng ve diğerleri, 1994) yapılan çalışmalarda, ostol,  $Ca^{+2}$  kasılmalarını konsantrasyona bağlı inhibe etmiş ve 100  $\mu M$  konsantrasyondaki ostol bu kasılmaları tamamen ortadan kaldırmıştır. Sıçan aortasında,  $Na^+$ ya ve yüksek  $K^+$ ya bağlı  $^{45}Ca^{+2}$  influksü, ostol ile konsantrasyona bağlı olarak inhibe olmuştur (Ko ve diğerleri, 1992). Fusi ve arkadaşları tarafından sıçan kuyruk arteri miyositleri ile patch-clamp tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada, ostolün  $Cav1.2$  kanallarını (voltaja bağlı kalsiyum kanalları) inaktif durumda stabilize eden bir antagonist olduğu sonucuna varılmıştır (Fusi ve diğerleri, 2012). Ayrıca ostolün, izole kobay sol atriumunda da kalsiyum kanallarını inhibe ederek kasılmayı azalttığı bildirilmiştir (L. Li ve diğerleri, 1995). Ostolün  $Ca^{+2}$  kanalları üzerinden gösterdiği bu etkilerin,  $K^+$  kanallarını açıcı özelliğiyle ilişkili olabileceği düşünülmekte ve bu konu gelecekteki araştırmalarımızın konusunu oluşturmaktadır.

### **Ostolün $K^+$ kanalları ile ilişkili gevşetici etkilerinde $H_2S$ 'nin rolü**

Abd Elmoneim ve ark. tarafından Wistar sıçan korpus kavernozumunda yapılan bir çalışmada,  $Ca^{+2}$  ile aktive olan  $K^+$  kanallarının genel inhibitörü tetraetilamonyum (TEA) ve  $K_V$  kanal inhibitörü 4-Aminopiridin (4-AP) varlığında L-sistein ile uyarılan  $H_2S$  sentezi değişmemiş ve L-sisteine bağlı gevşemeler inhibe olmuştur. Glibenklamid (10  $\mu M$ ) varlığında ise L-sistein gevşemeleri değişmemiştir (Abd Elmoneim ve diğerleri, 2017). Ghasemi ve ark. tarafından Sprague Dawley sıçan korpus kavernozumunda yapılan başka bir çalışmada, glibenklamid (100  $\mu M$ ), NaHS gevşemelerini inhibe etmiştir (Ghasemi, Dehpour, Moore ve Mani, 2012). İKK'da yapılan bir çalışmada da glibenklamidin (150  $\mu M$ ) NaHS gevşemelerini inhibe ettiği ve bu gevşemelerin, KCl ile kastırılan İKK'da fen ile kastırılana göre azaldığı bildirilmiştir (Di Villa Bianca ve diğerleri, 2009). Bu sonuç NaHS gevşemelerinin  $K^+$

kanalları ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Fuente ve ark., KCl ile kastırılan İKK'da, fen ön-kastırmasına kıyasla, NaHS gevşemelerinin azaldığını bildirmişlerdir. İKK'da ve İPA'da NaHS gevşemeleri, glibenklamid (10  $\mu$ M) varlığında değişmezken, TEA varlığında bir miktar inhibe olmuştur (La Fuente ve diğerleri, 2019).

Jupiter ve ark., Sprague Dawley sıçanlarda, intrakavernöz Na<sub>2</sub>S uygulamasının, erektil fonksiyonun göstergesi olan intrakavernöz basınç (İKB)/ortalama arteriyel basınç (OAB) oranını arttırdığını göstermişlerdir. Na<sub>2</sub>S ile artan İKB/OAB, glibenklamid varlığında değişmezken, TEA ve iberitoksin ile azalmıştır (Jupiter ve diğerleri, 2015). İnsan uterin arteri ile yapılan bir çalışmada iberitoksinin, NaHS gevşeme yanıtını inhibe ettiği gösterilmiştir (Yan Li ve diğerleri, 2020). Hedegaard ve ark.'nın Wistar sıçan mezenterik arterinde yaptıkları bir çalışmada, NaHS gevşemeleri, iberitoksinle etkilenmemiş, ancak TEA ve linopirdin ile inhibe olmuştur (Hedegaard ve diğerleri, 2016).

Literatürde, korpus kavernoza/penil dokuda H<sub>2</sub>S'ye bağlı gevşemelerin BKCa ve KV<sub>7</sub> kanalları ile ilişkisinin araştırıldığı izole organ banyosu çalışmalarına rastlanmamıştır. Ancak yukarıda bahsi geçen diğer vasküler dokularda yapılan çalışmalardan, bu kanalların hayvan türüne/dokuya özgü olarak H<sub>2</sub>S gevşemelerinde rol oynayabileceği anlaşılmaktadır. Bu çalışmalarda, glibenklamidin yüksek konsantrasyonda uygulandığı koşullarda H<sub>2</sub>S ile ilişkili gevşemeleri inhibe ettiği, daha düşük konsantrasyonlarda ise etkisiz olduğu dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda ostolün K<sub>ATP</sub> kanalları üzerinden gösterdiği etkinin H<sub>2</sub>S ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Ancak K<sub>ATP</sub> kanallarının, H<sub>2</sub>S'nin gevşetici etkisindeki rolüne ilişkin yukarıda bahsedilen türe/dokuya/konsantrasyona bağlı farklılıklar nedeniyle; ilk olarak bu kanalların, H<sub>2</sub>S'nin FKK'yi gevşetici etkilerindeki rolü araştırılmıştır. Bu amaçla, glibenklamid (10  $\mu$ M) varlığında Na<sub>2</sub>S gevşemeleri alınmıştır. Glibenklamid ile Na<sub>2</sub>S gevşemelerinin inhibe olması, K<sub>ATP</sub> kanallarının, H<sub>2</sub>S'nin FKK'yi gevşetici etkisinde rol oynadığını ortaya koymaktadır. Çalışmamıza benzer şekilde Aydınoglu ve ark. tarafından da FKK'de H<sub>2</sub>S gevşemelerinin düşük konsantrasyonda uygulanan glibenklamid (10  $\mu$ M) ile inhibe olduğu bildirilmiştir (Aydınoglu ve Ogulener, 2016). Glibenklamid varlığında, ostol gevşemelerinin benzer şekilde inhibe olması; ostolün H<sub>2</sub>S sentezini artırarak K<sub>ATP</sub> kanallarını aktive edebileceğini indirekt olarak göstermektedir.

Çalışmamızda ostolün, SPA'da BKCa ve KV<sub>7</sub> kanalları üzerinden gevşetici etki gösterdiği yukarıda 'Ostol gevşemelerinde K<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup> kanallarının rolü' başlığı altında tartışılmıştı. Bu kanalların, H<sub>2</sub>S ve NO yanıtları için ortak alt mekanizmalar (S. G. Comerma-Steffensen ve diğerleri, 2017; Kida ve diğerleri, 2013; Yan Li ve diğerleri, 2020; Martelli ve diğerleri, 2013) olduğu bilindiğinden, ostolün hem H<sub>2</sub>S hem de NO sentezini arttırarak düz kasta yer alan bu kanalları aktive edebileceği düşünülebilir. Bir diğer olasılık ise ostolün bu kanalları doğrudan etkileyerek gevşetici etki göstermesidir. Bununla birlikte, BKCa ve KV<sub>7</sub> kanallarının endotelde yer aldığı ve bu kanalların Ca<sup>+2</sup> seviyelerini arttırarak Ca<sup>+2</sup>/Kalmodulin aracılığıyla NO sentezini arttırdığı gösterilmiştir (Baldwin, Sandow, Mondéjar-Parreño, Stott ve Greenwood, 2020; Vang, Mazer, Casserly ve Choudhary, 2010). Ayrıca, CSE ve CBS enzimlerinin Ca<sup>+2</sup>/kalmodulin seviyelerine duyarlı olduğunu bilindiğinden (Osmond ve Kanagy, 2014), ostolün, NO ve H<sub>2</sub>S sentezini artırmasının endoteldeki K<sup>+</sup> kanallarıyla ilişkili olabileceği düşünülmekte ve ileride yapmayı planladığımız çalışmanın konusunu oluşturmaktadır.

### **Ostolün gevşetici etkisi ile ilişkili *in vivo* çalışmalar**

Ogawa ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada diyet ile uygulanan ostolün (50 mg/kg/gün), spontan hipertansif sıçanlarda, 3. haftadan itibaren sistolik kan basıncındaki artışı engellediği bildirilmiştir (Ogawa, Sasai, Kamisako ve Baba, 2007). Ostolün sıçanlara gastrik gavaj ile 80 mg/kg/gün (28 gün) (L. Yao ve diğerleri, 2018); 10 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün (35 gün) (Zhu ve diğerleri, 2021); 10 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün (28 gün) (Yeli Li ve diğerleri, 2017) dozlarda ve sürelerde uygulandığında, monokrotalin ile oluşturulan pulmoner arter hipertansiyonu modelinde, pulmoner arter basıncını azalttığı, sağ ventriküler hipertrofiyi iyileştirdiği ve vasküler yeniden yapılanmayı inhibe ettiği gösterilmiştir. Literatürde, ostolün erektile fonksiyonu arttırıcı etkisi ile ilişkili *in vivo* bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda 1 mg/kg üzerindeki dozlarda ostolün erektile fonksiyonu arttırdığı ve spontan ereksiyona neden olduğu ön denemelerle gösterilmiştir. Literatürdeki *in vivo* vasküler gevşetici etki gösteren ostol dozlarının, çalışmamızda etki gördüğümüz 1 mg/kg dozdan daha yüksek olmasının, akut iv uygulama ile oral uygulama arasındaki farmakokinetik farklılıktan kaynaklandığı açıktır. Tez kapsamında yapılan *in vivo* çalışmalarda henüz istatistiksel analiz

yapılabilecek hayvan sayısına (n=2) ulaşılmadığından, bu konudaki deneylerimiz devam etmektedir.

### **Ostolün ilaç olabilme potansiyeli ile ilişkili farmakokinetik profili ve fizikokimyasal özellikleri**

SwissADME uygulamasına göre, ostol bileşiğinin Lipinski'nin 5 kuralına uyduğu ve yeterli biyoyaralanıma sahip olduğu gösterilmiştir. Böylece ostolün, ilaç benzeri kriterlerle uyumlu - ve olumlu fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (Daina, Michielin ve Zoete, 2017).

Zhou ve ark. bulutlanma noktası ekstraksiyonu kullanarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemiyle, Wistar sıçanların plazmasındaki ostol seviyelerini belirlemişlerdir. Bu çalışmada, ostolün %26.8 gibi kabul edilebilir bir biyoyaralanıma sahip olduğu, oral yolla uygulandıktan sonra hızla sistemik dolaşıma geçtiği ve maksimum konsantrasyona 30 dakika içinde ulaştığı bildirilmiştir. Sıçanlarda, intravenöz (8 mg/kg) ve oral (40 mg/kg) yolla uygulanan ostolün yarılanma ömrü benzer bulunmuştur ( $t_{1/2}$ =5.06 ve 5.26 saat). Bu sonuçlar, uygun dozdaki oral ostol uygulamasının, intravenöz yolla yapılabilecek etkinliği gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bu da ostolün hem pratik uygulamada hem de maliyet açısından yararlı bir ilaç adayı olabilme potansiyeline işaret etmektedir. Ostolün iv uygulama sonrası  $C_{maks}$  değerinin  $4.35 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$  olduğu, oral uygulama sonrasında ise  $2.72 \pm 0.89 \mu\text{g/mL}$  olduğu bildirilmiştir (J. Zhou, Wang ve Sun, 2008). Bu değerler, konsantrasyon cinsinden hesaplandığında, sırasıyla 17.81  $\mu\text{M}$  ve 11.13  $\mu\text{M}$  ostole karşılık gelmektedir. Sonuç olarak, ostolün sıçanlardaki plazma konsantrasyonu, çalışmamızda ostolün *ex vivo* gevşetici etkisini incelediğimiz konsantrasyon aralığı içerisinde yer almakta ve plazma konsantrasyonunun elde ettiğimiz  $EC_{50}$  değerine yakınlığı dikkat çekmektedir.

## Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda ilk kez pudendal arterden  $\text{Na}_2\text{S}$ , L-sistein ve ostol gevşeme yanıtları alınmıştır. Böylece, ostolün pudendal arter üzerindeki gevşetici etkisinin yanı sıra bir gazotransmitter olan  $\text{H}_2\text{S}$ 'nin bu arterin vasküler fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı ilk kez gösterilmiştir. Çalışmamızın bulguları, ostolün  $\text{H}_2\text{S}$  sentezini arttırarak hem endotele bağlı NO üretimine katkı sağladığını hem de endotelden bağımsız mekanizmalar aracılığıyla gevşemeye neden olduğunu ve sonuç olarak erektil fonksiyonu iyileştirdiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışma, preklinik ve klinik araştırmalar için, ostolün özellikle NO/ $\text{H}_2\text{S}$  biyoyararlanımının bozulduğu durumların tedavisinde önemli bir terapötik ajan olarak değerlendirilme potansiyelini ortaya koymaktadır. Ancak ostolün, NO ve  $\text{H}_2\text{S}$  sentezini arttırıcı etkisini hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği bu tez kapsamı dışında gelecekteki çalışmalarımızın konusunu oluşturmaktadır. Bu bağlamda, ostolün endotelde yer alan  $\text{K}^+$  kanalları (BKCa ve  $\text{KV}_7$ ) üzerindeki etkisi ele alınacaktır.

Tez kapsamındaki ön denemelerde ilk kez gösterilen ostolün *in vivo* İKB/OAB oranını (erektil fonksiyonu) arttırıcı etkisi, ostolün *in vivo* deneysel ED modellerindeki tedavi edici etkinliğinin,  $\text{H}_2\text{S}$  ile ilişkili mekanizmalar üzerinden detaylı bir şekilde incelenmesini gerekli kılmaktadır. Ayrıca kardiyovasküler sağlık ve erektil fonksiyon arasındaki yakın ilişki; erektil fonksiyonu,  $\text{H}_2\text{S}$  aracılığıyla iyileştiren ostolün, kardiyovasküler sistemde de aynı mekanizma üzerinden yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Tüm bu unsurlar, gelecekteki araştırma projelerimiz için temel oluşturmakta ve literatüre önemli katkılar sunacak nitelik taşımaktadır. Ayrıca bulgularımız, ostol türevi potansiyel terapötiklerin geliştirilmesi açısından büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışma, arter lümenindeki endojen  $\text{H}_2\text{S}$  üretiminin, damar yanıtlarıyla eş zamanlı olarak başarılı bir şekilde ölçüldüğü ilk çalışmadır. Bu iki parametreyi aynı anda ölçebilmek, vasküler araştırmalar için önemli bir ilerleme olarak değerlendirilmekte ve mevcut literatüre katkı sağlamaktadır. Gazotransmitterler ile vasküler fonksiyon arasındaki karmaşık etkileşime yeni yaklaşımlar sunabilecek bu metodoloji, NO ve CO gibi diğer gazotransmitterlerin endojen üretiminin de vasküler yanıtlar ile eş zamanlı olarak ölçülebileceğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, vasküler fizyoloji/patofizyoloji alanındaki çalışmalara yön verebilecek niteliktedir.

## Kaynaklar

- Abd Elmoneim, H., Sharabi, F., Mohy El Din, M., Louedec, L., Norel, X. ve Senbel, A. (2017). Potassium channels modulate the action but not the synthesis of hydrogen sulfide in rat corpus cavernosum. *Life Sciences*, 189, 39–43. doi:10.1016/J.LFS.2017.09.013
- Abe, K. ve Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), 1066–1071. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996
- Albayrak, G., Demir, S., Aydin Kose, F. ve Baykan, S. (2023). New coumarin glycosides from endemic *Prangos heyneana* H. Duman & M.F. Watson. *Natural Product Research*, 37(2), 227–239. doi:10.1080/14786419.2021.1961138
- Altaany, Z., Yang, G. ve Wang, R. (2013). Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(7), 879–888. doi:10.1111/jcmm.12077
- Anaissie, J. ve Hellstrom, W. J. G. (2016). Clinical use of alprostadil topical cream in patients with erectile dysfunction: a review. *Research and Reports in Urology*, 8, 123. doi:10.2147/RRU.S68560
- Andersson, K. E. ve Wagner, G. (1995). Physiology of penile erection. *Physiological reviews*, 75(1), 191–236. doi:10.1152/PHYSREV.1995.75.1.191
- Argiolas, A., Argiolas, F. M., Argiolas, G. ve Melis, M. R. (2023). Erectile dysfunction: Treatments, advances and new therapeutic strategies. *Brain Sciences*, 13(5). doi:10.3390/BRAINSKI13050802
- Aydinoglu, F., Dalkir, F. T., Demirbag, H. O. ve Ogulener, N. (2017). The interaction of L-cysteine/H<sub>2</sub>S pathway and muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in mouse corpus cavernosum. *Nitric Oxide*, 70, 51–58. doi:10.1016/j.niox.2017.08.005
- Aydinoglu, F. ve Ogulener, N. (2016). Characterization of relaxant mechanism of H<sub>2</sub>S in mouse corpus cavernosum. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(4), 503–511. doi:10.1111/1440-1681.12554

- Baldwin, S. N., Sandow, S. L., Mondéjar-Parreño, G., Stott, J. B. ve Greenwood, I. A. (2020). KV7 channel expression and function within rat mesenteric endothelial cells. *Frontiers in Physiology*, 11, 598779. doi:10.3389/FPHYS.2020.598779/BIBTEX
- Beevers, G., Lip, G. Y. H. ve O'Brien, E. (2001). The pathophysiology of hypertension. *British Medical Journal*, 322(2), 912–916. doi:10.1136/bmj.322.7291.912
- Bibli, S. I., Yang, G., Zhou, Z., Wang, R., Topouzis, S. ve Papapetropoulos, A. (2015). Role of cGMP in hydrogen sulfide signaling. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 46, 7–13. doi:10.1016/j.niox.2014.12.004
- Brancaleone, V., Mitidieri, E., Flower, R. J., Cirino, G. ve Perretti, M. (2014). Annexin A1 mediates hydrogen sulfide properties in the control of inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 60(1), 96–104. doi:10.1124/jpet.114.217034
- Brioni, J. D., Nakane, M., Hsieh, G. C., Moreland, R. B., Kolasa, T. ve Sullivan, J. P. (2002). Activators of soluble guanylate cyclase for the treatment of male erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*, 14(1), 8–14. doi:10.1038/sj.ijir.3900801
- Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Pyriochou, A., Roussos, C., ... Cirino, G. (2010). Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(10), 1998–2004. doi:10.1161/ATVBAHA.110.209783
- Burchardt, M., Burchardt, T., Baer, L., Kiss, A. J., Pawar, R. V., Shabsigh, A., ... Shabsigh, R. (2000). Hypertension is associated with severe erectile dysfunction. *Journal of Urology*, 164(4), 1188–1191. doi:10.1016/S0022-5347(05)67138-8
- Cai, Y., Sun, W., Zhang, X. X., Lin, Y. D., Chen, H. ve Li, H. (2018). Osthole prevents acetaminophen-induced liver injury in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(1), 74–84. doi:10.1038/aps.2017.129
- Chen, J., Chiou, W. F., Chen, C. C. ve Chen, C. F. (2000). Effect of the plant-extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue in vitro. *Journal of*

*Urology*, 163(6), 1975–1980. doi:10.1016/S0022-5347(05)67613-6

Chen, R., Xue, J. ve Xie, M. L. (2011). Reduction of isoprenaline-induced myocardial TGF- $\beta$ 1 expression and fibrosis in osthole-treated mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256(2), 168–173. doi:10.1016/j.taap.2011.08.005

Chiou, W. F., Huang, Y. L., Chen, C. F. ve Chen, C. C. (2001). Vasorelaxing effect of coumarins from *Cnidium monnieri* on rabbit corpus cavernosum. *Planta Medica*, 67, 282–284. doi:10.1055/s-2001-12013.

Chiou, W., Huang, Y., Chen, C. ve Chen, C. (2001). Vasorelaxing effect of coumarins from *Cnidium monnieri* on rabbit corpus cavernosum. *Planta medica*, 67(3), 282–284. doi:10.1055/s-2001-12013

Coletta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Módis, K., Panopoulos, P., ... Szabo, C. (2012). Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23), 9161–9166. doi:10.1073/pnas.1202916109

Comerma-Steffensen, S. G., Carvacho, I., Hedegaard, E. R. ve Simonsen, U. (2017). Small and intermediate calcium-activated potassium channel openers improve rat endothelial and erectile function. *Frontiers in Pharmacology*, 8(SEP), 279354. doi:10.3389/FPHAR.2017.00660/BIBTEX

Comerma-Steffensen, S., Prat-Duran, J., Mogensen, S., Fais, R., Pinilla, E. ve Simonsen, U. (2022). Erectile dysfunction and altered contribution of KCa1.1 and KCa2.3 Channels in the penile tissue of type-2 diabetic db/db mice. *The journal of sexual medicine*, 19(5), 697–710. doi:10.1016/J.JSXM.2022.02.021

Dai, L., Qian, Y., Zhou, J., Zhu, C., Jin, L. ve Li, S. (2019). Hydrogen sulfide inhibited L-type calcium channels (CaV1.2) via up-regulation of the channel sulfhydration in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 858(June), 172455. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172455

Daina, A., Michielin, O. ve Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(March), 1–13. doi:10.1038/srep42717

Dean, R. C. ve Lue, T. F. (2005). Physiology of penile erection and pathophysiology

- of erectile dysfunction. *Urologic Clinics of North America*, 32(4), 379–395. doi:10.1016/j.ucl.2005.08.007
- Di Villa Bianca, R. D. E., Sorrentino, R., Maffia, P., Mirone, V., Imbimbo, C., Fusco, F., ... Cirino, G. (2009). Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4513–4518. doi:10.1073/pnas.0807974105
- Diaconu, C. C., Manea, M., Marcu, D. R., Socea, B., Spinu, A. D. ve Bratu, O. G. (2020). The erectile dysfunction as a marker of cardiovascular disease: a review. *Acta cardiologica*, 75(4), 286–292. doi:10.1080/00015385.2019.1590498
- Diniz, A. F. A., Ferreira, R. C., de Souza, I. L. L. ve da Silva, B. A. (2020). Ionic channels as potential therapeutic targets for erectile dysfunction: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1120. doi:10.3389/FPHAR.2020.01120/BIBTEX
- Feng, H., Peng, W., Deng, Z., Liu, J. ve Wang, T. (2023). Erectile dysfunction and exosome therapy. *Frontiers in Endocrinology*, 14. doi:10.3389/FENDO.2023.1123383
- Fusi, F., Sgaragli, G., Ha, L. M., Cuong, N. M. ve Saponara, S. (2012). Mechanism of osthole inhibition of vascular Cav1.2 current. *European journal of pharmacology*, 680(1), 22–27. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.01.038
- Ghasemi, M., Dehpour, A. R., Moore, K. P. ve Mani, A. R. (2012). Role of endogenous hydrogen sulfide in neurogenic relaxation of rat corpus cavernosum. *Biochemical pharmacology*, 83(9), 1261–1268. doi:10.1016/J.BCP.2012.01.026
- Goldstein, I., Jones, L. R. A., Belkoff, L. H., Karlin, G. S., Bowden, C. H., Peterson, C. A., ... Day, W. W. (2012). Avanafil for the treatment of erectile dysfunction: A multicenter, randomized, double-blind study in men with diabetes mellitus. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(9), 843. doi:10.1016/J.MAYOCP.2012.06.016
- Gómez-Bermejo, M. A., Huang, D. Y., Bertolotto, M. ve Sidhu, P. S. (2023). Utility of contrast enhanced ultrasound (CEUS) in penile trauma. *Insights into Imaging*, 14(1), 1–14. doi:10.1186/S13244-023-01499-2/FIGURES/12

- Gratzke, C., Angulo, J., Chitale, K., Dai, Y. T., Kim, N. N., Paick, J. S., ... Stief, C. G. (2010). Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. *The journal of sexual medicine*, 7(1 Pt 2), 445–475. doi:10.1111/J.1743-6109.2009.01624.X
- Hedegaard, E. R., Gouliaev, A., Winther, A. K., Arcanjo, D. D. R., Aalling, M., Renaltan, N. S., ... Simonsen, U. (2016). Involvement of potassium channels and calcium-independent mechanisms in hydrogen sulfide-induced relaxation of rat mesenteric small arteries. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 356(1), 53–63. doi:10.1124/jpet.115.227017
- Holmer, M. ve Hasler-Sheetal, H. (2014). Sulfide intrusion in seagrasses assessed by stable sulfur isotopes-A synthesis of current results. *Frontiers in Marine Science*, 1(NOV), 118449. doi:10.3389/FMARS.2014.00064/ABSTRACT
- Hou, X., Zhou, M., Jiang, Q., Wang, S. ve He, L. (2009). A vascular smooth muscle/cell membrane chromatography–offline-gas chromatography/mass spectrometry method for recognition, separation and identification of active components from traditional Chinese medicines. *Journal of chromatography A*, 1216(42), 7081–7087. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.062
- Huang, W. C., Liao, P. C., Huang, C. H., Hu, S., Huang, S. C. ve Wu, S. J. (2017). Osthole attenuates lipid accumulation, regulates the expression of inflammatory mediators, and increases antioxidants in FL83B cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 91, 78–87. doi:10.1016/j.biopha.2017.04.051
- Huang, Y., Sun, M., Cui, H., Kong, L., Zhai, H., Wang, Y., ... Fan, D. (2019). Vasorelaxant effect of osthole on isolated thoracic aortic rings in rats. *Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan*, 39(4), 492–501.
- Irwin, G. M. (2019). Erectile dysfunction. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 46(2), 249–255. doi:10.1016/J.POP.2019.02.006
- Jackson, W. F. (2017). Potassium channels in regulation of vascular smooth muscle contraction and growth. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 78, 89. doi:10.1016/BS.APHA.2016.07.001
- Jarząb, A., Grabarska, A., Skalicka-Woźniak, K. ve Stepulak, A. (2017). Pharmacological features of osthole. *Postepy Hig Med Dosw*, 71, 411–421.

- Javaroni, V. ve Neves, M. F. (2012). Erectile dysfunction and hypertension: Impact on cardiovascular risk and treatment. *International Journal of Hypertension*, 2012, 627278. doi:10.1155/2012/627278
- Ji, H. J., Hu, J. F., Wang, Y. H., Chen, X. Y., Zhou, R. ve Chen, N. H. (2010). Osthole improves chronic cerebral hypoperfusion induced cognitive deficits and neuronal damage in hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 636(1–3), 96–101. doi:10.1016/j.ejphar.2010.03.038
- Ji, W. Q., Liu, S. Y., Dai, J., Yang, T., Jiang, X. M., Duan, X. C. ve Wu, Y. M. (2014). Hydrogen sulfide defends against the cardiovascular risk of Nw-nitro-L-argininemethyl ester-induced hypertension in rats via the nitric oxide/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Chinese Medical Journal*, 127(21), 3751–3757. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20141573
- Jiang, J. M., Zhou, C. F., Gao, S. L., Tian, Y., Wang, C. Y., Wang, L., ... Tang, X. Q. (2015). BDNF-TrkB pathway mediates neuroprotection of hydrogen sulfide against formaldehyde-induced toxicity to PC12 cells. *PLoS ONE*, 10(3), 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0119478
- Jin, S., Teng, X., Xiao, L., Xue, H., Guo, Q., Duan, X., ... Wu, Y. (2017). Hydrogen sulfide ameliorated L-NAME-induced hypertensive heart disease by the Akt/eNOS/NO pathway. *Experimental Biology and Medicine*, 242(18), 1831–1841. doi:10.1177/1535370217732325
- Jin, Y., Qian, J., Ju, X., Bao, X., Li, L., Zheng, S., ... Liang, G. (2018). Osthole protects against acute lung injury by suppressing NF- $\kappa$  B-dependent inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2018, 4934592. doi:10.1155/2018/4934592
- Jupiter, R. C., Yoo, D., Pankey, E. A., Reddy, V. V. G., Edward, J. A., Polhemus, D. J., ... Kadowitz, P. J. (2015). Analysis of erectile responses to H<sub>2</sub>S donors in the anesthetized rat. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 309(5), H835–H843. doi:10.1152/ajpheart.00293.2015
- Justina, V. Dela, Priviero, F., Giachini, F. R. ve Webb, R. C. (2020). Piezo1 mechanosensor is impaired in pudendal artery and corpus cavernosum of

- spontaneously hypertensive rats. *The FASEB Journal*, 34(S1), 1–1. doi:10.1096/FASEBJ.2020.34.S1.06256
- Kendirici, M., Tanriverdi, O., Trost, L. ve Hellstrom, W. J. G. (2006). Management of sildenafil treatment failures. *Current Opinion in Urology*, 16(6), 449–459. doi:10.1097/01.MOU.0000250286.60237.A6
- Kida, M., Sugiyama, T., Yoshimoto, T. ve Ogawa, Y. (2013). Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1–2), 211–215. doi:10.1016/j.ejps.2012.11.001
- King, A. L., Polhemus, D. J., Bhushan, S., Otsuka, H., Kondo, K., Nicholson, C. K., ... Lefer, D. J. (2014). Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(8), 3182–3187. doi:10.1073/pnas.1321871111
- Ko, F. N., Wu, T. S., Liou, M. J., Huang, T. F. ve Teng, C. M. (1992). Vasorelaxation of rat thoracic aorta caused by osthole isolated from *Angelica pubescens*. *European Journal of Pharmacology*, 219(1), 29–34. doi:10.1016/0014-2999(92)90576-P
- Konukoglu, D. ve Uzun, H. (2017). Endothelial dysfunction and hypertension. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (956), 511–540. doi:10.1007/5584\_2016\_90.
- Kubo, S., Kurokawa, Y., Doe, I., Masuko, T., Sekiguchi, F. ve Kawabata, A. (2007). Hydrogen sulfide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. *Toxicology*, 241(1–2), 92–97. doi:10.1016/J.TOX.2007.08.087
- La Fuente, J. M., Fernández, A., Pepe-Cardoso, A. J., Martínez-Salamanca, J. I., Louro, N. ve Angulo, J. (2019). L-cysteine/hydrogen sulfide pathway induces cGMP-dependent relaxation of corpus cavernosum and penile arteries from patients with erectile dysfunction and improves arterial vasodilation induced by PDE5 inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 863, 172675. doi:10.1016/J.EJPHAR.2019.172675
- Lee, W. H., Lin, R. J., Lin, S. Y., Chen, Y. C., Lin, H. M. ve Liang, Y. C. (2011).

- Osthole enhances glucose uptake through activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12874–12881. doi:10.1021/jf2036559
- Li, L., Zhuang, F. E., Yang, L., Zhang, C. L., Zhao, G. S. ve Zhao, D. K. (1995). Effects of osthole on isolated guinea pig heart atria. *Acta Pharmacologica Sinica*, 16(3), 251–254.
- Li, T., Zhao, B., Wang, C., Wang, H., Liu, Z., Wang, L. I., ... Junbao, D. U. (2008). Regulatory effects of hydrogen sulfide on IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the plasma and pulmonary tissue of rats with acute lung injury. *Experimental Biology and Medicine*, 233(9), 1081–1087. doi:10.3181/0712-RM-354
- Li, Yan, Bai, J., Yang, Y. H., Hoshi, N. ve Chen, D. B. (2020). Hydrogen sulfide relaxes human uterine artery via activating smooth muscle bkca channels. *Antioxidants*, 9(11), 1–18. doi:10.3390/ANTIOX9111127
- Li, Yeli, Wang, Y., Li, Y., Qian, Z., Zhu, L. ve Yang, D. (2017). Osthole attenuates pulmonary arterial hypertension in monocrotaline-treated rats. *Molecular medicine reports*, 16(3), 2823–2829. doi:10.3892/mmr.2017.6876
- Li, Yi qi, Wang, J. yi, Qian, Z. qiang, Li, Y. li, Li, W. na, Gao, Y. ve Yang, D. li. (2017). Osthole inhibits intimal hyperplasia by regulating the NF- $\kappa$ B and TGF- $\beta$ 1/Smad2 signalling pathways in the rat carotid artery after balloon injury. *European Journal of Pharmacology*, 811(June), 232–239. doi:10.1016/j.ejphar.2017.06.025
- Liao, P. C., Chien, S. C., Ho, C. L., I-Chenwang, E., Lee, S. C., Kuo, Y. H., ... Hua, K. F. (2010). Osthole regulates inflammatory mediator expression through modulating NF-KB, mitogen-activated protein kinases, protein kinase C, and reactive oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10445–10451. doi:10.1021/jf102812t
- Liu, H., Xue, X., Shi, H., Qi, L. ve Gong, D. (2015). Osthole upregulates BDNF to enhance adult hippocampal neurogenesis in APP/PS1 transgenic mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(10), 1439–1449. doi:10.1248/bpb.b15-00013
- Lopes, R. A., Neves, K. B., Silva, M., Olivon, V., Ruginsk, S., Ramalho, L., ...

- Carneiro, F. S. (2014). Abstract 353: Castration impairs rat internal pudendal artery reactivity and structure. *Hypertension*, 64(suppl\_1). doi:10.1161/HYP.64.SUPPL\_1.353
- Lue, T. F. (2000). Erectile dysfunction. *The New England Journal of Medicine*, 342, 1802–1813.
- Manabe, K., Heaton, J. P. W., Morales, A., Kumon, H. ve Adams, M. A. (2000). Pre-penile arteries are dominant in the regulation of penile vascular resistance in the rat. *International journal of impotence research*, 12(3), 183–189. doi:10.1038/SJ.IJIR.3900526
- Manfredi, C., Castiglione, F., Fode, M., Lew-Starowicz, M., Romero-Otero, J., Bettocchi, C. ve Corona, G. (2022). News and future perspectives of non-surgical treatments for erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research* 2022 35:8, 35(8), 699–705. doi:10.1038/s41443-022-00602-3
- Martelli, A., Testai, L., Breschi, M. C., Lawson, K., McKay, N. G., Miceli, F., ... Calderone, V. (2013). Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels. *Pharmacological Research*, 70(1), 27–34. doi:10.1016/J.PHRS.2012.12.005
- Meng, J., Adaikan, P. G. ve Srilatha, B. (2012). Hydrogen sulfide promotes nitric oxide production in corpus cavernosum by enhancing expression of endothelial nitric oxide synthase. *International Journal of Impotence Research* 2013 25:3, 25(3), 86–90. doi:10.1038/ijir.2012.39
- Mizusawa, H., Hedlund, P., Håkansson, A., Alm, P. ve Andersson, K. E. (2001). Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. *British Journal of Pharmacology*, 132(6), 1333–1341. doi:10.1038/sj.bjp.0703938
- Mulvany, M. J. ve Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation research*, 41(1), 19–26. doi:10.1161/01.RES.41.1.19
- Nakamura, T., Kodama, N., Arai, Y., Kumamoto, T., Higuchi, Y., Chaichantipyuth, C., ... Yano, S. (2009). Inhibitory effect of oxycoumarins isolated from the Thai medicinal plant *Clausena guillauminii* on the inflammation mediators, iNOS,

- TNF- $\alpha$ , and COX-2 expression in mouse macrophage RAW 264.7. *Journal of Natural Medicines*, 63(1), 21–27. doi:10.1007/s11418-008-0277-5
- Nielsen, E. R., Winther, A. K. ve Simonsen, U. (2019). Simultaneous measurements of tension and free H<sub>2</sub>S in mesenteric arteries. *Methods in Molecular Biology*, 2007, 125–136. doi:10.1007/978-1-4939-9528-8\_9/COVER
- Nunes, K. P., Labazi, H. ve Webb, R. C. (2012). New insights into hypertension-associated erectile dysfunction. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 21(2), 163–170. doi:10.1097/MNH.0b013e32835021bd.New
- Odom, M. R., Powers, S. A., Pak, E. S. ve Hannan, J. L. (2019). Testosterone replacement enhances internal pudendal artery relaxation to reverse erectile dysfunction in a rat model of androgen deprivation therapy. *The FASEB Journal*, 33(S1), 693.16-693.16. doi:10.1096/FASEBJ.2019.33.1\_SUPPLEMENT.693.16
- Ogawa, H., Sasai, N., Kamisako, T. ve Baba, K. (2007). Effects of osthon on blood pressure and lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(1), 26–31. doi:10.1016/j.jep.2007.01.028
- Oh, G. S., Pae, H. O., Lee, B. S., Kim, B. N., Kim, J. M., Kim, H. R., ... Chung, H. T. (2006). Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- $\kappa$ B via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(1), 106–119. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.021
- Olivencia, M. A., Esposito, E., Brancialeone, V., Castaldo, S., Cirino, G., Pérez-Vizcaino, F., ... Mitidieri, E. (2023). Hydrogen sulfide regulates the redox state of soluble guanylate cyclase in CSE<sup>-/-</sup> mice corpus cavernosum microcirculation. *Pharmacological Research*, 194, 106834. doi:10.1016/J.PHRS.2023.106834
- Osmond, J. M. ve Kanagy, N. L. (2014). Modulation of hydrogen sulfide by vascular hypoxia. *Hypoxia*, 2, 117. doi:10.2147/HP.S51589
- Panchatsharam, P. K., Durland, J. ve Zito, P. M. (2023, 1 Mayıs). Physiology, Erection. *StatPearls*. StatPearls Publishing. 20 Aralık 2023 tarihinde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513278/> adresinden erişildi.

- Parsanathan, R. ve Jain, S. K. (2018). Hydrogen sulfide increases glutathione biosynthesis, and glucose uptake and utilisation in C2C12 mouse myotubes. *Free Radical Research*, 52(2), 288–303. doi:10.1080/10715762.2018.1431626
- Pedrosa Nunes, K. ve Webb, C. R. (2012). Mechanisms in erectile function and dysfunction: An overview. K. Nunes (Ed.), *Erectile Dysfunction - Disease-Associated Mechanisms and Novel Insights into Therapy* içinde (ss. 1–22). InTech. doi:10.5772/39088
- Persu, C., Cauni, V., Gutue, S., Albu, E. S., Jinga, V. ve Geavlete, P. (2009). Diagnosis and treatment of erectile dysfunction– a practical update. *Journal of Medicine and Life*, 2(4), 394. /pmc/articles/PMC3019009/ adresinden erişildi.
- Peter, E. A., Shen, X., Shah, S. H., Pardue, S., Glawe, J. D., Zhang, W. W., ... Kevil, C. G. (2013). Plasma free H<sub>2</sub>S levels are elevated in patients with cardiovascular disease. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 2(5). doi:10.1161/JAHA.113.000387
- Polhemus, D. J., Calvert, J. W., Butler, J. ve Lefer, D. J. (2014). The cardioprotective actions of hydrogen sulfide in acute myocardial infarction and heart failure. *Scientifica*, 2014, 1–8. doi:10.1155/2014/768607
- Porst, H., Burnett, A., Brock, G., Ghanem, H., Giuliano, F., Glina, S., ... Sharlip, I. (2013). SOP conservative (medical and mechanical) treatment of erectile dysfunction. *The journal of sexual medicine*, 10(1), 130–171. doi:10.1111/JSM.12023
- Predmore, B. L., Lefer, D. J. ve Gojon, G. (2012). Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxidants and Redox Signaling*, 17(1), 119–140. doi:10.1089/ars.2012.4612
- Qiu, X., Villalta, J., Lin, G. ve Lue, T. F. (2012). Role of hydrogen sulfide in the physiology of penile erection. *Journal of Andrology*. J Androl. doi:10.2164/jandrol.111.014936
- Sadraei, H., Shokoohinia, Y., Sajjadi, Se. ve Ghadirian, B. (2012). Antispasmodic effect of osthole and Prangos ferulacea extract on rat uterus smooth muscle motility. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 141–149.

- Sadraei, H., Shokoohinia, Y., Sajjadi, Se. ve Mozafari, M. (2013). Antispasmodic effects of *Prangos ferulacea* acetone extract and its main component osthole on ileum contraction. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 137–144.
- Sevin, G., Alan, E., Demir, S., Albayrak, G., Demiroz, T., Yetik-Anacak, G. ve Baykan, S. (2022). Comparative evaluation of relaxant effects of three *prangos* species on mouse corpus cavernosum: Chemical characterization and the relaxant mechanisms of action of *P. pabularia* and (+)-oxypeucedanin. *Journal of Ethnopharmacology*, 284, 114823. doi:10.1016/J.JEP.2021.114823
- Silva, D. F., Wenceslau, C. F., McCarthy, C. G., Szasz, T., Ogbi, S. ve Webb, R. C. (2019). TRPM8 channel activation triggers relaxation of pudendal artery with increased sensitivity in the hypertensive rats. *Pharmacological Research*, 147, 104329–104329. doi:10.1016/J.PHRS.2019.104329
- Singh, L. ve Bhatti, R. (2023). Signaling Pathways Involved in the Neuroprotective Effect of Osthole: Evidence and Mechanisms. *Molecular Neurobiology* 2023, 1, 1–19. doi:10.1007/S12035-023-03580-9
- Solomon, H., Man, J. W. ve Jackson, G. (2003). Erectile dysfunction and the cardiovascular patient: Endothelial dysfunction is the common denominator. *Heart*, 89(3), 251–254. doi:10.1136/heart.89.3.251
- Srilatha, B., Adaikan, P. G. ve Moore, P. K. (2006). Possible role for the novel gasotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction - A pilot study. *European Journal of Pharmacology*, 535(1–3), 280–282. doi:10.1016/j.ejphar.2006.02.001
- Tan, B., Jin, S., Sun, J., Gu, Z., Sun, X., Zhu, Y., ... Zhu, Y. Z. (2017). New method for quantification of gasotransmitter hydrogen sulfide in biological matrices by LC-MS/MS. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–12. doi:10.1038/srep46278
- Teng, C. M., Lin, C. H., Ko, F. N., Wu, T. S. ve Huang, T. F. (1994). The relaxant action of osthole isolated from *Angelica pubescens* in guinea-pig trachea. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 349(2), 202–208. doi:10.1007/BF00169838
- Van Goor, H., Van Den Born, J. C., Hillebrands, J. L. ve Joles, J. A. (2016). Hydrogen sulfide in hypertension. *Current Opinion in Nephrology and*

*Hypertension*, 25(2), 107–113. doi:10.1097/MNH.0000000000000206

Vang, A., Mazer, J., Casserly, B. ve Choudhary, G. (2010). Activation of endothelial BKCa channels causes pulmonary vasodilation. *Vascular Pharmacology*, 53(3–4), 122–129. doi:10.1016/J.VPH.2010.05.001

Wang, C. M., Wu, B. R., Xiang, P., Xiao, J. ve Hu, X. C. (2023). Management of male erectile dysfunction: From the past to the future. *Frontiers in Endocrinology*, 14. doi:10.3389/FENDO.2023.1148834

Wang, R., Kong, J., Wang, D., Lien, L. L. M. ve Lien, E. J. C. (2007). A survey of Chinese herbal ingredients with liver protection activities. *Chinese Medicine*, 2, 1–8. doi:10.1186/1749-8546-2-5

Wang, S., Xie, Y., Huo, Y. W., Li, Y., Abel, P. W., Jiang, H., ... Tu, Y. (2020). Airway relaxation mechanisms and structural basis of osthole for improving lung function in asthma. *Science signaling*, 13(659). doi:10.1126/SCISIGNAL.AAX0273

Wang, Y., Che, J., Zhao, H., Tang, J. ve Shi, G. (2018). Osthole alleviates oxidized low-density lipoprotein-induced vascular endothelial injury through suppression of transforming growth factor- $\beta$ 1/Smad pathway. *International Immunopharmacology*, 65(1), 373–381. doi:10.1016/j.intimp.2018.10.031

Wu, J., Wei, J., You, X., Chen, X., Zhu, H., Zhu, X., ... Xu, M. (2013). Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to lung injury after experimental orthotopic lung transplantation. *Journal of Surgical Research*, 182(1), e25–e33. doi:10.1016/j.jss.2012.09.028

Wu, S. N., Lo, Y. K., Chen, C. C., Li, H. F. ve Chiang, H. T. (2002). Inhibitory effect of the plant-extract osthole on L-type calcium current in NG108-15 neuronal cells. *Biochemical Pharmacology*, 63(2), 199–206. doi:10.1016/S0006-2952(01)00873-5

Xie, Z. Z., Liu, Y. ve Bian, J. S. (2016). Hydrogen sulfide and cellular redox homeostasis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 6043038. doi:10.1155/2016/6043038

Yafi, F. A., Jenkins, L., Albersen, M., Corona, G., Isidori, A. M., Goldfarb, S., ... Hellstrom, W. J. G. (2016). Erectile dysfunction. *Nature Reviews Disease*

*Primers, Feb 4(2)*, 16003. doi:10.1038/nrdp.2016.3

- Yan, Y. hui, Li, S. heng, Li, H. yan, Lin, Y. ve Yang, J. xian. (2017). Osthole protects bone marrow-derived neural stem cells from oxidative damage through PI3K/Akt-1 pathway. *Neurochemical Research*, 42(2), 398–405. doi:10.1007/S11064-016-2082-Y/FIGURES/4
- Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., ... Wang, R. (2008). H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine  $\gamma$ -Lyase. *Science*, 322(5901), 587–590. doi:10.1126/science.1162667
- Yao, L., Lu, P., Li, Y., Yang, L., Feng, H., Huang, Y., ... Zhu, D. (2013). Osthole relaxes pulmonary arteries through endothelial phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-eNOS-NO signaling pathway in rats. *European Journal of Pharmacology*, 699(1–3), 23–32. doi:10.1016/j.ejphar.2012.11.056
- Yao, L., Yang, Y., He, G., Ou, C., Wang, L. ve Liu, K. (2018). Global proteomics deciphered novel-function of osthole against pulmonary arterial hypertension. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. doi:10.1038/s41598-018-23775-8
- Yao, Y., Zhao, X., Xin, J., Wu, Y. ve Li, H. (2018). Coumarins improved type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin in mice via antioxidation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(8), 765–771. doi:10.1139/cjpp-2017-0612
- Yetik-Anacak, G., Sorrentino, R., Linder, A. E. ve Murat, N. (2015). Gas what: NO is not the only answer to sexual function. *British Journal of Pharmacology*, 172(6), 1434–1454. doi:10.1111/bph.12700
- Yilmaz, E., Kaya-Sezginer, E., Yilmaz-Oral, D., Cengiz, T., Bayatli, N. ve Gur, S. (2019). Effects of hydrogen sulphide donor, sodium hydrosulphide treatment on the erectile dysfunction in L-NAME-induced hypertensive rats. *Andrologia*, 51(5), 1–10. doi:10.1111/and.13240
- You, L., Feng, S., An, R. ve Wang, X. (2009). Osthole: A promising lead compound for drug discovery from a Traditional Chinese Medicine (TCM). *Natural Product Communications*, 4(2), 297–302. doi:10.1177/1934578x0900400227
- Zhang, H., Gao, Y., Zhao, F. li, Qiao, P. feng ve Yan, Y. (2015). Hydrogen sulfide-induced processing of the amyloid precursor protein in SH-SY5Y human

- neuroblastoma cells involves the PI3-K/Akt signaling pathway. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(2), 265–272. doi:10.1007/s10571-014-0121-2
- Zhang, L. M., Jiang, C. X. ve Liu, D. W. (2009). Hydrogen sulfide attenuates neuronal injury induced by vascular dementia via inhibiting apoptosis in rats. *Neurochemical Research*, 34(11), 1984–1992. doi:10.1007/s11064-009-0006-9
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y. ve Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO Journal*, 20(21), 6008–6016. doi:10.1093/emboj/20.21.6008
- Zhao, Weimin, Ndisang, J. F. ve Wang, R. (2003). Modulation of endogenous production of H<sub>2</sub>S in rat tissues. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 81(9), 848–853. doi:10.1139/y03-077
- Zhou, J., Wang, S. W. ve Sun, X. L. (2008). Determination of osthole in rat plasma by high-performance liquid chromatograph using cloud-point extraction. *Analytica Chimica Acta*, 608(2), 158–164. doi:10.1016/j.aca.2007.12.029
- Zhou, Z., Martin, E., Sharina, I., Esposito, I., Szabo, C., Bucci, M., ... Papapetropoulos, A. (2016). Regulation of soluble guanylyl cyclase redox state by hydrogen sulfide. *Pharmacological research*, 111, 556. doi:10.1016/J.PHRS.2016.06.029
- Zhu, L., Li, Y. L., Qian, Z. Q., Hua, L., Yue, Y. ve Yang, D. L. (2021). Osthole improves pulmonary artery hypertension by inducing apoptosis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73(8), 1109–1117. doi:10.1093/JPP/RGAB068

## EKLER

### ETİK KURUL BELGESİ

|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>EGE ÜNİVERSİTESİ</b>                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU</b>                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| SAYI: 2020-117                                                                                                                                                                                                          | 25.11.2020                                                                                                                                                                                                                                                           |
| KONU: Onay                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda <b>“OSTOLÜN EREKTİL FONKSİYONDAKİ YARARLI ETKİLERİNDE H2S’İN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI”</b> isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.                           |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Yürütücü:                                                                                                                                                                                                               | <b>Doç. Dr. Gülnur Sevin, EÜ Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD</b><br>Prof. Dr. Günay Yetik-Anacak, Ege Üni. Ecz. Fak. Farmakoloji AD<br>Doç. Dr. Yasemin Eraç, EÜ Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD<br>Arş. Gör. Elif Alan, EÜ Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD |
| Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda 90 adet erkek Swiss albino fare deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim. |                                                                                                                                                                                                                                                                      |

## TÜBİTAK 2211-C BURSİYERLİK YAZISI



T.C.  
TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI  
Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı

Sayı : E-45022559-115.02-12144  
Konu : Bursiyerlik Yazısı (Elif ALAN)

26.01.2021

### İLGİLİ MAKAMA

İşbu evrak kişinin "25/01/2021" tarihli talebi üzerine düzenlenmiştir. Ege Üniversitesi, Farmakoloji Bölümü'nde yüksek lisans öğrenimi sırasında "Elif ALAN" TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından yürütülen "2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı" kapsamında, 01/10/2017 tarihinden bu yana aylık 800 TL tutarında burs ile desteklenmekte olup ilgili programın mevzuatında belirtilen bursun devam koşullarını sağlaması ve daha önce mezun olmaması kaydıyla 30/09/2021 tarihine kadar desteklenecektir.

2211-C Programı kapsamında verilen burslar, başarıya verilen ödül niteliğindedir. Bu nedenle çağrı duyurusunda, yüklenme senedinde veya kabul ve taahhüt beyanında belirtilen yükümlülüklerini yerine getiren bursiyerlerin mecburi hizmet ve geri ödeme gibi yükümlülükleri yoktur. Bursiyerin yükümlülüklerinden herhangi birini ihlal etmesi halinde bursiyerliği iptal edilebilir. Bu durumda kendisine yapılan tüm ödemeler, Yüklenme Senedi çerçevesinde yasal faiziyle birlikte geri alınır.

Bilgilerine saygılarımla sunarım.

Dr. Metin DEMİRİSOY  
Grup Koordinatörü

Bu belge elektronik olarak imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : \*BENNR4F9\*

Adres: Atatürk Bulvarı No:221 06100 Kavaklıdere Ankara  
Telefon:(0 312) 468 53 00 Faks:(0 312) 427 74 89  
e-Posta:tubimer@tubitak.gov.tr Web:www.tubitak.gov.tr  
Kep Adresi:tubitak.baskanlik@tubitak.hsgb.kep.tr

Belge Takip Adresi :  
<http://evrakdogrulama.tubitak.gov.tr?V=BENNR4F9>

Bilgi için: Nihal Kanlısu  
Unvanı: Uzman Yardımcısı



# EGE ÜNİVERSİTESİ-BAP-PROJE KABUL YAZISI

|                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>T.C.</b>                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                               |
| <b>Ege Üniversitesi REKTÖRLÜĞÜ</b>                                                                                                                                                                                                                    |                                                                               |
| <b>Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü</b>                                                                                                                                                                               |                                                                               |
| <hr/>                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                               |
| Konu: Yürürlüğe giren proje öneriniz                                                                                                                                                                                                                  | 26.12.2023                                                                    |
| 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. İskender İNCE                                                                                                                                                                                                                    |                                                                               |
| <b>Proje Bilgileri</b>                                                                                                                                                                                                                                |                                                                               |
| Proje no                                                                                                                                                                                                                                              | 22681                                                                         |
| Proje adı                                                                                                                                                                                                                                             | Ostolün Eretil Fonksiyondaki Yararlı Etkilerinde H2S'in Rolünün Araştırılması |
| Proje türü                                                                                                                                                                                                                                            | Tez Projesi, Doktora                                                          |
| Proje grubu                                                                                                                                                                                                                                           | Tıp Sağlık                                                                    |
| Proje süresi                                                                                                                                                                                                                                          | 36 ay                                                                         |
| Başlangıç tarihi                                                                                                                                                                                                                                      | 01.03.2021                                                                    |
| Proje bütçesi                                                                                                                                                                                                                                         | ₺115.878,56                                                                   |
| Proje yürütücüsü                                                                                                                                                                                                                                      | Doç. Dr. Gülnur SEVİN                                                         |
| Araştırmacılar                                                                                                                                                                                                                                        | Öğrenci ELİF ALAN                                                             |

## TÜBİTAK 2214-A PROGRAMI KABUL YAZISI



T.C.  
TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI  
Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı

Sayı : E-21514107-115.02-394135  
Konu : Elif ALAN ALBAYRAK

27.03.2023

### İLGİLİ MAKAMA

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'nca yürütülmekte olan 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında, Elif ALAN ALBAYRAK'a araştırma çalışmaları için, toplam 4 ay x EUR1700 = EUR6800 burs ve uçak bileti tahsis edilmiş olup, adı geçen bilim insanı bu olanaklardan yararlanarak AARHUS UNIVERSITY, DANIİMARKA'ya gidecektir.

Bilgilerinize sunulur.

NOT: Bu belge, 23 Şubat 2024 tarihine kadar geçerlidir.

Bu bursiyerlik yazısı, bursiyerin yurt dışına çıkması için verilen izin belgesi niteliğinde bir belge değildir. Sadece finansal destek ile ilgili bilgi içermektedir.

Prof. Dr. Ömer Faruk URSAVAŞ  
BİDEB Başkanı

Bu belge elektronik olarak imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSA66NRBL7

Belge Takip Adresi :  
<https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5445&eD=BSA66NRBL7&eS=394135>

Adres:Atatürk Bulvarı No:221 06100 Kavaklıdere Ankara  
Telefon:(0 312) 468 53 00 Faks:(0 312) 427 74 89  
e-Posta:tubimer@tubitak.gov.tr Web:www.tubitak.gov.tr  
Kep Adresi:tubitak.baskanlik@tubitak.hs03.kep.tr

Bilgi için: Rana Molbay  
Unvanı: Uzman



## Teşekkür

Bilimsel bilgi birikimi ve rehberliği ile doktora tez çalışmalarımın her aşamasında önemli ilerlemeler kaydetmemi sağlayan, laboratuvarındaki her metodu büyük bir sabırla tüm incelikleriyle öğreten değerli danışmanım Doç. Dr. Gülnur SEVİN'e, hem akademik hem kişisel gelişimime sağladığı sonsuz katkılar için, karşılaştığım her zorlukta bana ilham kaynağı olduğu için, eksik etmediği manevi destek ve huzurlu çalışma ortamı için, gösterdiği sonsuz sabır ve anlayış için gönülden teşekkür ederim.

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalındaki kıymetli hocalarımdan; tezimdeki Western blot deneylerine rehberlik eden Prof. Dr. Yasemin ERAÇ'a, Prof. Dr. Zeliha KERRY'e, Prof. Dr. Mukadder YASA'ya, Prof. Dr. Günay YETİK ANACAK'a ve Doç. Dr. Gönen ÖZŞARLAK SÖZER'e eğitimim ve araştırmalarım boyunca huzurlu bir ortam yarattıkları için, hoşgörülerini esirgemedikleri için, akademik gelişimime katkı sağladıkları için çok teşekkür ederim.

Prof. Dr. Şüra BAYKAN ÖZTÜRK'e, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşmasının yanı sıra hem eşimle hem de ostol molekülüyle karşılaşmamı sağladığı için içtenlikle teşekkür ederim.

Akademik yolculuğumda özverili desteği ve rehberliği ile yer alan Prof. Dr. Ulf SIMONSEN'e, tez çalışmalarım sırasında Aarhus Üniversitesi'ndeki tüm imkanları kullanmamı sağladığı için teşekkür ederim.

*In vivo* erektil fonksiyon çalışmalarını öğrenmek üzere laboratuvarını ziyaret etme fırsatı bulduğum değerli hocam Prof. Dr. Feride Sena SEZEN'e, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bu yöntemi ayrıntılı bir şekilde öğrettiği için gönülden teşekkür ederim.

Aarhus Üniversitesi'ndeki tez çalışmalarım boyunca, bilgi birikimleriyle akademik gelişimime önemli katkılarda bulunan ve her soruma büyük bir sabır ve anlayışla cevap veren, yeni yöntemleri özveriyle öğreten Simon Gabriel COMERMA STEFFENSEN'e ve Estéfano PINILLA PÉREZ'e içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yanımda olan, bu zorlu süreçte beraber yürüdüğüm değerli yol arkadaşım Arş. Gör. Emine Nur ÖZBEK'e, gösterdiği sonsuz destek ve anlayış için gönülden teşekkür ederim.

Değerli arkadaşım Gülcan DEMİR'e, her zaman yanımda olarak gösterdiği sabır ve fedakarlık için yürekten teşekkür ederim.

Değerli arkadaşım Beste YURDACAN YAŞAR'a, laboratuvarında birlikte aştığımız tüm zorluklar için verdiği destekten ötürü teşekkür ederim.

Anabilim Dalımızın biricik sekreteri Ergül ÖZİL'e, evrak işlerini hızla ve özenle tamamladığı için, her konuda özveriyle bana destek olduğu için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sayısız anılar biriktirdiğimiz, her ihtiyaç duyduğumda yardım ellerini uzatan, varlıklarıyla güç veren kıymetli dostlarım Sueda SEZEN'e ve Ayça TÜRKYILMAZ'a minnettarlıkla teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her zaman ve her koşulda arkamda olan, başaracağıma olan inançlarını asla kaybetmeyerek beni yüreklendiren, şefkatlerini ve yardımlarını esirgemeyen, bu hayattaki en büyük şanslarım, canım AİLEME, Babam Ayhan ALAN'a, Annem Jülide ALAN'a ve Kardeşim Mustafa ALAN'a, sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

En özel teşekkürü ise hem tez sürecimde hem de hayatın tüm zorluklarında yanımda olan, en yakın arkadaşım ve değerli eşim Gökay ALBAYRAK'a borçluyum. Sürekli desteği, anlayışı ve sabrı için eşime sonsuz teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamı destekledikleri için TÜBİTAK BİDEB 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı'na, TÜBİTAK BİDEB 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı'na ve Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP, Proje kodu: 22681) teşekkür ederim.

Her yorulduğumda güç ve ilham kaynağım olan Mustafa Kemal ATATÜRK'e saygı ve minnetle...

İzmir, 21.12.2023

Elif ALAN ALBAYRAK

## Özgeçmiş

2012 yılında başladığım Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ndeki eğitimimi 2017 yılında dönem birincisi olarak tamamladım. 2017 yılında 5. Sınıf lisans öğrencisiyken, özel öğrenci olarak Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan doktora dersleri almaya başladım. Aynı yılın Eylül ayında, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda doktora programına kayıtlı oldum. 2017 yılında Danimarka'nın Aarhus şehrinde Unisense firmasının düzenlediği dört günlük bir çalışmaya katılarak H<sub>2</sub>S mikrosensör kullanımını öğrendim ve bu teknolojiyi Türkiye'deki laboratuvarımıza entegre etmek için çalışmalar yürüttüm. 2019 yılında TÜBİTAK 2211-C programı kapsamında burs almaya hak kazanarak, aynı yıl Paris'te düzenlenen MuTaLig (COST aksiyonu) kongresinde en iyi sözlü bildiri ödülüne layık görüldüm. 2019 yılı Mart ayında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. 2023 yılında TÜBİTAK 2214-A programı kapsamında, tez çalışmalarımın bir bölümünü gerçekleştirmek üzere Danimarka Aarhus Üniversitesi'nde görevlendirildim. Şu anda Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.

## Burslar

2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı- TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)-01.08.2023-01.12.2023, Danimarka Aarhus Üniversitesi, Biyotıp Anabilim Dalı, Kardiyovasküler ve Pulmoner Farmakoloji Araştırma Laboratuvarı

2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı- TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)-01.10.2017-01.10.2020

## Projeler

Fare Penil Dokusunda H<sub>2</sub>S Yanıtlarının Hem Oksijenaz Yolağı ile İlişkisi, - TÜBİTAK 1002, Yürütücü: Gönen Özşarlak Sözer, Araştırmacı: Deniz Çataklı, **Araştırmacı: Elif Alan Albayrak**, 01/06/2023 (Devam Ediyor) (ULUSAL)

Ostolün Vasküler Dokuyu Oksidatif Stresten Koruyucu Etkisinde Hidrojen Sülfürün Rolünün Araştırılması, -TÜBİTAK 1002, Yürütücü: Gülnur Sevin, **Araştırmacı: Elif Alan Albayrak**, Araştırmacı: Mehmet Zuhuri Arun, 15/01/2023-15/01/2024 (ULUSAL)

Sildenafil ve ostolün hepatoprotektif etkilerinde H<sub>2</sub>S'in rolünün araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Gülnur Sevin, **Araştırmacı: Elif Alan Albayrak**, Araştırmacı: Ozan Mert, Araştırmacı: Gülcan Demir, 18/03/2022- 04/08/2022 (ULUSAL)

Deneyisel tip 2 diyabette gelişen vasküler hasar ve kardiyomiyopatide SGLT2 inhibitörü ile tedavide sirtuinlerin rolü, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Zeliha Kerry, **Araştırmacı: Elif Alan Albayrak**, Araştırmacı: Gönen Özşarlak Sözer, Araştırmacı: Cemre Ural, Araştırmacı: Kuvvat Shamamedov, Araştırmacı: Serap Cilaker Mıçılı, Araştırmacı: Şevki Çetinkalp, Araştırmacı: Zahide Çavdar, Araştırmacı: Ümran Kızrak, 01/08/2022 (Devam Ediyor) (ULUSAL)

Icariinin vasküler gevşetici etkisinde sfingozin-1-fosfat Reseptör 1 (S1PR1)'in rolünün araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Gülnur Sevin, **Araştırmacı: Elif Alan Albayrak**, Araştırmacı: Ozan Mert, 20/07/2022-05/01/2024 (ULUSAL)

Ostolün Erektıl Fonksiyondaki Yararlı Etkilerinde H<sub>2</sub>S'in Rolünün Araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Gülnur Sevin, **Araştırmacı: Elif Alan Albayrak**, 01/03/2021 (Devam Ediyor) (ULUSAL)

*Prangos* Lindl. Türlerinin Sekonder Bileşiklerinin İzolasyonu ve Erektıl Fonksiyon Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması, -TÜBİTAK 1001, Yürütücü: Şüra Baykan, Araştırmacı: Gülnur Sevin, Araştırmacı: Günay Yetik-Anacak, Araştırmacı: Serdar Demir, **Bursiyer: Elif Alan Albayrak**, Bursiyer: Nazlıcan Belen, Bursiyer: Emine Nur Özbek, Bursiyer: Gökay Albayrak, Bursiyer: Tuğçe Demiröz, 01/11/2017-01/11/2020 (ULUSAL)

## Makaleler

**Alan-Albayrak E.**, Mert O., Demir G., Sevin G. (2023). A new insight into the hepatoprotective effect of sildenafil: The role of H<sub>2</sub>S. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396, 2977–2985. Doi: 10.1007/s00210-023-02500-x

Özbek E.N., İstanbullu H., Kızrak Ü., **Alan-Albayrak E.**, Sevin G., Yetik-Anacak G. (2023). The effects of novel triazolopyrimidine derivatives on H<sub>2</sub>S production in lung and vascular tonus in aorta. *Pharmacology*, 108(6), 530-539. Doi: 10.1159/000533419

**Alan E.**, Kerry Z., Sevin G. (2023). Molecular mechanisms of Alzheimer's disease: From therapeutic targets to promising drugs. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 37(3), 397-427. Doi: 10.1111/fcp.12861

Parlar-Coskun S., Sayar-Gümüş G., Tarikoğulları-Doğan A.H., Sözer-Karadağlı L.S., **Alan E.**, Sevin G., Erciyas E., Alptüzün V. (2023). N-Substituted piperidine-3-  
135

carbohydrazide-hydrazones against Alzheimer's disease: Synthesis and evaluation of cholinesterase, beta-amyloid inhibitory activity, and antioxidant capacity. *Archiv der Pharmazie*, 356(3), 2200519. Doi: 10.1002/ardp.202200519

**Alan E.**, Albayrak G., Sevin G., Yetik-Anacak G., Baykan-Öztürk Ş. (2022). Relaxation mechanisms of chloroform root extracts of *Prangos heyndiae* and *Prangos uechtritzi* on mouse corpus cavernosum. *Andrologia*, 54(11), e14604. Doi: 10.1111/and.14604

Turhan K., **Alan E.**, Yetik-Anacak G., Sevin G. (2022). H<sub>2</sub>S releasing sodium sulfide protects against pulmonary hypertension by improving vascular responses in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *European Journal of Pharmacology*, 931, 175182. Doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175182

Sevin, G., **Alan E.**, Demir S., Albayrak G., Demiröz-Akbulut T., Yetik-Anacak G., Baykan Ş. (2022). Comparative evaluation of relaxant effects of three prangos species on mouse corpus cavernosum: Chemical characterization and the relaxant mechanisms of action of *P. pabularia* and (+)-oxypeucedanin. *Journal of Ethnopharmacology*, 284, 114823. Doi: 10.1016/j.jep.2021.114823

### **Kitap Bölümleri**

Kalp Yetersizliği ve Tedavisinde Yeni Hedefler, Bölüm adı:(G-Protein Kenetli Reseptör Kinaz-2) (2023)., **Alan-Albayrak E.**, Sevin G., Türkiye Klinikleri Eczacılık Bilimleri, Editör: Kerry Z., Yağdı T., Basım sayısı:1, Sayfa:162-166, ISBN:978-625-395-075-0, Türkçe (Bilimsel Kitap).

Pharmacology and Toxicology of Cannabinoids, Bölüm adı: (Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting) (2023)., **Alan-Albayrak E.**, Sevin G., Orient yayınları, Editör:Yusuf Kenan Haspolat, Fuat Karakuş, Zübeyde Tanrıverdi, Basım sayısı:1, Sayfa: 36-49, ISBN:978-605-72736-8-0, İngilizce (Bilimsel Kitap).

Pharmacology and Toxicology of Cannabinoids, Bölüm adı: (Pharmacological and Toxicological Effects of Cannabinoids on Stroke) (2023)., Albayrak G., **Alan-Albayrak E.**, Ergüç A., Arzuk E., Orient yayınları, Editör:Yusuf Kenan Haspolat, Fuat Karakuş, Zübeyde Tanrıverdi, Basım sayısı:1, Sayfa: 80-97, ISBN:978-605-72736-8-0, İngilizce (Bilimsel Kitap).

## Ödüller

Sözel Sunum Birincilik Ödülü, Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği, 2023

Sözlü bildiri birincilik ödülünü, Türkiye Diyabet Derneği, 2023

En iyi sözlü bildiri ödülü, COST, FRANSA, 2019

## Bildiriler

Kızrak Ü., Çetinkalp Ş., Kerry Z., Özşarlak-Sözer G., Shamamedov K., **Alan-Albayrak E.**, Cilaker-Mıçılı S., Çavdar Z. Diyabetik ratlarda SLGT2'nin kalp dokusuna etkisi: Gizem çözüldü mü? 8. Diyabet ve Eşlik Eden Hastalıklar Tedavi Kongresi, Türkiye, İstanbul, Sözlü Bildiri, 16-19 Kasım 2023. **En iyi sözlü sunum ödülü.**

Kızrak Ü., Çetinkalp Ş., Kerry Z., Özşarlak-Sözer G., Shamamedov K., **Alan-Albayrak E.**, Cilaker-Mıçılı S., Çavdar Z. Diyabetik ratlarda SGLT2'nin antioksidan etkisi: Glukozürikten fazlası. 25. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, Türkiye, Antalya, 8-12 Kasım 2023. **En iyi sözlü sunum ödülü.**

**Alan-Albayrak E.**, Pinilla Pérez E., Comerma Steffensen S. G., Sevin G., Simonsen U. The natural coumarin osthole improves erectile function by increasing H2S synthesis. 4th Annual Meeting-The Cardiovascular Network, Danimarka, Aarhus, Poster Bildiri, 4 Ekim 2023.

Mert O., **Alan-Albayrak E.**, Demir G., Sevin G. The role of the sphingosine pathway in the icariin-induced relaxations. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD 2023), Türkiye, İzmir, Sözlü Bildiri, 4-6 Mayıs 2023.

Demir G., Kızrak Ü., **Alan-Albayrak E.**, Özşarlak-Sözer G., Kerry Z., Sevin G. Empagliflozin exerts H<sub>2</sub>S-mediated vascular beneficial effects in diabetic erectile dysfunction. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD 2023), Türkiye, İzmir, Sözlü Bildiri, 4-6 Mayıs 2023.

**Alan E.**, Mert O., Demir G., Sevin G. Investigation of the role of H<sub>2</sub>S in the hepatoprotective effects of sildenafil and osthole. 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2022), Türkiye, Ankara, Sözlü Bildiri, 23-25 Kasım 2022.

Mert O., **Alan E.**, Demir G., Karabulut A. B., Sevin G. The effects of monosodium glutamate added to foods as a taste enhancer on erectile function. International Biochemistry Congress 2022, 33rd National Biochemistry Congress, Türkiye, İzmir, Poster Bildiri, 26-30 Ekim 2022.

Albayrak G., **Alan E.**, Sevin G., Yetik-Anacak G., Baykan-Öztürk Ş. The relaxant mechanisms of *Prangos uechtritzi* roots in mouse corpus cavernosum. The Sixth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Türkiye, Gaziantep, Sözlü Bildiri, 26-28 Mayıs 2022.

Albayrak G., **Alan E.**, Sevin G., Yetik-Anacak G., Baykan-Öztürk Ş. *Prangos heyniae* relaxes murine penile tissue via increasing NO and H<sub>2</sub>S synthesis. The Sixth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Türkiye, Gaziantep, Sözlü Bildiri, 26-28 Mayıs 2022.

**Alan E.**, Mert O., Sevin G. Investigation of the role of hydrogen sulfide in the vascular relaxing effect of osthole. 26<sup>th</sup> National and 1st International Pharmacology Congress, Türkiye, Sözlü Bildiri, 4-6 Kasım 2021.

**Alan E.**, Yetik-Anacak G., Sevin G. Does hydrogen sulfide contribute to the effect of osthole on erectile function? 26<sup>th</sup> National and 1<sup>st</sup> International Pharmacology Congress, Türkiye, Sözlü Bildiri, 4-6 Kasım 2021.

Belen N., Demiröz-Akbulut T., Demir S., **Alan E.**, Baykan Ş., Sevin G., Yetik-Anacak G. The journey from ethnobotanical studies to pharmacological target: The effect of imperatorin and isoimperatorin on penile relaxation. Final status of WG

activities within the MuTaLig COST Action, Türkiye, İzmir, Sözlü Bildiri, 5-6 Mart 2020.

Turhan K., **Alan E.**, Belen N., Yetik-Anacak G., Sevin G. Hydrogen sulfide-targeted molecules may be new therapeutic targets for pulmonary arterial hypertension. Final status of WG activities within the MuTaLig COST Action, Türkiye, İzmir, Poster Bildiri, 5-6 Mart 2020.

**Alan E.**, Demiröz-Akbulut T., Demir S., Belen N., Sevin G., Baykan Ş., Yetik-Anacak G. Tracking oxypeucedanin: From ethnobotanical studies to pharmacological target. MuTaLig COST ACTION CA15135 3rd WG meeting 2019, Fransa, Paris, Sözlü Bildiri, 23-24 Şubat 2019. **En iyi sözlü sunum ödülü.**

Sevin G., **Alan E.**, Parlar-Çoşkun S., Özbek E.N., Kaya H.O., Alptüzün V., Yetik-Anacak G. 1,4-dihydropyridine-benzylidenhydrazon derived AChE inhibitor induces H<sub>2</sub>S formation. MuTaLig COST ACTION CA15135 3<sup>rd</sup> WG meeting 2019, Fransa, Paris, Poster Bildiri, 23-24 Şubat 2019.

Albayrak G., **Alan E.**, Sevin G., Yetik-Anacak G., Baykan Ş. Effects of *Prangos heyneiae* H. DUMAN&M.F. WATSON roots on erectile function. 4<sup>th</sup> International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants, Türkiye, İzmir, Poster Bildiri, 2-3 Ekim 2018.

İstanbul H., **Alan E.**, Kızrak Ü., Çoban G., Sevin G., Yetik-Anacak G. Effect of the triazolopyrimidine compound on endogenous H<sub>2</sub>S levels in lung tissue homogenates: A scaffold hopping application on resveratrol derivatives. XXV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry EFMC-ISMIC 2018, Slovenya, Ljubljana, Poster Bildiri, 2-6 Eylül 2018.

Baykan Ş., Sevin G., **Alan E.**, Albayrak G., Yetik-Anacak G. The effect of *Prangos pabularia* Lindl. on erectile dysfunction associated with H<sub>2</sub>S. 12. International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Türkiye, Ankara, Poster Bildiri, 26-29 Haziran 2018.

Yetik-Anacak G., **Alan E.**, Sevin G., Salmanoğlu D.S., Jakopin Z., Tomasic T. (2018). H<sub>2</sub>S formation in liver is induced by ZMP17 and ZMP20. 12. International

Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Türkiye, Ankara, Sözlü Bildiri, 26-29 Haziran 2018.

Albayrak G., **Alan E.**, Sevin G., Yetik-Anacak G., Baykan Ş. Effects Of *Prangos uechtrizii* BOISS&HAUSSKN roots on erectile dysfunction. 1<sup>st</sup> International Traditional and Complementary Medicine Congress (ITCMC), Türkiye, İstanbul, Poster Bildiri, 19-22 Nisan 2018.

Sevin G., **Alan E.**, Yılmaz S., Parlar-Çoşkun S., Alptüzün V., Yetik-Anacak G. A new multitargeted drug candidate in Alzheimer's disease: 1,4-dihydropyridine-benzylidenhydrazon derived AChE inhibitor. Second WG Meeting COST ACTION CA15135 Multi-target paradigm for innovative ligand identification in the drug discovery process (MuTaLig), İspanya, Tenerife, Poster Bildiri, 9-12 Nisan 2018.

**Alan E.**, Sevin G., Yılmaz S., Barış E., Jakopin Z., Tomasic T., Yetik-Anacak G. Resveratrol analog induces hydrogen sulfide formation and vasorelaxation, EpiChemBio (CM1406) and MuTaLig (CA15135) COST actions joint meeting, Portekiz, Porto, Sözlü Bildiri, 24 Eylül 2017.

#### **Sertifika ve Kurslar**

KLİNİK BİYOKİMYADA NANOTEKNOLOJİ VE UYGULAMALARI EĞİTİMİ, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Kurs, 06.08.2022 -11.08.2022 (Ulusal)

IBM SPSS STATISTICS İLE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER, AIMS Analitik Bilgi Yönetim Çözümleri ile SPSS istatistiksel analiz programı eğitimi, Ege Üniversitesi, Kurs, 01.09.2018 -04.09.2018 (Ulusal)

DNA HASARI, ONARIMI VE TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRİK DEĞERLENDİRİLMESİ, Prof. Dr. Miral Dizdaroğlu tarafından verilen uygulamalı kurs, Dokuz Eylül Üniversitesi, Kurs, 05.06.2018 -08.06.2018 (Ulusal)

DENEY HAYVANLARI KULLANIMI KURSU, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen uygulamalı deney hayvanları kullanımı kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi, Kurs, 05.10.2017 -15.10.2017 (Uluslararası)

MICROSENSOR KULLANIM ATÖLYESİ, Unisense Academy tarafından verilen uygulamalı microsensor kullanım kursu, Unisense, Danimarka, Aarhus Kurs, 05.09.2017 -10.09.2017 (Uluslararası)

HPLC VE GC EĞİTİMİ, ETC Danışmanlık tarafından verilen sertifikalı HPLC ve GC eğitimi, Konak, Kurs, 10.03.2016 -12.03.2016 (Uluslararası)

