



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



FARE PENİL DOKUSUNDA H₂S YANITLARININ HEM OKSİJENAZ YOLAĞI İLE İLİŞKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Kuvvat SHAMAMEDOV

Farmakoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

FARE PENİL DOKUSUNDA H₂S YANITLARININ HEM OKSİJENAZ YOLAĞI İLE İLİŞKİSİ

Kuvvat SHAMAMEDOV

Danışman(lar)
Doç. Dr. Gönen ÖZŞARLAK SÖZER

Farmakoloji Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2024

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan

(Danışman) : Doç.Dr. Gönen ÖZŞARLAK SÖZER

Üye : Prof. Dr. Yasemin ERAÇ

Üye : Prof.Dr. Nergiz DURMUŞ
SÜTPİDELER

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

26.08.2024

Önsöz

Erektile disfonksiyon, erkeklerin cinsel sağlık ve yaşam kalitesini etkileyen yaygın bir sorundur. Bu hastalık, erkeğin cinsel ilişki sırasında veya öncesinde ereksiyon sağlama veya sürdürme yeteneğindeki güçlüklerle karakterizedir. Çeşitli faktörler, obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, hormonal dengesizlikler, psikolojik stres ve bazı ilaçlar gibi, bu durumun ortaya çıkma riskini artırabilir. Ancak, erektil disfonksiyonun tam mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır.

Son yıllarda, hidrojen sülfürün (H_2S) vazodilatasyon ve düz kas gevşemesi gibi biyolojik yanıtları üzerine yapılan araştırmalar, penil fonksiyonların anlaşılmasında yeni bir pencere açmıştır. H_2S ile birlikte NO ve CO gibi gazotransmitterler, birçok yaşamsal fonksiyonda önemli rol aldığı kalp, böbrek ve karaciğer dokusunda yapılan önceki çalışmalarda H_2S 'in, HO-1 ekspresyonu ile birlikte CO düzeylerini arttırdığı biliniyor. NO ve H_2S 'in gevşeme yanıtlarına etkisi ve etkileşimleri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir, ancak CO'in penil doku yanıtlarına etkisi ve HO-1'in H_2S ile ilişkisi yeterince açıklanmamıştır. Bu sebeple, araştırmamız literatürden edindiğimiz bilgilerden yola çıkarak, fare penil dokusunda CO ve hem oksijenaz yolağı ile H_2S ilişkisini incelemeyi amaçlamaktadır. Tezimin, erektil disfonksiyonun karmaşık yapısını daha iyi anlamamıza ve gelecekte bu bilgiler ışığında yeni tedavi stratejileri geliştirmemize yardımcı olacağını umuyorum.

Son olarak tez çalışmasının bana çok şey kattığını söylemekle birlikte, benim için bir değer hazinesi oldu. Yüksek lisans yolculuğumda farmakolojinin derinliklerine doğru, bilgi denizinde yüzdüm, geliştim, kendimi buldum. Laboratuvarında, arkadaşlarımla desteğiyle, ve hocalarımla rehberliğinde ilerledim. şimdi, tezimin bu kısmında, öğrendiklerimle, yaşadıklarımla dolu, bir yolculuğun güzel anısıyla, sözlerimi tamamlıyorum. Özellikle tez sürecim boyunca, bilimsel ve her anlamda, her adımda yanımda olan, başta danışman hocam Doç. Dr. Gönen ÖZşARLAK SÖZER olmak üzere, herkese minnettarım.

İzmir, 25.08.2024

Kuvvat SHAMAMEDOV

Özet

FARE PENİL DOKUSUNDA H₂S YANITLARININ HEM OKSİJENAZ YOLAĞI İLE İLİŞKİSİ

Amaç: Erektile disfonksiyonda penil dokusu, erkek cinsel fonksiyonlarının düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Son yıllarda, kardiyovasküler hastalıklarda NO, H₂S ve CO gibi gazotransmitterler arasındaki etkileşim, birçok çalışmanın odak noktası haline gelmesine rağmen penil dokusunda H₂S'in diğer gazotransmitterlerle ilişkisi ve etkileri henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bu bağlamda, H₂S'nin penil dokuda hangi mekanizmalar aracılığıyla etkili olduğunu anlamak, erkek cinsel sağlığının anlaşılmasında önemli bir adım olacağından ötürü bu tez araştırmasında fare corpus cavernosum dokusunda H₂S gevşeme yanıtlarının endojen ve eksojen kaynaklı CO ile ilişkisinin aydınlatılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Fare corpus cavernosumunda CO donörü CORM-2, HO-1 aktivatörü Hemin varlığında H₂S prekürsörü olan L-Sistein ve NaHS gevşeme yanıtları alınmıştır. İkinci deney düzeneğinde ise hemoksijenaz aktivatörü, hemoksijenaz inhibitörü ve eksojen CO donörü olan CORM-2 ile inkübasyonun endojen H₂S düzeyi üzerine etkisi metilen mavisi deneyleriyle araştırılmıştır.

Bulgular: İzole organ banyosu çalışmalarında CO donörü olan CORM-2, HO-1 aktivatörü Hemin ve HO-1 inhibitörü olan CrMP (Cr(III) Mesoporphyrin IX chloride) varlığında alınan yanıtlarda farklılık görülmüştür. Kontrol grubuna kıyasla CrMP inkübasyonu sonrası alınan L-sistein yanıtlarında E_{max} değerinde azalma, CORM-2 ve Hemin inkübasyonu sonrası alınan L-sistein yanıtlarında ise E_{max} değerinde artış görülmüştür. L-sistein pD-2 değerlerine bakıldığında ise anlamlılık bulunmamıştır. Metilen mavisi deneyinde L-sistein ile indüklenen CORM-2 ve Hemin'in kontrol L-sistein grubuna kıyasla H₂S düzeylerini arttırdığını ve bu artışın AOAA ile geri döndüğü gösterilmiştir. Kontrol L-sistein grubuna kıyasla HO-1 inhibitörü olan CrMP'nin H₂S düzeylerini azalttığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler; Erektile disfonksiyon, CORM-2, E_{max}, CrMP, Hemin, Hidrojen Sülfür(H₂S)

Abstract

ASSOCIATION OF H₂S RESPONSES WITH HEME OXYGENASE PATHWAY IN MOUSE PENILE TISSUE

Objective: Penile tissue plays a critical role in regulating male sexual function in erectile dysfunction. Despite the interaction between gasotransmitters such as NO, H₂S, and CO becoming a focal point of many studies in recent years, the relationship and effects of H₂S with other gasotransmitters in penile tissue are not yet fully understood. In this context, understanding through which mechanisms H₂S is effective in penile tissue would be a significant step toward understanding male sexual health. Therefore, this thesis aims to elucidate the relationship between H₂S relaxation responses in mouse corpus cavernosum tissue and both endogenous and exogenous sources of CO.

Materials and Methods: Relaxation responses to H₂S precursor L-Cysteine and NaHS were obtained in mouse corpus cavernosum in the presence of CO donor CORM-2 and HO-1 activator Hemin. In the second experimental setup, the effect of incubation with hem oxygenase activator, hem oxygenase inhibitor, and exogenous CO donor CORM-2 on endogenous H₂S levels was investigated through methylene blue experiments.

Results: Differences were observed in responses obtained in the presence of CO donor CORM-2, HO-1 activator Hemin, and HO-1 inhibitor CrMP (Cr(III) Mesoporphyrin IX chloride) in the vascular reactivity assay. A decrease in $E_{\max}$ value was observed in L-Cysteine responses after CrMP incubation compared to the control group, while an increase in $E_{\max}$ value was observed in L-Cysteine responses after CORM-2 and Hemin incubation. No significance was found in L-Cysteine $pD-2$ values. In the methylene blue experiment, it was demonstrated that CORM-2 and Hemin induced by L-Cysteine increased H₂S levels compared to the control L-Cysteine group, and this increase was reversed by AOAA. It was observed that the HO-1 inhibitor CrMP reduced H₂S levels compared to the control L-Cysteine group.

Keywords: Erectile dysfunction, CORM-2, $E_{\max}$, CrMP, Hemin, Hydrogen Sulfide (H₂S)

İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	IV
İçindekiler	V
Tablolar Dizini.....	VII
Şekiller Dizini	VIII
Kısaltma Listesi	X
1. Giriş.....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	1
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	1
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	2
2. Genel Bilgiler	3
2.1. Eretil Disfonksiyon	3
2.1.1. Penis Fizyolojisinde H ₂ S ve Sentezi	3
2.1.2. Karbon Monoksit (CO), Sentezinde Görevli Enzimler ve Eretil Fonksiyondaki Fizyolojik Önemi.....	4
2.2. Karbon Monoksit (CO) Donörü CORM Kompleksleri.....	7
2.2.1. Biyolojik ve Farmakolojik Özellikleri.....	8
3. Gereç ve Yöntem	9
3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Hazırlanması	9
3.2. İzole Organ Banyosu Deney Hazırlığı.....	13
3.2.1. Korpus Kavernosumun İzolasyonu	13
3.2.2. Krebs Çözeltisinin Hazırlanması.....	14
3.2.2.1. Konsantre 20x Krebs Hazırlanması	14
3.2.2.2. 1x Krebs Hazırlanması	15
3.2.3. İzole Organ Banyosu Çözeltilerinin Hazırlanması	15
3.3. İzole Organ Banyosu Deneyi.....	16
3.4. Penil Doku Homojenizasyonu	18
3.5. Biçinkoninik Asit Yöntemi (BCA).....	19

3.5.1. Protein Miktarının Tayini	19
3.6. Metilen Mavisi Deneyi	20
3.6.1. Deney Grupları.....	20
3.6.2. Metilen Mavisi Deney Çözeltilerinin Hazırlanması.....	21
3.6.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	21
3.6.4. %10 TCA, %1 ZnAC, DPD ve FeCl ₃ Hazırlanması	22
3.6.5. Metilen Mavisi Deney Protokölü	23
3.7. İstatistiksel Veri Analizi	24
4. Bulgular.....	25
4.1. İzole Organ Banyosu Deneyi.....	25
4.1.1. CORM-2, CrMP ve Hemin'in Fenilefrin Kasılma Yanıtları Üzerine Etkileri	25
4.1.2. CORM-2, CrMP ve Hemin'in Fenilefrin Kasılma Sonrası NaHS Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkisi.....	27
4.1.3. CORM-2, CrMP ve Hemin'in Fenilefrin Kasılma Sonrası L-Sistein Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkisi.....	29
4.2. Metilen Mavisi Deneyi	32
4.2.1. Eksojen CO Donörü CORM-2'nin H ₂ S Düzeylerine Etkisi.....	32
4.2.2. Endojen CO'in H ₂ S Düzeylerine Etkisi	33
Tartışma	35
Sonuç ve Öneriler	42
Kaynaklar	44
Ekler	52
Teşekkür	53
Özgeçmiş	54

Tablolar Dizini

Tablo 1. CO'in Biyoaktif Özellikleri(Motterlini ve diğerleri., 2003).....	5
Tablo 2. Kullanılan Cihazlar.....	9
Tablo 3. Kullanılan Maddeler ve Kimyasallar	11
Tablo 4. Konsantre Krebs Hazırlanmasında Kullanılan Maddeler	15
Tablo 5. Normal Krebs Hazırlamada Kullanılan Maddeler	15
Tablo 6. 1.Seri Standart Seyreltmeler	22
Tablo 7. 2.Seri Standart Seyreltmeler	22
Tablo 8. Fare Penil Dokusunda CORM-2 CrMP ve Hemin İnkübasyonu Sonrası Kümülatif Fenilefrin Kasılma Yanıtları (E_{max})	26
Tablo 9. Fare Penil Dokusunda CORM-2 CrMP ve Hemin İnkübasyonu Sonrası Kümülatif Fenilefrin Kasılma pD_2 Değerleri.....	27
Tablo 10. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası NaHS Gevşeme Yanıtları (E_{max})	28
Tablo 11. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası NaHS Gevşeme pD_2 Değerleri.....	29
Tablo 12. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-Sistein Gevşeme Yanıtları (E_{max})	31
Tablo 13. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-Sistein pD_2 Değerleri.....	32
Tablo 14. Kontrol, CORM-2, L-Sistein ve AOAA Grubu H_2S Düzeyleri.....	33
Tablo 15. Kontrol, Hemin, L-Sistein ve AOAA Grubu H_2S Düzeyleri	34

Şekiller Dizini

Şekil 1. Hidrojen Sülfürün (H ₂ S) Endojen Enzimatik Sentezi(Donnarumma, Trivedi, & Lefer, 2017).....	3
Şekil 2. CSE/CBS Enzimlerinin Penis Dokusundaki Yerleşimi(Qiu ve diğerleri., 2012).	4
Şekil 3. CO oluşumu ve HO-1 Enzimi ile Hemeproteinin Kataliz Mekanizması (Haines & Tosaki, 2020).....	5
Şekil 4. Heme Oksijenazın (HO-1) Aracılı Heme Bozunması ve Oluşan Ürünlerin Hedef Etkileri (B. Wu, Wu, & Tang, 2019)	6
Şekil 5. Gaz veya CO Donörünün (CORM) Farmakolojik ve Biyolojik Etkileri(Motterlini & Otterbein, 2010)	8
Şekil 6. Swiss Albino	9
Şekil 7. Penil Doku İzolasyonu.....	13
Şekil 8. Temizlenen Korpus Kavernozum	14
Şekil 9. Banyoya Yerleştirilen Korpus Kavernoz Dokusu	16
Şekil 10. İzole Organ Banyosu Deney Protokölünün Şeması.....	17
Şekil 11. Penil Doku Homojenizasyonu.....	18
Şekil 12. Protein Tayini Standart Eğri.....	20
Şekil 13. Metilen Mavisi Deney Grupları.....	21
Şekil 14. Metilen Mavisi Deney Şeması.....	23
Şekil 15. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnkübasyon Sonrası Kümülatif Fenilefrin Kasılma Yanıtları	25
Şekil 16. Fare Penil Dokusunda CORM-2 CrMP ve Hemin İnkübasyon Sonrası Kümülatif Fenilefrin Kasılma Yanıtları (E _{max})	26
Şekil 17. Fare Penil Dokusunda CORM-2 CrMP ve Hemin İnkübasyon Sonrası Kümülatif Fenilefrin Kasılma pD ₂ Değerleri.....	26
Şekil 18. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası NaHS Gevşeme Yanıtları	27
Şekil 19. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası NaHS Gevşeme Yanıtları (E _{max})	28
Şekil 20. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası NaHS Gevşeme pD ₂ Değerleri.....	29

Şekil 21. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-Sistein Gevşeme Yanıtları	30
Şekil 22. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-Sistein Gevşeme Yanıtları (E_{max}).....	30
Şekil 23. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-Sistein Gevşeme pD_2 Değerleri	31
Şekil 24. Eksojen CO Donörü CORM-2'nin H₂S Düzeyleri Üzerine Etkisi	32
Şekil 25. Endojen CO'in H₂S Düzeyleri Üzerine Etkisi.....	33
Şekil 26. NO ve Sentezinde Görevli Enzimler(Maas, Schwedhelm, Albsmeier, & Boger, 2002).....	35
Şekil 27. Kavernöz Düz Kasta NO ve Ca^{+2} Bağımlı Gevşeme(de Souza ve diğerleri., 2022)	36
Şekil 28. CORM-2 ile DMSO Arasındaki Tepkime(Juszczak, Kluska, Wysokinski, & Wozniak, 2020).....	40
Şekil 29. Ekstraselüler Alkali Hale Getirmeye Maruz Bırakılan Endotel İntact Ve Endotel-Denuded Sıçan Torasik Aort Halkalarında pH Yanıt Eğrisi(Celotto ve diğerleri., 2010).....	41

Kısaltma Listesi

HO	: Hem Oksijenaz
CORM-2	: Trikarbonildiklororutenyum II Dimeri
CSE	: Sistatyonin- γ -Liyaz
CBS	: Sistatyonin - β -Sentaz
CrMP	: Cr(III) Mezoporfirin IX Klorür
H ₂ S	: Hidrojen Sülfür
DPD	: N, N-Dietil-p-Fenilendiamin
PPB	: Fosfat Buffer
TCA	: Trikloroasetik Asit
HEMİN	: Heme Ferrik Klörür
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
AOAA	: Aminooksii Asetik Asit
NaHS	: Sodyum Hidrosülfür
CO	: Karbon Monoksit
PP	: Peridoksal-5-Fosfat
NO	: Nitrik Oksit
KCl	: Potasyum Klörür
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
MPST	: Merkaptopiruvat Sülfür Transferaz

Ach	: Asetilkolin
BCA	: Bisinkoninik Asit
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
GC	: Guanilil Siklazı
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
CCSM	: Corpus Kavernozum Düz Kas Hücrelerinin Fenotipik Modülasyonu
PMSF	: Fenilmetil Sülfonil Florür
CC	: Korpus Kavernozum
ED	: Erektile Disfonksiyon

1. Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Erektile disfonksiyon günümüzde önemli bir sağlık sorunudur ve kardiyovasküler hastalıkların ön belirtisi olarak kabul edilmektedir. Altta yatan nedenlere bağlı olarak erektil disfonksiyon, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, hormonal dengesizlikler gibi bir dizi sağlık sorununun bir belirtisi veya komplikasyonu olarak da ortaya çıkabilir. Mevcut ilaçların etkisiz kaldığı durumlarda, yeni ilaçlara ve yeni tedavi yaklaşımlarına yönelik bir talep ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple, ilaçların farmakolojik etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, etkili tedavi hedeflerinin tanımlanması ve bu hedeflere yönelik yeni ilaçların hem keşfedilmesi hem de geliştirilmesi için yoğun bir araştırma ve geliştirme çabası gerekmektedir.

Araştırmamızda, korpus kavernosum dokusunda önemli rol oynayan hidrojen sülfürün (H_2S), bu dokuda bulunan endojen ve eksojen karbon monoksit (CO) ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

CO donörü olan CORM-2 molekülünün penil dokudaki H_2S ile ilişkisi var mıdır?

H_2S ile endojen CO üretiminde rol oynayan hem oksijenaz (HO-1) enziminin ilişkisi var mıdır?

Sorularına izole organ banyosu ve metilen mavisi deneyleri aracılığıyla yanıt aranacaktır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

CORM-2 molekülünden salıverilen eksojen CO 'ın CBS ve CSE enzimleri aracılığıyla L-sisteinden üretilen H_2S ile birlikte gevşemeyi arttırması beklenmektedir. Öte yandan hem oksijenaz enzimi aktivatörü hemin verildiğinde üretilen endojen CO 'ın hidrojen sülfür gevşeme yanıtlarını arttırması beklenmektedir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Heme katabolizmasında hem oksijenaz (HO-1) enzimi aracılığıyla, biliverdin'den bilirubin oluşurken CO ve Fe^{+2} (demir) ortaya çıkar. Oluşan Fe^{+2} iyonu, ferritin senteziyle anti-apoptotik özellikler gösterirken, bilirubin antioksidan ve anti-enflamatuar özellikler sergiler. Öte yandan, oluşan CO , anti-apoptotik, anti-

enflamatuar, antiproliferatif ve en önemlisi vasküler disfonksiyonda vazokonstriksiyonu inhibe etme gibi işlevlere sahiptir. CO'nin sergilediği bu etkiler dışında düz kas dokusunda gevşetici etkisi olan H₂S ile ilişkisi olduğu düşünülerek HO-1 enzimi aktivatörü hemin ve CORM-2 verildiğinde hem endojen üretilen hem de eksojen salıverilen CO, CBS ve CSE enzimleri üzerinden L-sisteinden sentezlenen H₂S'le birlikte vazodilatasyonu artırır.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

H₂S ölçümü daha hassas bir yöntem olan sensör aracılığı ile yapılabilmektedir. Maddi anlamda bütçemizin önemli kısmını kapsayacağı ve diğer malzemelerin satın alımında güçlüklerle neden olacağı için prob (sensör) temin edilememiştir. Bu sebeple araştırmamızda H₂S düzeylerinin belirlenmesinde geleneksel model olan metilen mavisi yöntemi tercih edilmiştir. Diğer bir sınırlılık ise HO-1 enzimi inhibitörü ve aktivatörü sonrası CBS ve/veya CSE enzimlerinin yine maddi kısıtlılıklar nedeniyle ekspresyon düzeylerinin ölçülememesidir.

1.6. Araştırmanın Amacı

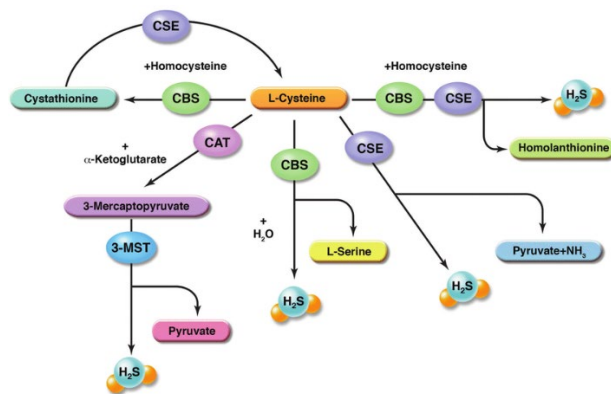
Tezin amacı; Penil dokuda ilk kez CO'nin H₂S sinyal yolağındaki ilişkisi ve etkisinin araştırılmasıdır. Bu bağlamda, tezin ana hedefleri CORM-2 ve Hemin ile inkübe edilmiş hem endojen hem de eksojen olarak salınan CO'nin penil dokudaki gevşetici etkisini CBS ve CSE enzimleri aracılığıyla H₂S ile ilişkisini belirlemek için yapılan izole organ banyosu çalışmalarını içermektedir. Ayrıca, hidrojen sülfürle ilişkisi olduğunu düşündüğümüz CO'nin CSE ve CBS enzimleri üzerinden H₂S oluşumunu veya aktivitesini metilen mavisi deneyleri ile değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

2. Genel Bilgiler

2.1. Erektıl DisfonksiyonKardiyovasküler hastalıkların bir belirtisi olan erektıl disfonksiyon, yaygın bir sağlık sorunudur. Bu durum, hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabet, obezite, fiziksel aktivite eksikliği, sigara içme, kötü beslenme, aşırı alkol tüketimi ve depresyon gibi psikolojik stresi de içeren çeşitli faktörlerle ilişkilendirilir(Jackson, 2013). Erektıl disfonksiyon sadece cinsel aktivitenin azalmasıyla sınırlı olmayıp, sistemik endotelial disfonksiyonun bir göstergesidir (de Souza, Ferreira, Vasconcelos, Cavalcante, & da Silva, 2022). Bu nedenle penis endotelindeki bozukluk sistemik endotel disfonksiyonun bir öncüsü olarak belirtilmekte ve kardiyovasküler hastalıkların erken bir göstergesi olarak kabul edilmektedir(Shin, Pregenzer, & Gardin, 2011; G. Yetik-Anacak, Sorrentino, Linder, & Murat, 2015).

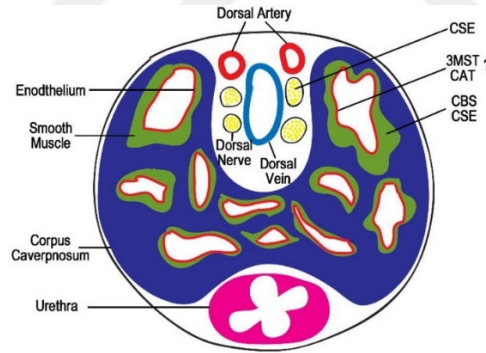
2.1.1. Penis Fizyolojisinde H₂S ve Sentezi

Hidrojen sülfür (H₂S), memelilerde enzimatik ve nonenzimatik olmayan süreçlerle üretilen bir gaz halindeki sinyal molekülüdür. CBS ve CSE enzimleri, L-sistein substratını kullanarak H₂S sentezler. Kardiyovasküler sistemde H₂S ağırlıklı olarak CSE enzimi tarafından sentezlenirken, santral sinir sisteminde ise CBS enzimi aracılığıyla sentezlenir. Her iki enzim de piridoksal-5-fosfatı kofaktör olarak kullanır(Şekil 1)(Eto, Ogasawara, Umemura, Nagai, & Kimura, 2002; W. Zhao, Zhang, Lu, & Wang, 2001).



Şekil 1. Hidrojen Sülfürün (H₂S) Endojen Enzimatik Sentezi(Donnarumma, Trivedi, & Lefer, 2017)

Son araştırmalar, penil dokuda L-Cys/H₂S sisteminin varlığına dair artan kanıtlar sunmaktadır. Bu sistemin varlığını doğrulayan ilk kanıt, 2007'de Srilatha ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır(B. Srilatha, P. G. Adaikan, L. Li, & P. K. Moore, 2007). Tavşan corpus cavernosum örneklerinde yapılan çalışmalarda, H₂S'in L-Cys ile inkübe edilmiş örneklerde tespit edilmesi bu sistemin mevcudiyetini desteklemektedir. Homojenize edilen dokuların L-Cys ile inkübasyonu H₂S üretimini üç katına çıkarmıştır. AOAA veya AOAA ve PAG kombinasyonu, H₂S üretimindeki artışı önemli ölçüde engellemiştir(Qiu, Villalta, Lin, & Lue, 2012). H₂S sentezinde görev alan CBS ve CSE'nin insan corpus cavernosumunda bulunduğu, Bianca ve arkadaşları qRT-PCR ve western blot kullanılarak gösterilmiştir(R. d'Emmanuele di Villa Bianca ve diğerleri., 2009). CBS ve CSE'nin penil arterin kas trabekülleri ve düz kas bileşenlerinde lokalize olduğunu immünhistokimyasal boyama ile göstermiştir (şekil 2). CSE, sıçan penisinin dorsal sinirlerinde eksprese edildiği gösterilmekle birlikte aynı dokuda CBS ekspresyonu gösterilememiştir. Bu da CSE'nin corpus cavernosumda, hem düz kas hücrelerinde hem de nöral hücrelerde H₂S yolunu tetikleyerek bir rol oynayabileceğini göstermektedir(Albersen, Fandel, ve diğerleri., 2011).

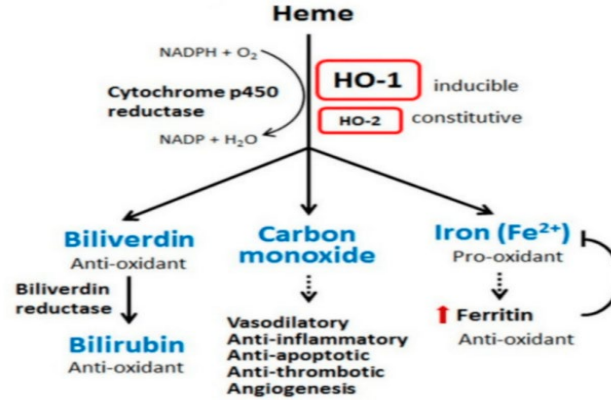


şekil 2. CSE/CBS Enzimlerinin Penis Dokusundaki Yerleşimi(Qiu ve diğerleri., 2012).

2.1.2. Karbon Monoksit (CO), Sentezinde Görevli Enzimler ve Erektile Fonksiyondaki Fizyolojik Önemi

Günümüze dek yapılan araştırmalar, karbon monoksitin (CO) endojen üretiminin ve fizyolojik fonksiyonlarının çeşitli yönlerini ortaya çıkarmaktadır. Endojen CO'in

büyük bir kısmı, hem oksijenaz (HO) enzimi tarafından katalize edilen bir reaksiyonla üretilir (Şekil 3)(Haines & Tosaki, 2020).



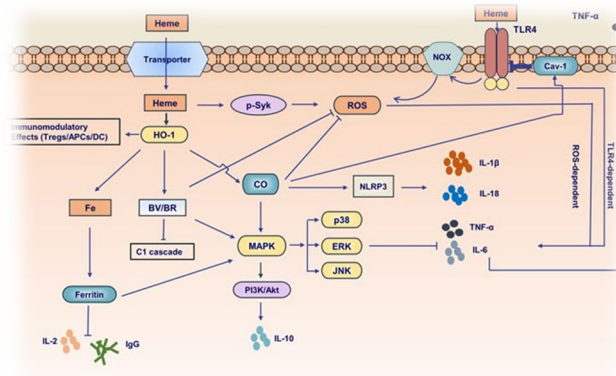
Şekil 3. CO oluşumu ve HO-1 Enzimi ile Hemeprotein Kataliz Mekanizması
(Haines & Tosaki, 2020)

Birçok kişi tarafından yalnızca zararlı bir gaz olarak bilinse de, diğerleri tarafından belirsizlikle karşılanmasına rağmen, bu etkiler arasında nörotransmisyon, damar tonunun kontrolü, anti-inflamatuar eylemler, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, nöroendokrin fonksiyonlar, iyon kanallarının aktivasyonu, oksijen algılama, hücre proliferasyonunun kontrolü, anti-apoptotik ve sitoprotektif etkiler bulunmaktadır. CO'nin aracılık ettiği tüm bu biyoaktiviteler, alanındaki araştırmacılar tarafından hazırlanan raporlarda veya incelemelerde detaylı bir şekilde açıklanmıştır (Tablo 1)(Motterlini ve diğerleri., 2003).

Tablo 1. CO'in Biyoaktif Özellikleri(Motterlini ve diğerleri., 2003)

CO biyoaktivitesi	Hedef
Vazoaktif etkiler	Kardiyovasküler ve solunum sistemleri Sinir sistemi; Hepatik ve renal dolaşım Gastrointestinal sistem
Anti-inflamatuar etkiler	Kardiyovasküler ve solunum sistemleri Gastrointestinal sistem
Trombosit agregasyonunun inhibisyonu	Kardiyovasküler sistem
Nörotransmisyon ve nöroendokrin fonksiyon	Sinir sistemi
İyon kanallarının aktivasyonu	Kardiyovasküler sistem
Oksijen algılama	Kardiyovasküler ve sinir sistemleri
Düz kas hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonu	Kardiyovasküler sistem Solunum sistemi
Anti-apoptotik ve sitoprotektif etkiler	Kardiyovasküler ve solunum sistemleri Gastrointestinal sistem

CO, nöronal sistemde bir sinyal molekülü olarak işlev görerek nörotransmitterlerin ve nöropeptit salınımının düzenlenmesini, öğrenmeyi, hafızayı, koku tepkisi adaptasyonunu ve diğer birçok nöronal aktiviteyi etkiler(Wu & Wang, 2005). HO enziminin HO-1/2/3 olmak üzere 3 tane izoformu vardır. HO-1, hipoksi, stres, ROS, inflamatuvar sitokinler, çeşitli geçiş metalleri ve ağır metaller de dahil olmak üzere birçok uyarıcı tarafından indüklenir(Ryter, Alam, & Choi, 2006). HO-1 uyarılması, demirin salınımına ve biliverdin ile CO'nun oluşumuna yol açar. Bu, glutatyon ve bilirubin antioksidanların artmasına ROS seviyelerini ve inflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde etkilidir(Şekil 4). HO-1, sinir liflerinde daha az olmakla birlikte; penil arterlerin endotel astarında ve corpus cavernosum ve spongiosumun sinusoidal duvarlarında net bir şekilde bulunduğu belirtilmiştir(Hedlund, Ny, Alm, & Andersson, 2000). HO-2, endotelyum ve CCSM'de(corpus cavernosum düz kaslarında) konstitütif olarak ifade edilen bir hem sensörüdür ve HO-1 de dahil olmak üzere hem duyarlı transkripsiyon faktörlerinin ve genlerinin aktivitesini ayarlama görevlidir. HO-2 ekspresyonu, sıçan ve insan ürogenital sistemdeki pelvik ganglion ve bulbo-spongiosus kaslarını innerve eden sinir liflerinde daha yoğun bir şekilde bulunur(M. T. A. Aziz ve diğerleri., 2005; Burnett ve diğerleri., 1998; Hedlund ve diğerleri., 2000; Ushiyama, Morita, Kuramochi, Yagi, & Katayama, 2004). HO-3'ün biyolojik işlevi net bir şekilde bilinmese de sıçan dokularında, beyin, karaciğer, böbrek ve dalak dahil olmak üzere işlevinin olduğu düşünülmektedir(Hayashi ve diğerleri., 2004; Ryter ve diğerleri., 2006).



Şekil 4. Heme Oksijenazın (HO-1) Aracılı Heme Bozunması ve Oluşan Ürünlerin Hedef Etkileri (B. Wu, Wu, & Tang, 2019)

Dışarıdan verilen CO'in sıçanlarda doz bağımlı olarak korpus kavernozaumu gevşettiği doğrulanmıştır(Ushiyama ve diğerleri., 2004). Hipertansif sıçanlarda α -tokoferolün antioksidan etkisini araştıran bir çalışmada endotel fonksiyonunun yanı sıra nöronal iyileştirici etkinin korpus kavernozaumda NO ve CO üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir(Ushiyama, Kuramochi, Yagi, & Katayama, 2008). Penil doku üzerinde yapılan diğer bir araştırmada ise HO-1 aktivatörü hemin uygulandığında heme metabolizmasının corpus cavernosumda cGMP oluşumuna ve inhibitörü SnMP uygulandığında ise cGMP'de bir azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur. Bu da HO-1 kaynaklı CO'in penil arteriyoller ve sinüslerde kan akışını artırdığını göstermektedir(M. T. Abdel Aziz ve diğerleri., 2008). Ayrıca heme oksijenaz enzimin indüklenbilir HO-1 izoformunun fare penil dokusunda vasküler düz kas tonusunu düzenlediği ve hipoksik hasara karşı koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir(Jin ve diğerleri., 2008).

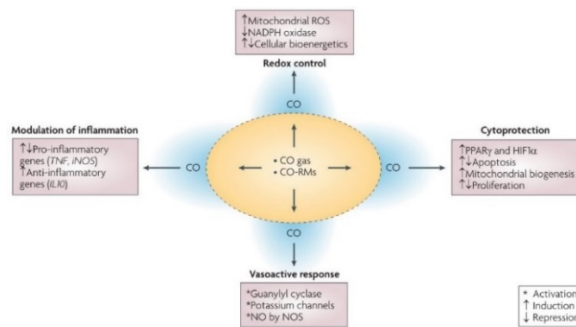
2.2. Karbon Monoksit (CO) Donörü CORM Kompleksleri

CORM'ların (CO salan moleküller) bir pro ilaç olarak geliştirilmesi önemli ilgi çekmiştir. CORM'lar, ışık, ligandlar, enzimler vb. tarafından tetiklenen CO'in güvenli ve kontrol edilebilir bir şekilde salınmasına olanak verirler(Adach, Błaszczuk, & Ols, 2020). Farklı dalga boylarındaki ışığın foto-kimyasal dış uyarımıyla gerçekleşen CO salınımı FotoCORM olarak adlandırılır ve CORM-1 örnek verilebilir. CORM-2'de ise ligandın değiştirilmesi ile ve örneğin sülfürle yeni bir bağ oluşturularak, CO'i spontane olarak salınır. CORM-3, termal bozunma ve ligand değişimi gibi tetikleyici faktörlerin kombinasyonu ile CO salınımını gerçekleştirebilir. Diğer tetikleyiciler arasında pH değişikliği ve oksidasyon da bulunur(Agostinis ve diğerleri., 2011; Anna Christin Kautz, Peter C Kunz, & Christoph Janiak, 2016). CO salınımından sonra metaller ve diğer kalıntılardan olası yan etkileri önlemek ve belirli dokuları veya hastalıkları hedeflemek için bu CORM'lar, peptitler, polimerler, nanopartiküller, dendrimerler, protein kafesleri, tabletler ve metal-organik yapılar gibi biyobenzer sistemlere bağlanır(A. C. Kautz, P. C. Kunz, & C. Janiak, 2016). Yapısal olarak bir metal çekirdek ve bağlı ligandlardan oluşan CORM'lar uygun bir metal oksidasyon durumu ve kolligand seçerek, karbon monoksitin belirli dokulara ulaşmasını hedeflemek mümkündür. CO salıveren moleküllerin kimyasal yapıları ve özellikleri **Tablo 2'**de verilmiştir. Dolayısıyla farmakolojik özelliklere sahip uygun CORM'lar hastalığa

bağlı olarak terapötik CO uygulaması için kesin bir yöntemin temelini oluşturabilirler(Romão, Blättler, Seixas, & Bernardes, 2012).

2.2.1. Biyolojik ve Farmakolojik Özellikleri

Karbon Monoksit Donörleri, Nielson ve arkadaşı Garza tarafından antikoagülasyon aktivitelerini belirlemek için in vitro ortamda en iyi şekilde üç tane CORM yapısı incelenmiştir: CORM-2 (karbonil diklorororuten (II) trikarbonil dimeri), CORM-3 (rutenyum (II) trikarbonil dimeri) ve CORM-A1 (sodyum borat). CORM-2 $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ ve CORM-3 $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glisinat})]$, kan pıhtılaşmasının yoğunluğunu arttırarak, kan pıhtısı oluşum hızı ve pıhtı kuvveti üzerinde benzer bir ölçekte etki göstermiştir. Buna karşın, CORM-A1 $[\text{Na}_2\text{H}_3\text{BCO}_2]$ kan pıhtılaşmasını etkilememiş, ancak fibrinoliz üzerinde inhibisyon etkileri göstermiştir(Nielsen & Garza, 2014). Lipopolisakkarit uyarımı sonrasında, makrofajların hızla oksitlendiği ve reaktif oksijen türleri ürettiği ancak, önceden 50 μM konsantrasyonda CORM-2 ile muamele edilen hücrelerde ROS birikiminin belirgin şekilde azaldığı görülmüştür(Adach & Olas, 2017). Bazı CORM moleküllerinin suda çözünürlüğü kötüdür ve bu davranış biyomedikal uygulamalarını engelleyebilir. Son birkaç yılda, CORM bileşiklerinin terapötik dozlarını optimize etmek için çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu bileşikler farklı konsantrasyonlarda vasküler disfonksiyonu önleyebilir, anti-inflamatuar, antikoagülan ve antikanser etkilere sahip olabilir(Adach ve diğerleri., 2020). CO ve CORMların biyolojik ve farmakolojik özelliklerini özetleyecek olursak sitoprotektif, vazoaktif yanıtta, bağışıklık sisteminin modülasyonunda ve redox yanıtların kontrol edilmesinde görev aldığı söylenebilir(**Şekil 5**)(García-Gallego & Bernardes, 2014). Bu nedenle, çeşitli CORM'ların umut verici etkilerinin daha fazla in vitro ve in vivo çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.



Şekil 5. Gaz veya CO Donörünün (CORM) Farmakolojik ve Biyolojik Etkileri(Motterlini & Otterbein, 2010)

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Hazırlanması

Tüm deney serilerinde ağırlıkları 32-34mg aralığında toplam 40 adet swiss albino cinsi erkek fare kullanılmıştır(Şekil 6). Deneye alınan fareler E.Ü Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde barındırılmıştır. Ortamın fiziksel koşulları: Normal oda ısısı (20°C) ve nemlilikte (%75), denekler direkt güneş ışığından (UV etkisi) uzak , 6'şarlı kafeslerde 12 saat gece 12 saat gündüz aydınlatma koşullarında yetiştirilmiştir.



Şekil 6. Swiss Albino

Tüm deneyler, Ege Üniversitesi'nin ilgili kurulundan alınan izinle, Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ile Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Tablo 2. Kullanılan Cihazlar

Analitik Terazı AS 60/220.R2

Kapasite_{Max}: 220g

Kapasite_{Min}: 1mg

Okunabilirlik(d): 0.01mg

Üretici Firma/Ülke: Radwag, Polonya



Analitik Terazı AS 220 R2

Kapasite_{Max}: 220g

Kapasite_{Min}: 10mg

Okunabilirlik(d): 0.1mg

Üretici Firma/Ülke: Radwag, Polonya



Orion 4 star Plus pH-meter

Aralık / Hassasiyet: 0-14 / 0.1, 0.01, 0.001

Kullanılabilen Oda Sıcaklığı: 5 - 45 °C

Üretici Firma/Ülke: Thermo Fisher
Scientific, ABD



Su Banyosu

Isıtma Banyosu Hacmi: 14L

Max. Isıtma Sıcaklığı: 95 °C

Üretici Firma/Ülke: Memmert/Almanya



Plaka Okuyucu(Varoskan Flash)

Plate Türü: 6-96well

Özellik: Florometri/Fotometri/Lüminometri

Dalga Boyu Aralığı: UV/Vis/NIR

Üretici Firma/Ülke: Thermo Fisher
Scientific, ABD



İzole Organ Banyosu Sistemi(Myograph)

Amplifikatör-Danish Myograph/Danimar

LabChart 7-AD Instruments/Avustralya

Powerlab 4SP transduser-AD Instruments/

Avustralya



Universal 320R Soğutmalı Santrifüj

Çalışma Hızı: 15000 min⁻¹

Max. RFC:21.382

Soğutma: -20°C-40°C

Üretici Firma/Ülke: Hettich/Almanya



Homojenizatör(CryoMill)

Salınım Frekansı: 30Hz

Öğütme Modu: Kriyojenik, Kuru, Islak

Besleme: Azot

Üretici Firma/Ülke: GlenMills/ABD



Tablo 3. Kullanılan Maddeler ve Kimyasallar

Kimyasal Madde	Üretici Firma/Ülke
CORM-2	Santa Cruz/ABD
AOAA	Sigma/ABD
Fenilefrin	Sigma/ABD
Asetilkolin	Sigma/ABD

NaHS	Sigma/ABD
Na ₂ S	Sigma/ABD
Peridoksal-5-Fosfat	ChemPure/Hindistan
NaCl	AppliChem/Almanya
KCl	Sigma/ABD
L-Sistein	Sigma/ABD
DMSO	Carlo Erba/İtalya
K ₂ HPO ₄	Merck/Almanya
KH ₂ PO ₄	Merck/Almanya
Na ₃ VO ₄	Sigma/ABD
NaF	ChemPure/Hindistan
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma/ABD
BCA Kit	iNtRON Biotechnology/Güney Kore
DPD	Sigma/ABD
ZnAc	Santa Cruz/ABD
FeCl ₃	Tekkim/Türkiye
MgSO ₄ -7H ₂ O	Merck/Almanya
CaCl ₂	Merck/Almanya
NaHCO ₃	Sigma/ABD
D-(+)-Glukoz Monohidrat	Merck/Almanya
CrMP	Santa Cruz/ABD
NaOH	Merck/Almanya
Hemin	Sigma/ABD
PMSF	Sigma/ABD

3.2. İzole Organ Banyosu Deney Hazırlığı

İzole organ banyosu deneyi toplam 30 tane fareden izole edilen corpus kavernozum dokularıyla gerçekleştirilmiştir(Şekil 7). Her bir fare korpus kavernozum dokusundan 2 preparat elde edilmiştir.



Şekil 7. Penil Doku İzolasyonu

Yanıtlar geri dönüşümsüz olduğu için her bir preparat ile yürütülen çalışmalar şu şekilde gruplara ayrılmıştır. Birinci ve ikinci deney gruplarında endojen CO üreten HO-1 enzimi inhibitörü ve aktivatörü varlığında 30 dk inkübe edilerek gevşeme yanıtları üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Birinci grup, HO-1 inhibitörü CrMP varlığında ilk H₂S prekürsörü olan L-sistein gevşeme yanıtları alınmıştır ve sonrasında dokular yıkanarak NaHS gevşeme yanıtları alınmıştır. İkinci grup, HO-1 aktivatörü Hemin varlığında ilk L-sistein gevşeme yanıtları sonra da dokular yıkanarak NaHS gevşeme yanıtları alınmıştır. Üçüncü grup ise eksojen verilen CO'nin etkisini araştırmak için dışardan CORM-2 ile 30dk inkübe edilerek ilk L-sistein gevşeme yanıtları alındıktan sonra dokular yıkanarak NaHS gevşeme yanıtları alınmıştır.

3.2.1. Korpus Kavernosumun İzolasyonu

Fareler öldürülmeden önce ketamin/ksilazin ile duyarsızlaştırılmıştır ve ardından, penil dokular dikkatlice izole edilmiştir. Dokular, Krebs solüsyonuyla dolu bir petri

kabına yerleştirilerek oda sıcaklığında çevre dokular, glans penis ve üretra gibi belirli bölgelerden temizlenmiştir(Şekil 8).



Şekil 8. Temizlenen Korpus Kavernozum

Fibröz septum kesilerek korpus kavernozum dokusu ikiye ayrılmıştır ve tunika albuginea temizlenmiştir, korpus kavernozumdan iki ayrı preparat elde edilmiştir.

3.2.2. Krebs Çözeltilisinin Hazırlanması

3.2.2.1. Konsantre 20x Krebs Hazırlanması

Tablo 4'deki maddeler sırasıyla 1,5 L distile suya eklenerek her madde çözündükten sonra hacmi 2L'ye tamamlanmıştır.

Madde	Miktar(gr)
KCl	14
MgSO ₄ -7H ₂ O	11,9
KH ₂ PO ₄	6,4
CaCl ₂	11,14

NaCl	276
------	-----

Tablo 4. Konsantre Krebs Hazırlanmasında Kullanılan Maddeler

3.2.2.2. 1x Krebs Hazırlanması

Konsantre Krebs çözeltisinden 100 mL, 2 litrelik bir cam şişeye konulup, üzerine yaklaşık 1,5 litre distile su eklenmiştir. Tablo 6'daki maddeler teker teker eklenip çözünmeleri sağlandıktan sonra hacim, distile su eklenerek 2 litreye tamamlanmıştır(Tablo 4).

Madde	Miktar(gr)
NaHCO ₃	4,2
D-(+)-Glukoz Monohidrat	4

Tablo 5. Normal Krebs Hazırlamada Kullanılan Maddeler

3.2.3. İzole Organ Banyosu Çözeltilerinin Hazırlanması

Potasyum Klorür(KCl): Her deney öncesi 298 mg KCl tartılıp, 2 ml krebs çözeltisinde çözülerek taze hazırlanmıştır.

Fenilefrin: Stok çözeltisi hazırlamak için, 20.37 mg fenilefrin ependorf tüpe tartılır ve 1 mL dH₂O çözülmüştür. (10⁻¹ M). Sonraki seyreltmeler, stok çözeltisinden alınarak %0.9 NaCl ile yapılmıştır.

Asetilkolin: 18.17 mg ACh ependorf tüpe tartılıp, 1 ml dH₂O'da çözülerek (10⁻¹M) hazırlanmıştır, ileri seyreltmeler %0.9 NaCl çözeltisi ile yapılmıştır.

Trikarbonildiklororutenyum (II) Dimeri: 13mg CORM-2 ependorf tüpe tartılarak 254µl DMSO'da çözülmüştür(10⁻¹ M).

Cr(III) Mezoporfirin IX Klorür: 1mg CrMP tartılıp 154 µl 0.1M, NaOH çözeltisinde çözülerek stok çözeltisi hazırlanmıştır. Sonraki seyreltmeler 0.1M NaOH ile yapılmıştır.

Hemin: konsantre stok çözeltisi için 65mg hemin tartılıp, 1ml 0.1M, NaOH çözeltisinde çözülmüştür. İnkübasyon için sonraki seyreltmeler 0.1M NaOH ile yapılmıştır.

L-Sistein: 121.16 mg L-sistein ependorf tüpe tartılmıştır ve 1ml krebs çözeltisinde 1M olacak şekilde çözülmüştür. İleri seyreltmeler krebs çözeltisi ile yapılmıştır.

Sodyum Hidrosülfür: Ependorf tüpüne 56,06 mg NaHS tartılarak 1ml krebs çözeltisinde 1M olacak şekilde hazırlanmıştır. Seyreltmeler % 0.9 NaCl ile yapılmıştır.

3.3. İzole Organ Banyosu Deneyi

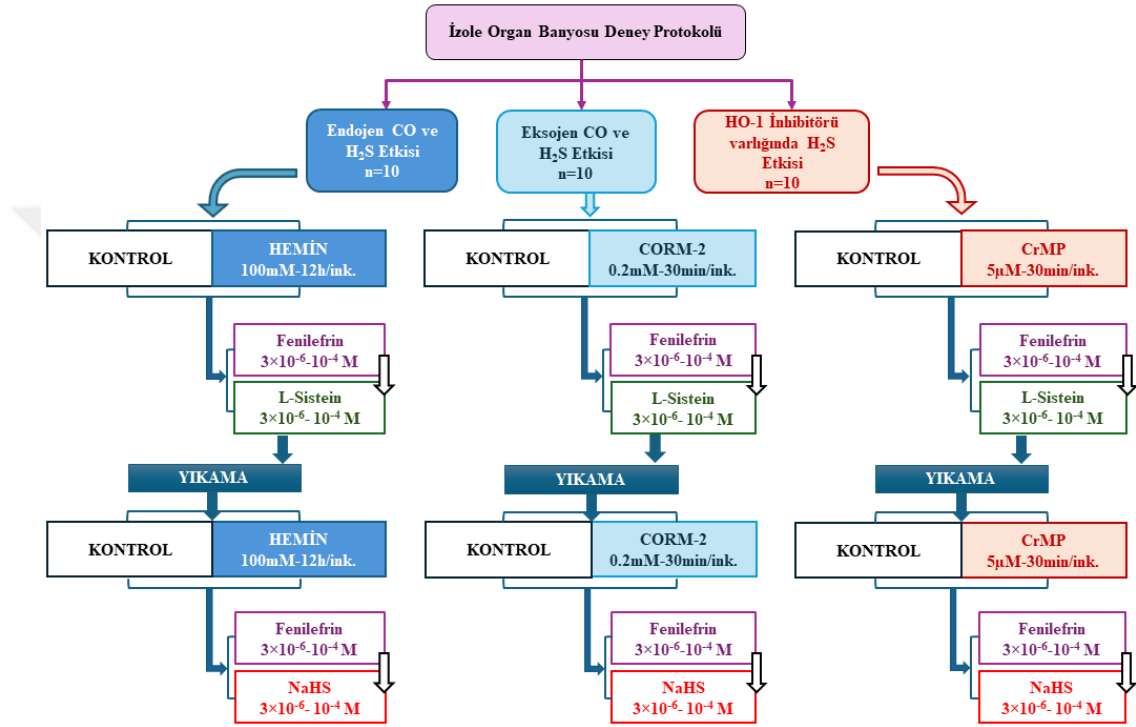
Her deneyde farelerden elde edilen korpus kavernozum dokuları ikiye ayrılarak 4 banyolu Myograph'a yerleştirilmiştir(Şekil 9). Beş mililitrelik organ banyoları, %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımıyla sürekli olarak gazlandırılmış, 37°C sıcaklıkta ve pH'ı 7,4 olan Krebs solüsyonu (mM olarak: NaCl 118; KCl 4,8; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 24; glikoz 11; MgSO₄ 1,2) ile doldurulmuştur. Her banyodaki korpus kavernozum dokusu, 5mV ön gerilime tabi tutulmuş ve banyo içerisindeki Krebs solüsyonu 15 dakikalık aralıklarla değiştirilerek 60 dakika stabilizasyon sağlanmıştır.



Şekil 9. Banyoya Yerleştirilen Korpus Kavernozum Dokusu

Her yanıt arasında 10 dakikalık aralıklarla 30 dakikalık yıkama periyodu uygulanarak dokular agonistlerden arındırılmıştır. Son yıkamada banyo hacmi 5 mL'ye ayarlanmış ve dokunun önceki bazal düzeyine dönmesi için beklenmiştir. İzometrik gerilimdeki değişiklikler PowerLab kayıt sistemi ile bilgisayara aktarılmıştır. Dokuların endotel

durumunu ve canlılığını test etmek amacıyla, önce dokulara 80 mM KCl tek doz uygulanarak kasılma sağlanmıştır. Banyolar 30 dakika boyunca, 10 dakikalık aralıklarla üç kez yıkanmış, ardından dokular bir kez 10^{-7} M Fenilefrin (Fen) ile kasılıp, ardından 10^{-5} M Asetilkolin (ACh) ile gevşetilmiştir. Asetilkoline karşı %40'tan fazla gevşeme yanıtı gösteren dokular endotelli olarak kabul edilmiştir. Daha sonra, izole organ banyosu deneylerinde **Şekil 10**'da belirtilen deney protokolü uygulanmıştır.



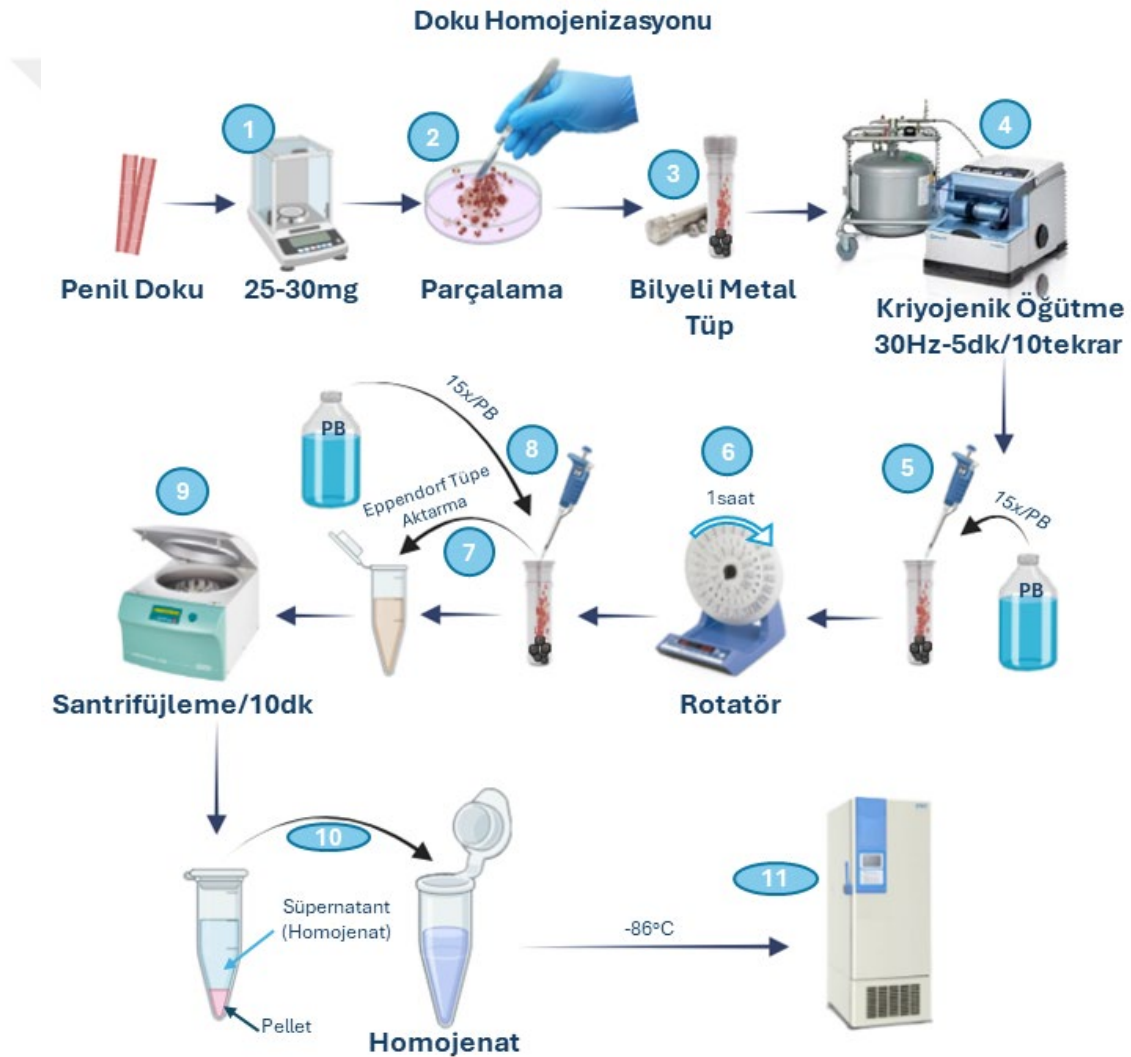
Şekil 10. İzole Organ Banyosu Deney Protokolünün Şeması

- 80 mM KCl karşı ön kasılma yanıtı alınmıştır.
- Dokuların endotelli olup olmadığını belirlemek için (3×10^{-6} - 10^{-5} - 3×10^{-5} - 10^{-4} - 3×10^{-4} M) çeşitli konsantrasyonlarda Fenilefrin ile ön kasılma uygulaması sonrasında, (3×10^{-6} - 10^{-5} M) ACh gevşeme yanıtları alınmıştır.
- Kontrol gruplarında (3×10^{-6} - 10^{-5} - 3×10^{-5} - 10^{-4} - 3×10^{-4} M) fenilefrine karşı (10^{-6} - 3×10^{-6} - 10^{-5} - 3×10^{-5} - 10^{-4} - 3×10^{-4} - 10^{-3} - 3×10^{-3} M) L-sistein yanıtları alındıktan sonra dokular yıkanarak aynı konsantrasyonlarda önce fenilefrin kasılma sonra NaHS (10^{-6} - 3×10^{-6} - 10^{-5} - 3×10^{-5} - 10^{-4} - 3×10^{-4} - 10^{-3} - 3×10^{-3} M) gevşeme yanıtları alınmıştır.

- CORM-2, Hemin, CrMP gruplarında ise 30 dakika inkübasyon sonrası (3×10^{-6} - 10^{-5} - 3×10^{-5} - 10^{-4} - 3×10^{-4} M) fenilefrine karşı (10^{-6} - 3×10^{-6} - 10^{-5} - 3×10^{-5} - 10^{-4} - 3×10^{-4} - 10^{-3} - 3×10^{-3} M) L-sistein yanıtları sonrasında dokular yıkanarak aynı konsantrasyonlarda önce fenilefrin kasılma sonra NaHS gevşeme alınmıştır.

3.4. Penil Doku Homojenizasyonu

Temizlenip izole edilen penil dokuları n=7 olacak şekilde 25-30 mg aralığında tartılıp bistrü ile kıyılarak metal tüplere yerleştirilmiştir.



Şekil 11. Penil Doku Homojenizasyonu

Her bir tüpe 1 adet 5 mm ve 5 adet 3 mm çapında bilye eklenmiştir. Kriyojenik öğütme yapan Retsch marka CryoMill cihazı kullanılarak, 30 Hz'de 5 dakika boyunca 10 tekrar

olacak şekilde program seçilerek homojenizasyon işlemine başlanmıştır. Bu işlemin ardından dokuların iyice toz haline geldiğinden emin olunmuş ve üzerlerine doku ağırlıklarına oranla 15 katı kadar proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren fosfat homojenizasyon tamponu (0.1M K₂HPO₄; 0.14M KH₂PO₄; NaF; NaOV; pH: 7,4) eklenerek, rotatörde 1 saat boyunca +4°C'de döndürülmüştür. 1 saatin sonunda, dokular tekrar cihaza konularak azotsuz ortamda çalkalanmıştır. Bu işlem sonunda dokular yeni seri Eppendorf tüplere aktarılmıştır. Homojenat kaybını önlemek için, tüpün dibinde kalan bilyeler 15 kat daha fosfat tamponu ile iyice çalkalanarak yeni Eppendorf tüplerdeki homojenatların üzerine eklenmiştir. Sonrasında, 4°C'de 10 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda, tüpün üzerindeki süpernatant (homojenat) alınarak protein tayini yapılmak üzere -86°C'de saklanmıştır. Gerçekleştirilen doku homojenizasyonu, **Şekil 11**'de sırasıyla gösterilmiştir.

3.5. Biçinkoninik Asit Yöntemi (BCA)

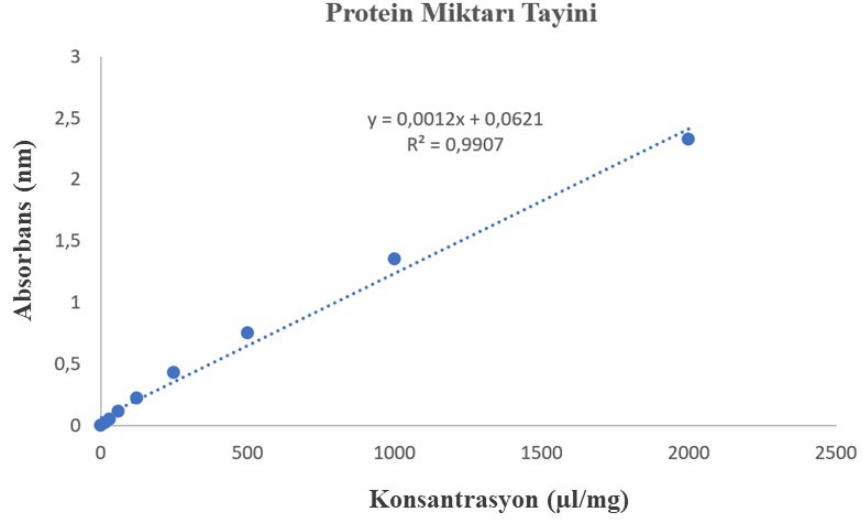
BCA analiz metodu, bazik koşullarda proteinlerin Cu⁺²'den, Cu⁺¹'e indirgeyerek bisinkoninik asit ile mor renk oluşumuna dayanır. Ölçümler, 562 nm'de spektrofotometrik olarak yapılır.

3.5.1. Protein Miktarının Tayini

Dokulardan elde edilen homojenatların protein miktarlarının tayini için SMART™ BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology) kullanılmıştır.

- BSA (Bovine Serum Album.) çeşitli konsantrasyon seviyelerinde (250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 0 µg/ml) standartı referans olarak kullanılmıştır.
- 96-kuyucuklu plakaya her bir standart kuyucuk başına 50 µl eklenmiştir.
- 1/10 oranında seyreltilmiş fare penil homojenat örneklerinden 50 µl, kuyucuklara eklenmiştir.
- Homojenatın üzerine 100 µl 'Working Solution (50:1/A)' eklendikten sonra, 37°C'de 30 dakika süreyle su banyosunda inkübe edilmiştir.

- 562 nm dalga boyunda absorbans mikropilaka okuyucuda okutulmuştur.
- Standartlarla(BSA) elde edilen grafikteki doğrusal denklem üzerinden protein miktarı hesaplanmıştır(Şekil 12).



Şekil 12. Protein Tayini Standart Eğri

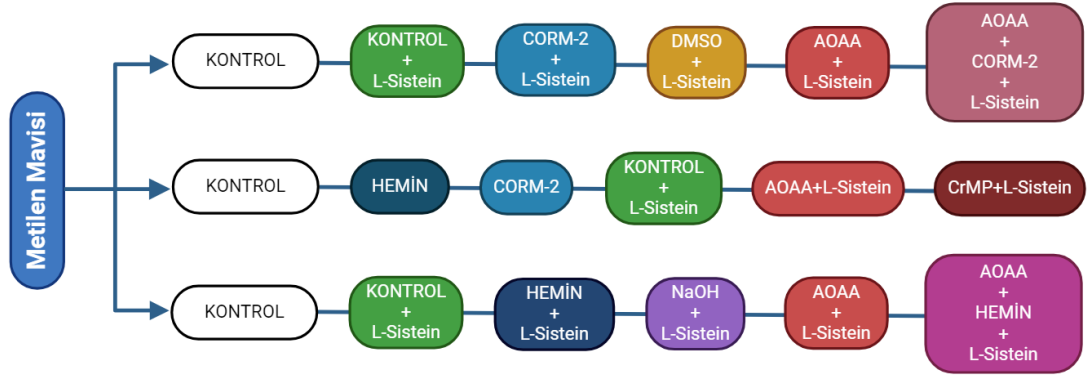
3.6. Metilen Mavisi Deneyi

Metilen mavisi 1883 yılında Fischer tarafından tanıtılmış olup H_2S 'in uçucu ve oksitlenebilen bir gaz olması sebebiyle, numune hazırlığı genellikle Zn^{2+} kullanılarak stabilize edilmesine ve H_2S , N,N-dimetil-p-fenilendiamin (N,N-DPD) ile bir oksidasyon ajanının $FeCl_3$ varlığında reaksiyona girerek 650 nm'de güçlü bir şekilde absorbe eden metilen mavisi üretmesine dayalı spektrofotometrik yöntemdir. Absorbans, sülfür konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir(Quan & Lee, 2021).

3.6.1. Deney Grupları

Metilen mavisi deneyinde hemoksijenaz aktivatörü, hemoksijenaz inhibitörü CrMP ve eksojen CO donörü CORM-2 ile inkübasyonun endojen H_2S

üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, antagonist ve agonistlerin basal formları da ilaveten eklenmiştir. Bu deney, 3 seri ve her bir seride 6 grup olacak şekilde tasarlanmıştır(Şekil 13).



Şekil 13. Metilen Mavisi Deney Grupları

3.6.2. Metilen Mavisi Deney Çözeltilerinin Hazırlanması

Fosfat Buffer Hazırlama(PB): 0.1M Fosfat buffer(PB) hazırlamak için hassas terazide 3.48g K_2HPO_4 tartılıp 200ml ultra saf suda(ddH₂O) çözülmüştür. Daha sonra, 2.72g KH_2PO_4 tartılıp 200ml ultra saf suda çözülerek 0.1M'lık KH_2PO_4 çözeltisi hazırlanmıştır. Son olarak, K_2HPO_4 çözeltisinin pH'ı, KH_2PO_4 çözeltisi ile Thermo Orion 5 pH-metre yardımıyla pH=7.4'e ayarlanmıştır.

Piridoksal-5-fosfat(PP): 2,471 mg PP tartılıp, 1ml PB'de çözülmüştür (2mM).

Aminoksi Asetik Asit: 90,72 mg AOAA tartılıp, 1ml PB'de çözülmüştür (10mM).

L-Sistein: 121,16 mg L-sistein tartılıp, 1ml PB'de çözülmüştür (10^{-2} M).

CORM-2: 512,02mg CORM-2 tartılıp, 1ml PB'de çözülmüştür (2×10^{-4} M).

Hemin: 6,5mg Hemin tartılıp, 1ml 0.1M NaOH'de çözülmüştür (10^{-2} M).

CrMP: 1mg CrMP tartılıp, 154µl 0.1M NaOH'de çözülmüştür(10^{-2} M). Sonra hazırlanmış olan 10^{-2} M CrMP'den 5µl alınıp, 95µl NaOH ile seyreltilmiştir (5×10^{-6} M).

3.6.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Farklı konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlamak için hassas terazide 12,09 mg sodyum sülfür (Na_2S) tartıldıktan sonra 200µl fosfat bufferda çözülmüştür. Final konsantrasyonları 250; 25; 2.5; 0.25mM olacak şekilde 1:10 oranında fosfat buffer ile seyreltme yapılmıştır(**Tablo 6**).

Tüp No.	PB Miktarı (µl)	Seyretlme Miktarı(µl)	Final Konsantrasyon (mM)
1	0	200	250
2	900	100	25
3	900	100	2.5
4	900	100	0.25

Tablo 6. 1.Seri Standart Seyreltmeler

Metilen mavisi deney sonrasında analizlerde kullanılmak üzere standart eğriyi oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda (250; 125; 62.5; 31.25; 15.6; 7.8; 3.9; 0(PB)) 2. Seri seyreltmeler yapılmıştır(**Tablo 7**).

Tüp No.	PB Miktarı (µl)	Seyretlme Miktarı(µl)	Final Konsantrasyon (µM)
1	0	500	250
2	500	500	125
3	500	500	62.5
4	500	500	31.25
5	500	500	15.6
6	500	500	7.8
7	500	500	3.9
8	500	-	Kör Çözelti

Tablo 7. 2.Seri Standart Seyreltmeler

3.6.4. %10 TCA, %1 ZnAC, DPD ve FeCl₃ Hazırlanması

%10 Trikloroasetik asit (TCA): Hassas terazide 10 g tartılıp, 100 ml ddH₂O'da çözülmüştür.

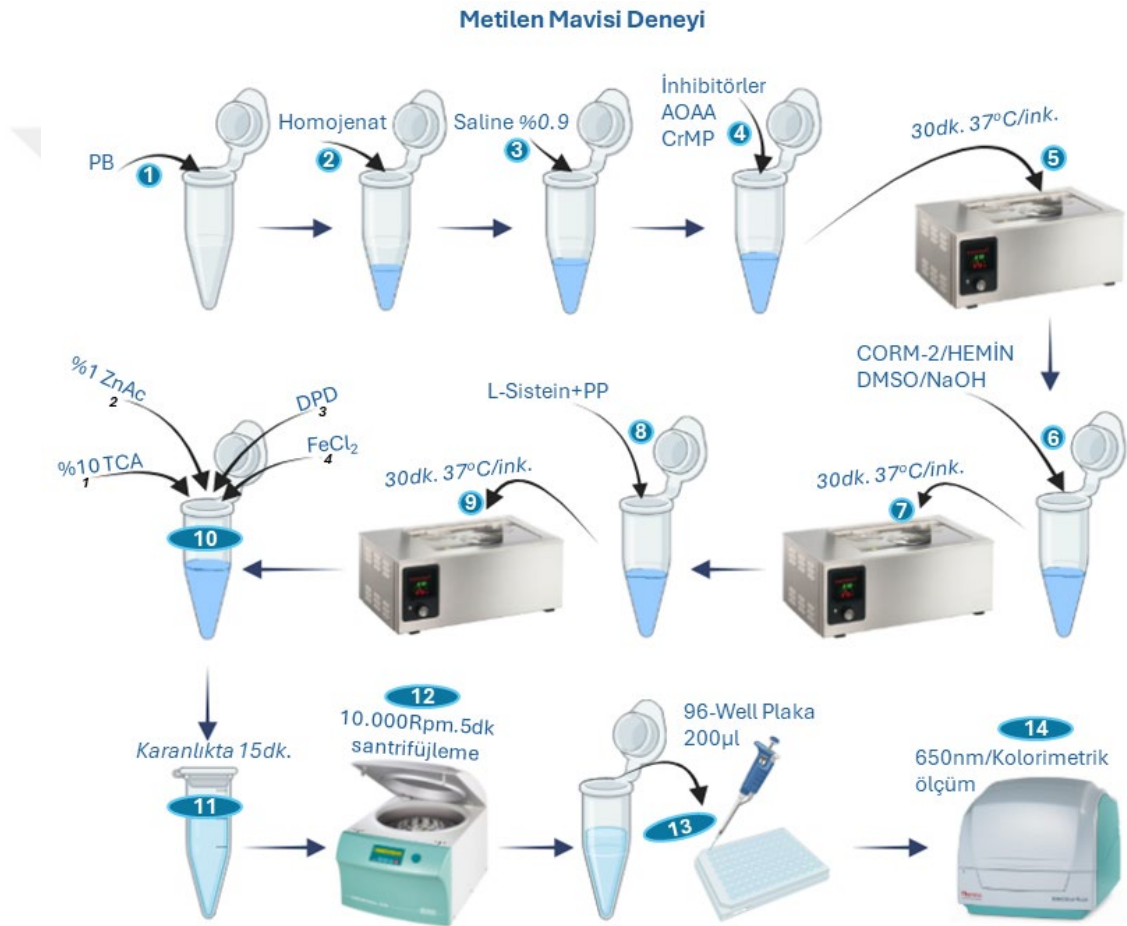
%1 ZnAC: Hassas terazide 1 g tartılıp, 100 ml ddH₂O'da çözülmüştür.

DPD (20mM): Hassas terazide 23.4 mg tartılıp, 5 ml 7.2 M HCl ile çözülmüştür.

FeCl₃ (30mM): Hassas terazide 24,3 mg tartılıp, 5 ml 1.2 M HCl ile çözülmüştür.

3.6.5. Metilen Mavisi Deney Protokölü

Öncelikle -86°C’de saklanan penil doku homejenatları buzun üstünde oda sıcaklığında çözülmüştür. Eppendorf tüplere sırasıyla fosfat buffer(PB), %0.9luk NaCl(saline) çözeltisi konulduktan sonra üzerine gerekli miktarda homejenatlar eklenmiştir.



Şekil 14. Metilen Mavisi Deney Şeması

Deney serilerinin bazı gruplarında inhibitörler(AOAA ve CrMP) kullanılacağı için önce inhibitör varlığında 37°C’de 30 dakika su banyosunda inkübasyona tabi tutulmuştur. İnhibitör kullanımını gerektirmeyen diğer gruplarda ise bu işlem yapılmadan direk uyarıcı (CORM-2, Hemin, DMSO, NaOH) ajanların inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sırası deney serilerindeki antagonist ve agonistlere

bağlı olarak ilk önce inhibisyon etkisi görmek için inhibitörler, sonra aktivatörler ve son olarak L-sistein, piridoksal-5-fosfat olacak şekilde belirlenmiştir(**Şekil 14**). 37°C’de 30 dakika inkübasyon sonrası bütün standartlara ve diğer deney gruplarına metilen mavisi deneyinde kullanılan ana çözeltiler sırasıyla(250µl %1 ZnAC; 250 µl %10 TCA; 133µl DPD; 133µl FeCl₃) eklenerek karanlıkta 15 dakika bekletilmiştir. 4 °C sıcaklıkta, 10.000 rpm’de 5dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra 96-well plakaya eppendorf tüplerdeki standart çözeltilerden ve deney gruplardan kuyucuk başına 200µl olacak şekilde pipetle aktarılmıştır. Thermo Varioskan Flash plaka okuyucu yardımıyla 650nm’de kolorimetrik ölçüm alınmıştır. Son olarak her bir örnek için H₂S konsantrasyonları hesaplanarak elde edilen verilerle Graphpad Prism’de analizleri yapılmıştır.

3.7. İstatistiksel Veri Analizi

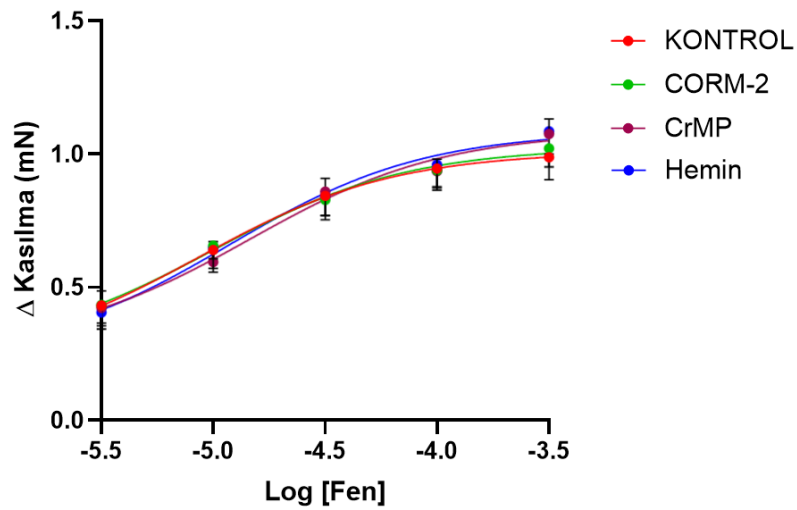
Deney sonrası verilerin analizlerini gerçekleştirmek, doz cevap eğrilerinin oluşturulması ve grafik çizimi için Graphpad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) istatistik programı kullanılmıştır. Tüm veriler ortalama ve ortalamanın $\pm$ standart hatası ($O \pm O.S.H$) şeklinde verilmiştir. İzole organ banyosu deneylerinde gevşeme cevapları ön kastırıcı ajana karşı alınan maksimum kasılma cevabının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Deneyde gerçekleştirilen kasılma ve gevşeme anıtlarının sayısal değerlendirilmesi için LabChart 7.0’dan (LabChart Software, San Diego, CA, ABD) yararlanılmıştır. İzole organ banyosu analizlerinde maksimum gevşemenin veya kasılmanın yarısını oluşturan konsantrasyonun negatif logaritması ($-\log EC_{50}$ veya pD_2) değerinin hesaplanması iteratif nonlineer regresyonla yapılmıştır. Tüm istatistiksel karşılaştırmalar için “One/Two way” varyans analizi (ANOVA) ve Bonferroni çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

4. Bulgular

4.1. İzole Organ Banyosu Deneyi

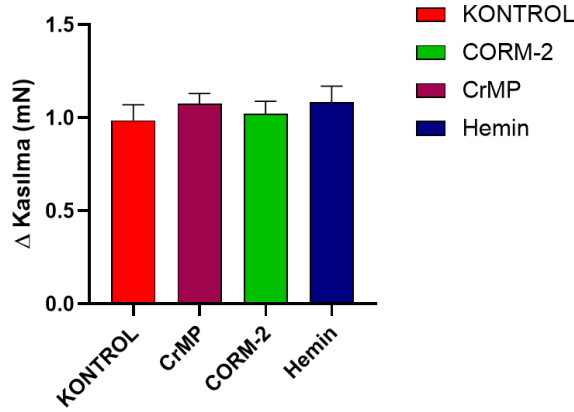
4.1.1. CORM-2, CrMP ve Hemin'in Fenilefrin Kasılma Yanıtları Üzerine Etkileri

Fare penil dokularıyla çalışılan organ banyosu deneylerinde alınan fenilefrin kümülatif (3×10^{-6} - 10^{-5} - 3×10^{-5} - 10^{-4} - 3×10^{-4} M), kontrol (n=6, $E_{maks} = 98.67 \pm 8.401$, $pD_2 = 5.178 \pm 0.1423$), CORM-2 (n=4, $E_{maks} = 102 \pm 6.928$, $pD_2 = 5.178 \pm 0.1423$), CrMP (n=6, $E_{maks} = 107.5 \pm 5.608$, $pD_2 = 5.063 \pm 0.3284$) ve Hemin (n=8, $E_{maks} = 108.5 \pm 8.544$, $pD_2 = 4.934 \pm 0.1962$) varlığında kasılma yanıtlarında istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir (Şekil 15, Şekil 16 ve Şekil 17).



Şekil 15. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnkübasyon Sonrası Kümülatif Fenilefrin Kasılma Yanıtları

$p > 0.05$, kontrol, n=6; CORM-2, n=4; CrMP, n=6; Hemin, n=8; Two way ANOVA-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler ortalama $\pm$ O.S.H olarak verilmiştir.

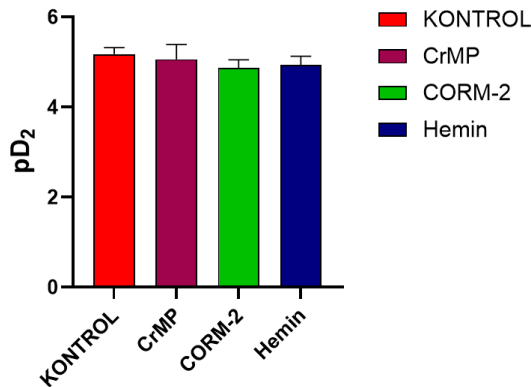


Şekil 16. Fare Penil Dokusunda CORM-2 CrMP ve Hemin İnkübasyon Sonrası Kümülatif Fenilefrin Kasılma Yanıtları (E_{max})

Kontrol, CORM-2, CrMP ve Hemin fenilefrin kasılma yanıtları arasında, tüm guruplarda istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. ($p > 0.05$, kontrol, $n=6$; CORM-2, $n=4$; CrMP, $n=6$; Hemin, $n=8$; Two way ANOVA-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler ortalama $\pm$ O.S.H olarak verilmiştir(Tablo 8).

Grup	% E_{max}
Kontrol	98.67 $\pm$ 8.401
CORM-2	102 $\pm$ 6.928
CrMP	107.5 $\pm$ 5.608
Hemin	108.5 $\pm$ 8.544

Tablo 8. Fare Penil Dokusunda CORM-2 CrMP ve Hemin İnkübasyonu Sonrası Kümülatif Fenilefrin Kasılma Yanıtları (E_{max})



Şekil 17. Fare Penil Dokusunda CORM-2 CrMP ve Hemin İnkübasyon Sonrası Kümülatif Fenilefrin Kasılma pD₂ Değerleri

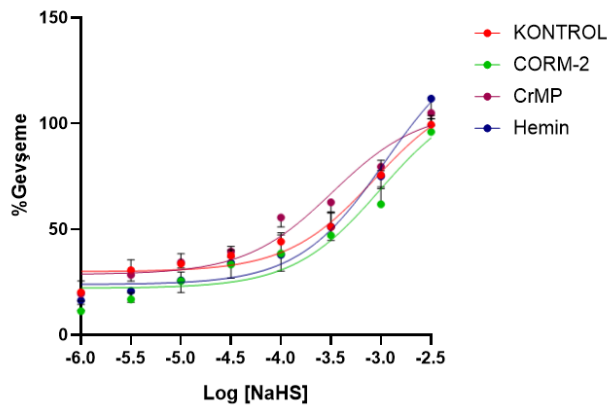
Kontrol, CORM-2, CrMP ve Hemin fenilefrin kasılma yanıtlarının pD_2 değerlerinde, tüm gruplarda her hangi bir istatistiksel anlamlılık görülmemiştir. ($p>0.05$, kontrol, $n=6$; CORM-2, $n=4$; CrMP, $n=6$; Hemin, $n=8$; Two way ANOVA-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler ortalama $\pm$ O.S.H olarak verilmiştir(**Tablo 9**).

Grup	pD_2
Kontrol	5.178 ± 0.1423
CORM-2	4.870 ± 0.1820
CrMP	5.063 ± 0.3284
Hemin	4.934 ± 0.1962

Tablo 9. Fare Penil Dokusunda CORM-2 CrMP ve Hemin İnkübasyonu Sonrası Kümülatif Fenilefrin Kasılma pD_2 Değerleri

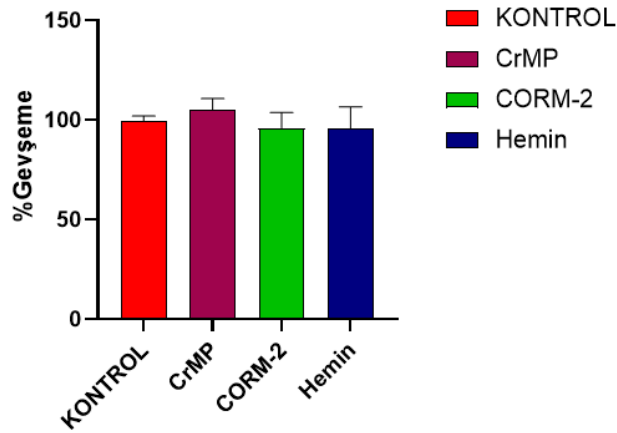
4.1.2. CORM-2, CrMP ve Hemin'in Fenilefrin Kasılma Sonrası NaHS Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkisi

Kümülatif fenilefrin ile ön kastırma sonrası (3×10^{-6} - 10^{-5} - 3×10^{-5} - 10^{-4} - 3×10^{-4} M), kontrol ($n=7$, $E_{maks} = 99,45 \pm 2,653$, $pD_2 = 2,851 \pm 0,2509$), CORM-2 ($n=6$, $E_{maks} = 96,03 \pm 7,735$, $pD_2 = 3,003 \pm 0,3436$), CrMP ($n=4$, $E_{maks} = 104,9 \pm 5,847$, $pD_2 = 3,495 \pm 0,1720$) ve Hemin ($n=8$, $E_{maks} = 95,97 \pm 10,55$, $pD_2 = 3,115 \pm 0,2486$) NaHS varlığında gevşeme yanıtlarında istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır(**Şekil 18**, **Şekil 19** ve **Şekil 20**).



Şekil 18. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası NaHS Gevşeme Yanıtları

$p>0.05$, kontrol, $n=7$; CORM-2, $n=6$; CrMP, $n=4$; Hemin, $n=8$; Two way ANOVA-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler ortalama $\pm$ O.S.H olarak verilmiştir.

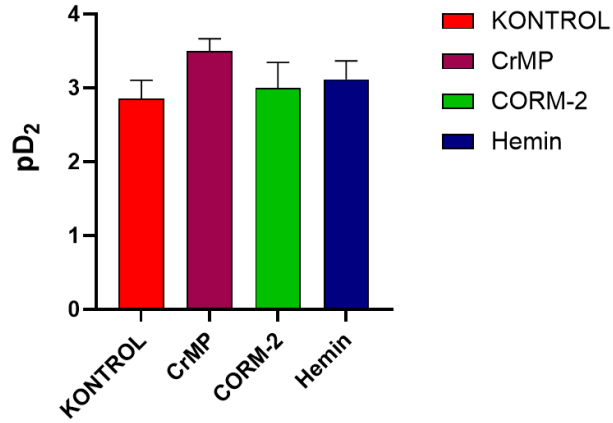


Şekil 19. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası NaHS Gevşeme Yanıtları (E_{max})

Maksimum Kontrol, CORM-2, CrMP ve Hemin ink. Fenilefrin ön kastırma sonrası NaHS yanıtlarında, tüm gruplarda istatistiksel bir fark görülmemiştir. ($p>0.05$, kontrol, $n=7$; CORM-2, $n=6$; CrMP, $n=4$; Hemin, $n=8$; Two way ANOVA-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler ortalama $\pm$ O.S.H olarak verilmiştir(Tablo 10).

Grup	% E_{max}
Kontrol	99,45 $\pm$ 2,653
CORM-2	96,03 $\pm$ 7,735
CrMP	104,9 $\pm$ 5,847
Hemin	95,97 $\pm$ 10,55

Tablo 10. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası NaHS Gevşeme Yanıtları (E_{max})



Şekil 20. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası NaHS Gevşeme pD₂ Değerleri

Kontrol, CORM-2, CrMP ve Hemin ink. fenilefrin ön kastırma sonrası NaHS pD₂ değerlerinde, tüm guruplarda istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. ($p > 0.05$, kontrol, $n=7$; CORM-2, $n=6$; CrMP, $n=4$; Hemin, $n=8$; Two way ANOVA-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler ortalama $\pm$ O.S.H olarak verilmiştir(**Tablo 11**).

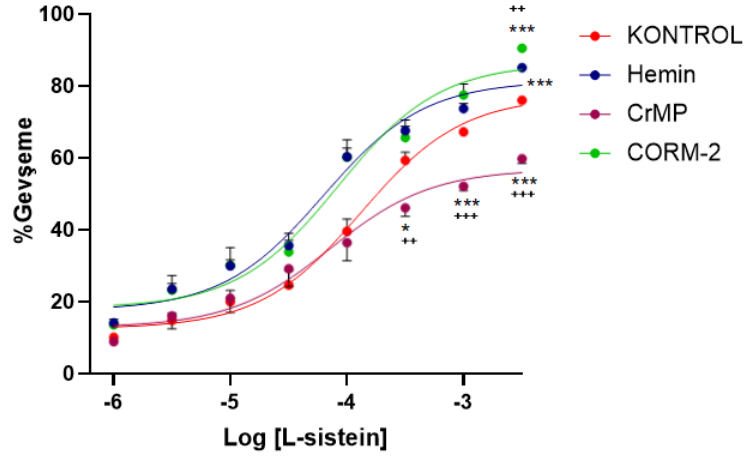
Grup	pD ₂
Kontrol	2,851 ± 0,2509
CORM-2	3,003 ± 0,3436
CrMP	3,495 ± 0,1720
Hemin	3,115 ± 0,2486

Tablo 11. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası NaHS Gevşeme pD₂ Değerleri

4.1.3. CORM-2, CrMP ve Hemin'in Fenilefrin Kasılma Sonrası L-Sistein Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkisi

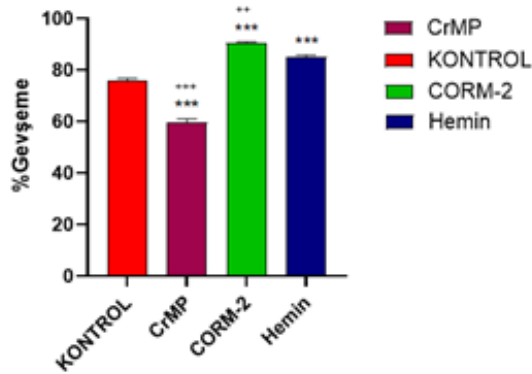
L-sistein (10^{-6} - 3×10^{-6} - 10^{-5} - 3×10^{-5} - 10^{-4} - 3×10^{-4} - 10^{-3} - 3×10^{-3} M) ile fenilefrin ön kastırma sonrası (3×10^{-6} - 10^{-5} - 3×10^{-5} - 10^{-4} - 3×10^{-4} M), kontrol ($n=4$, $E_{maks} = 76,33 \pm 0,9323$, $pD_2 = 3,842 \pm 0,0838$), CORM-2 ($n=4$, $E_{maks} = 90,56 \pm 0,3987$, $pD_2 = 4,075 \pm 0,1368$),

CrMP ($n=4$, $E_{maks}= 60,08 \pm 1,398$, $pD_2= 4,295 \pm 0,1914$) ve Hemin ($n=4$, $E_{maks}= 85,17 \pm 0,7217$, $pD_2= 4,203 \pm 0,0568$) varlığında kontrol grubuna kıyasla L-Sistein gevşeme yanıtlarında istatistiksel anlamlılık bulunmuştur(Şekil 21, Şekil 22). Fakat CORM-2 CrMP ve Hemin ink. sonrası L-Sistein gevşemesine ilişkin pD_2 değerlerinde istatistiksel anlamlılık görülmemiştir (Şekil 23).



Şekil 21. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-Sistein Gevşeme Yanıtları

CORM-2 ve Hemin inkübasyonu sonrasında L-Sistein gevşeme yanıtları kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($^{***}p < 0.001$, $3 \times 10^{-3}M$). Hemin grubuna kıyasla CORM-2 istatistiksel olarak anlamlı artma görülmüştür ($^{++}p=0.01$, $3 \times 10^{-3}M$). CrMP grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür($^{+++}p < 0.001$, $3 \times 10^{-3}M$), ($^{+++}p < 0.001$, $10^{-3}M$), ($^{++}p=0.05$, $3 \times 10^{-4}M$). (Two way ANOVA-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler ortalama $\pm$ O.S.H olarak verilmiştir.

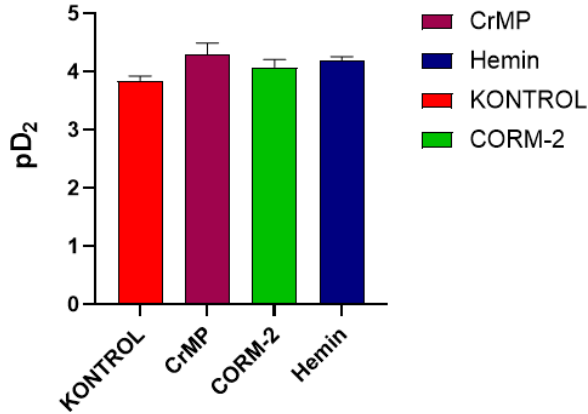


Şekil 22. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-Sistein Gevşeme Yanıtları (E_{max})

CORM-2 ve Hemin gruplarında fenilefrin ön kastırma sonrası L-Sistein gevşeme yanıtlarında, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. (^{***}p <0.001, CORM-2, n=4; Hemin, n=4). CORM-2 grubu, Hemin grubuna kıyasla anlamlı artmıştır(⁺⁺p=0.01). CrMP grubu ise hem kontrol hem de Hemin grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır(^{***}p <0.001, ⁺⁺⁺p <0.001, CrMP, n=4); Two way ANOVA-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler ortalama $\pm$ O.S.H olarak verilmiştir(**Tablo 12**).

Grup	%E _{max}
Kontrol	76,33 $\pm$ 0,9323
CORM-2	90,56 $\pm$ 0,3987 ^{*** ++}
CrMP	60,08 $\pm$ 1,398 ^{*** +++}
Hemin	85,17 $\pm$ 0,7217 ^{***}

Tablo 12. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-Sistein Gevşeme Yanıtları (E_{max})



Şekil 23. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-Sistein Gevşeme pD₂ Değerleri

Kontrol, CORM-2, CrMP ve Hemin ink. Fenilefrin ön kastırma sonrası L-Sistein gevşeme yanıtlarında, tüm guruplarda istatistiksel bir fark görülmemiştir. (p>0.05, kontrol, n=4; CORM-2, n=4; CrMP, n=4; Hemin, n=4; Two way ANOVA-

Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler ortalama $\pm$ O.S.H olarak verilmiştir(Tablo 13).

Grup	pD ₂
Kontrol	3,842 $\pm$ 0,0838
CORM-2	4,075 $\pm$ 0,1368
CrMP	4,295 $\pm$ 0,1914
Hemin	4,203 $\pm$ 0,0568

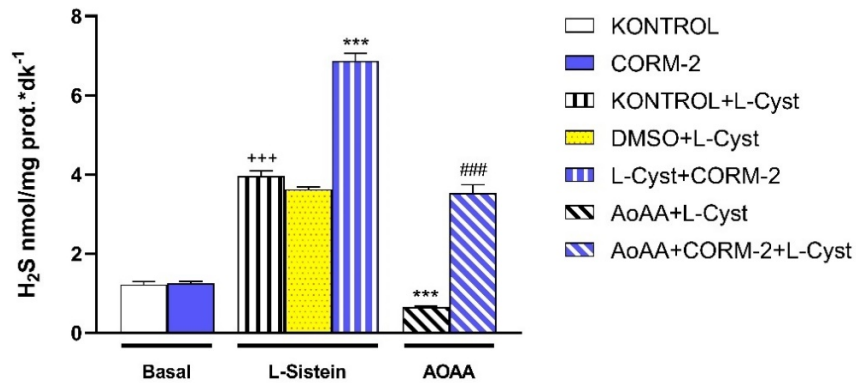
Tablo 13. Fare Penil Dokusunda CORM-2, CrMP ve Hemin İnk. Kümülatif Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-Sistein pD₂ Değerleri

4.2. Metilen Mavisi Deneyi

Penil dokulardan elde edilen homejenatlar ile sürdürülen metilen mavisi deneylerinde CORM-2, Hemin(HO-1 aktivatörü) ve CrMP'nin (HO-1 inhibitörü) H₂S prekürsörü olan L-sistein üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ O.S.H olarak verilmiştir.

4.2.1. Eksojen CO Donörü CORM-2'nin H₂S Düzeylerine Etkisi

Bazal düzeyde Kontrol grubuna kıyasla CORM-2 grubu arasında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. L-Sistein grubuna bakıldığında ise CORM-2'nin H₂S düzeyini istatistiksel olarak arttırmıştır(**p < 0.001). Buna karşın, L-Sistein varlığında ve H₂S inhibitörü AOAA ile gerçekleştirilen deney grubuna bakıldığında CORM-2'nin H₂S üzerindeki etkisinin azaldığı görülmüştür(###p < 0.001)(Şekil 24).



Şekil 24. Eksojen CO Donörü CORM-2'nin H₂S Düzeyleri Üzerine Etkisi

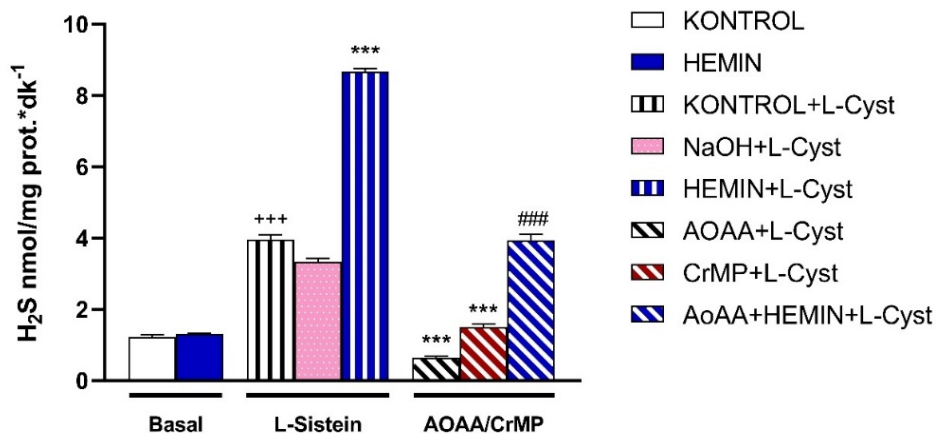
Kontrol ile kıyaslama(⁺⁺⁺p <0.001); Kontrol+L-Sistein ile kıyaslama(^{***}p <0.001); L-Sistein+CORM-2 ile kıyaslama(^{###}p <0.001); One way ANOVA-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi(**Tablo 14**).

Grup	H ₂ S
Kontrol (n=10)	1,218 ± 0,0735
CORM-2 (n=4)	1,250 ± 0,0509
Kontrol+L-Sistein (n=10)	3,960 ± 0,1287 ⁺⁺⁺
DMSO+L-Sistein (n=4)	3,626 ± 0,0565
CORM-2+L-Sistein (n=8)	6,868 ± 0,1957 ^{***}
AOAA+L-Sistein (n=4)	0,651 ± 0,0268 ^{***}
AOAA+CORM-2+L-Sistein (n=8)	3,526 ± 0,2187 ^{###}

Tablo 14. Kontrol, CORM-2, L-Sistein ve AOAA Grubu H₂S Düzeyleri

4.2.2. Endojen CO'in H₂S Düzeylerine Etkisi

HO-1 enzim aktivatörü Hemin varlığında Kontrol grubuna kıyasla bazal düzeyde istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. L-Sistein grubunda ise Hemin H₂S düzeyini anlamlı bir şekilde istatistiksel olarak arttırmıştır (^{***}p <0,001). Buna karşın, L-Sistein ve H₂S inhibitörü AOAA ile birlikte yapılan deneylerde, Hemin'in H₂S üzerindeki etkisi azalmıştır(^{###}p <0.001). Ayrıca, HO-1 inhibitörü CrMP ile L-Sistein varlığında Kontrol L-Sistein grubuna kıyasla anlamlı azalma görülmüştür(^{***}p <0.001)(**Şekil 25**).



Şekil 25. Endojen CO'in H₂S Düzeyleri Üzerine Etkisi

Kontrol ile kıyaslama(⁺⁺⁺p <0.001); Kontrol+L-Sistein ile kıyaslama(^{***}p <0.001); L-Sistein+Hemin ile kıyaslama(^{###}p <0.001); One way ANOVA-Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi(**Tablo 15**).

Grup	H₂S
Kontrol (n=10)	1,218 ± 0,0735
Hemin (n=7)	1,297 ± 0,0373
Kontrol+L-Sistein (n=10)	3,960 ± 0,1287 ⁺⁺⁺
NaOH+L-Sistein (n=4)	3,333 ± 0,091
Hemin+L-Sistein (n=6)	8,666 ± 0,0930 ^{***}
AOAA+L-Sistein (n=4)	0,651 ± 0,0268 ^{***}
CrMP+L-Sistein (n=6)	1,506 ± 0,0736 ^{***}
AOAA+Hemin+L-Sistein (n=6)	3,923 ± 0,1780 ^{###}

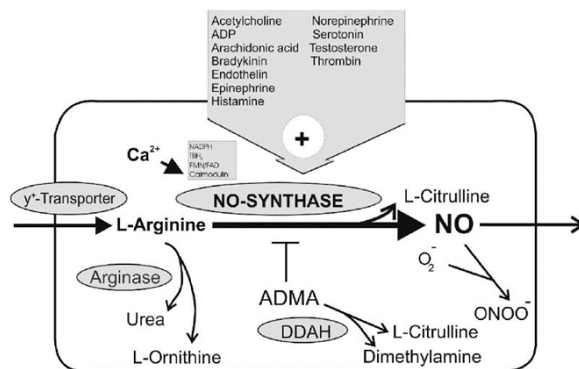
Tablo 15. Kontrol, Hemin, L-Sistein ve AOAA Grubu H₂S Düzeyleri

Tartışma

Kardiyovasküler hastalıklar alanında yapılan son araştırmalar, gazotransmitterlerin yaşamsal fonksiyonlarda önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Bu araştırmalar, nitrik oksit (NO), hidrojen sülfür (H₂S) ve karbon monoksitin (CO) çeşitli görevler üstlendiğini göstermektedir. Bu 3 gazotransmitterin etkileri yıllarca korunmuş birbiriyle ilişkili enzimler tarafından düzenlenmektedir. Bu enzimlerden, indüklenebilir hemoksijenaz (HO) olan HO-1 ve yapısal formu olan HO-2; her ikisi de Hemin'in Biliverdine dönüşümünü katalizler ve reaksiyon sırasında Fe⁺² ve CO açığa çıkmaktadır. Biliverdin daha sonra hızla biliverdin redüktazla bilirübine dönüşür, demir ferritin tarafından uzaklaştırılır. Açığa çıkan CO ise yüksek difüzyon özelliğine sahiptir ve demir içeren hedeflere afinite göstererek onun hücresel hemoproteine veya dolaşımında hemoglobine bağlanmasını kolaylaştırır. Bütün membranlardan geçebilir ve sonuçta akciğerlerden nefesle atılır. COHb (karboksihemoglobin) içerikleri nedeniyle sGC'a, NOS'a bağlanarak onlarda konformasyon değişikliği yaratır ve onları aktive ederek cGMP ve NO'ı artırır. Böylece damar düz kasında gevşemeye neden olur.

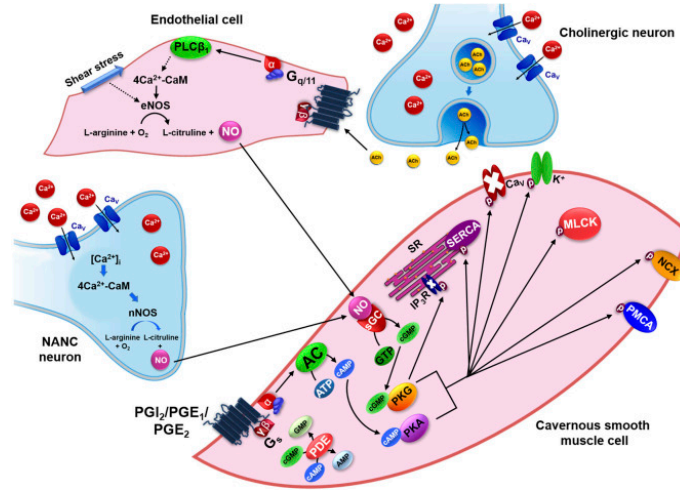
Penisin Fizyolojik Kontrolünde NO Rolü

Penil fizyolojisinde ereksiyon, psikolojik ve hormonal etmenler tarafından düzenlenen bir nörovasküler fenomen olarak tanımlanır. Bu süreç, merkezi sinir sistemi ile yerel uyarıcılar arasında karmaşık bir etkileşimi içerir. Temel olarak, spinal refleksler ve hipotalamusun bilgi işlemesi yoluyla, dokunma, görme, koku alma, işitme gibi duyuşal uyarıcılarla entegre bir şekilde gerçekleşir.



Şekil 26. NO ve Sentezinde Görevli Enzimler(Maas, Schwedhelm, Albsmeier, & Boger, 2002)

Periferik ereksiyon kontrolü ise kavernoöz düz kasların kasılması veya gevşemesini etkileyen nöronal ve lokal faktörlere bağlıdır. Bu süreçte, kas tonusu oluşturularak penisin fonksiyonel durumu korunur(Andersson, 2011; de Souza ve diğerleri., 2022; Thomas, 2002). Nitrik oksit/siklik guanozin monofosfat (NO/cGMP) yolunun, korpus kavernozum düz kasının gevşemesini sağlayan geleneksel bir mekanizma olarak tanımlandığı belirtilmiştir(Şekil 26)(Burnett, 2004). Kavernoöz sinir aktivasyonu, corpus cavernosum'daki sinir uçlarından NO'nun salınımını başlatır. Ayrıca, NO, endotelde mekanik stres yanıtı olarak salınır. NO, corpus cavernosum sinir uçlarında nöral nitrik oksit sentazı (nNOS) ve endotelyumda endotel nitrik oksit sentazı (eNOS) tarafından sentezlenir; bu süreçte L-arginin ve oksijen kullanılır(Albersen, Mwamukonda, Shindel, & Lue, 2011). Sonrasında, NO çözünür guanilat siklazı (GC) aktive eder ve düz kas hücrelerinde cGMP seviyelerini artırır. İkinci haberci olarak, cGMP, hücre içi kalsiyumun azalmasına ve ardından düz kas hücrelerinin gevşemesine neden olan bir dizi tepkiyi başlatır (Şekil 27)(Albersen, Fandel, ve diğerleri., 2011). Özellikle, hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki $[Ca^{2+}]$ artış, kasılmanın ana nedenidir, bu nedenle bu iyonun hücre içi seviyelerinin düzenlenmesi ve kontraksiyon mekanizmasının duyarlılığı, düz kas hücrelerinin düzenlenmesinde anahtar noktalardır(Maggi, Filippi, Ledda, Magini, & Forti, 2000).



Şekil 27. Kavernoöz Düz Kasta NO ve Ca^{2+} Bağımlı Gevşeme(de Souza ve diğerleri., 2022)

Damar tonusunun fizyolojik ve patolojik durumlarda düzenlenmesinde NO esansiyel olmakla birlikte, oksidatif stresin arttığı vasküler disfonksiyon, kardiyovasküler

hastalıklar ve enflamatuvar hastalıklar gibi durumlarda HO-1 kaynaklı CO'nin etkileri önemli hale gelmektedir. CO ve H₂S'in çeşitli doku ve patolojik durumlarda NO ile olan ilişkileri çeşitli çalışmalarla ortaya konmasına karşın CO ve H₂S'in birbiriyle olan ilişkisi yeterince aydınlatılmamıştır(Rochette, Cottin, Zeller, & Vergely, 2013). Hücre ve dokularda hem oksijenazın katalizlediği hem degradasyonu sırasında eliminasyon ürünü olarak önemli miktarlarda CO üretilmektedir. Hem proteini hemoglobin, myoglobin gibi oksijen transport proteinlerinde ve solunum, enflamasyon ve ilaç metabolizması gibi kritik hücresel süreçlerle ilişkili enzimlerde yaşamsal bir kofaktör olarak görev yapar. Aynı zamanda CO'nin fizyolojik etkileri hem proteinleri ile kompleks oluşturabilmelerine bağlıdır. Stres koşullarında HO-1 enziminin artması ile CO'nin hücreiçi düzeyleri de önemli ölçüde artmaktadır. HO-1 yolağının aktivasyonu stresli bir uyarana karşı gelişen redoks dengesizliğine karşı hücrelerin kompleks homeostatik adaptasyon yanıtlarının bir parçasıdır. Bu yolak sonucu açığa çıkan CO hücre koruyucu yanıtta yer alır(Motterlini & Otterbein, 2010). Sistatyonin β -sentaz (CBS) beyin, karaciğer, periferik sinir sistemi ve böbrekte; sistatyonin γ -liyaz (CSE) ise karaciğer, damar hücreleri ve damar dışı düz kas hücrelerinde bulunur. CSE'nin inhibisyonu veya genetik delesyonu, hipertansiyon ve endotelyal gevşeme yanıtlarını belirgin şekilde azaltır ve hipertansiyona neden olur. (Yang ve diğerleri., 2008). H₂S'in erektile fonksyonu düzelttiği bilinmektedir(Balasubramanian Srilatha, P. Ganesan Adaikan, Ling Li, & Philip K. Moore, 2007). İnsan penil dokusunda CBS ve CSE enzimlerinin bulunduğu ve bu enzimlerin, eksojen H₂S ve L-sisteinin doza bağlı gevşeme yanıtı sağladığı gösterilmiştir(Roberta d'Emmanuele di Villa Bianca ve diğerleri., 2009). CO'nin beyin ve karaciğerde, H₂S üretiminde rol oynayan CBS'in ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir(Kabe ve diğerleri., 2016). Diğer yandan, CO'nin penil dokuda NO yokluğunda endojen H₂S ve CSE ile 3-MPST düzeylerini artırarak dengeleyici bir rol oynadığı bilinmektedir. (Günay Yetik-Anacak ve diğerleri., 2016). Bütün bu bilgiler doğrultusunda 3 gazotransmitter arasında gerçekleşen etkileşimleri ve ilişkileri konusunda yıllarca araştırmalar yapılmasına rağmen hala net bir şekilde ortaya konulabilmiş değildir. Özellikle, endojen CO'nin penil dokuda H₂S bağımlı gevşeme yanıtları üzerindeki etkisi yeterince araştırılmamıştır.

Farmakolojik Olarak NO, H₂S ve CO Etkileşimleri

Diyabetik sıçanlarla yapılan bir çalışmada, H₂S donörü ile tedavi edilen grupta cGMP, NO, H₂S ve HO aktivitesinde artış, H₂S inhibitörü ile tedavi edilenlerde ise bu parametrelerde azalma gözlemlenmiştir. Bu bulgular, H₂S donörlerinin diyabette olumlu etkiler gösterdiğini H₂S inhibitörlerinin ise olumsuz etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır (Zhang ve diğerleri., 2016). Sıçan aortasında kümülatif CORM-2'nin uzun süreli gevşemeye neden olduğu gözlemlenmiştir. Motterlini ve arkadaşları bu uzun süren etkinin sGMP'e bağlı olduğunu ve gevşeme sürecinin miyogloblin varlığında ortadan kaldırıldığını, guanilat siklaz inhibitörü (ODQ) ile önemli ölçüde azaldığını rapor etmişlerdir (Roberto Motterlini ve diğerleri., 2002). Gazotransmitterlerden NO ve CO, sentezleri için oksijen molekülüne ihtiyaç duyar, ancak H₂S'in metabolize olabilmesi için de oksijen molekülüne gereksinimi vardır. NO ve CO, çözünebilir guanilat siklazı aktive edebilirken, H₂S bu molekülle pek etkileşim göstermez (Gao, 2010; Kolluru, Shen, Yuan, & Kevil, 2017).

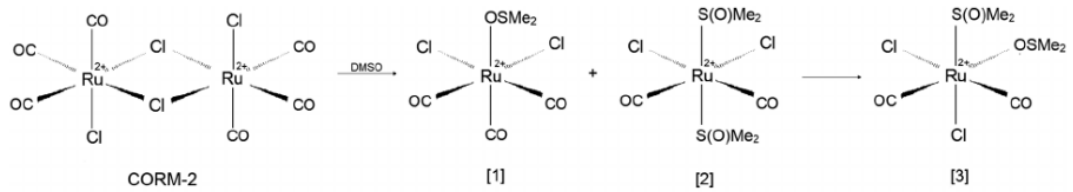
Çalışmamızda sağlıklı farelerden elde edilen endotelli dokularda CORM-2, HO-1 aktivatörü Hemin ve inhibitörü CrMP inkübasyonları sonrası alınan fenilefrin kasılma yanıtlarında bir değişiklik görülmemiştir. NaHS gevşeme yanıtları öncesinde uygulanan CORM-2 Hemin ve CrMP inkübasyonlarının kümülatif NaHS gevşeme yanıtlarına etkileri görülmezken, L-Sistein ile alınan gevşeme yanıtlarında istatistiksel farklılıklar görülmüştür. Hemin ve CORM-2 inkübasyonları L-Sistein gevşeme yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırırken, CrMP ile inkübe edilmiş CC dokularda gevşeme yanıtları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Penil dokudaki bu elde edilen gevşeme yanıtları ile ilgili sonuçlar, daha sonra eksojen ve endojen üretilen CO'nin H₂S düzeylerine olan etkisi metilen mavisi deneyi ile doğrulanmıştır. CORM-2 ve Hemin inkübasyonu sonrası dokulardan elde edilen metilen mavisi deneyi sonuçlarında, H₂S seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı ve önceki çalışmalarımızda hem corpus cavernosum hem de aorta üzerinde yapılan benzer uygulamada da CO'nin H₂S düzeyini arttırdığı gözlemlenmiştir (Özen Ö, 2021; Yılmaz S, 2019).

CO ve H₂S arasındaki ilişkiyi gösteren önceki çalışmalara bakılacak olursa, CO biyosentezinin modülasyonu, Keap1/Nrf2 yolu aracılığıyla HO-1 ekspresyonunun artmasıyla gerçekleşmektedir. CBS/CSE/3-MPST enzimleri aracılığıyla üretilen H₂S'in oksitlenmiş Cys₁₅₁ ile veya indirgenmiş Cys₁₅₁ ile H₂S'den türetilmiş HS· reaksiyonuyla Keap1 Cys₁₅₁'in persülfidasyonu, Keap1'in Nrf2'den ayrılmasına neden

olmaktadır; bu da Nrf2'nin çekirdeğe taşınmasına olanak tanır, burada heme oksijenaz HO-1'ı artırır ve sonuç olarak CBS inhibisyonunu oluşturan daha yüksek CO seviyelerine yol açabilir(Giuffrè & Vicente, 2018). NaHS gevşeme yanıtlarında CORM-2, CrMP ve Hemin inkübasyonu sonrası hepsi aynı düzeyde gevşeme göstermiştir. Bu ise eksojen verilen NaHS'ün, CO tarafından CBS enzimin inhibe edilmesine rağmen diğer H₂S enzimleri üzerinden gevşemeye neden olabileceğini düşündürmektedir. Penil dokuda eksojen NaHS'ün penil uzunluğu ve ICP'yi önemli ölçüde artırdığı, CBS ve CSE'nin inhibisyonunun ise corpus cavernosum'un kasılmasına ve elektrostimülasyona verilen ICP yanıtının azalmasına neden olduğu belirtilmiştir(Hannan ve diğerleri., 2013), fakat eksojen H₂S'in corpus cavernosum düz kas hücrelerinin fenotipik modülasyonunu düzenleme rolü henüz tam olarak aydınlatılmamıştır(Qinyu ve diğerleri., 2021). Tüm gruplarda NaHS gevşemelerinin aynı düzeyde olmasının bir diğer nedeni ise L-Sistein gevşemelerinden farklı olarak eksojen verilen NaHS'ün enzimlerden bağımsız direk etki etmesinden kaynaklanmaktadır(La Fuente ve diğerleri., 2020). Endojen CO'nin aktivitesini net bir şekilde anlamak için, hem nitrik oksit sentaz (NOS) hem de çözünür guanilat siklaz (sGC) aktivitesini engellemeden seçici olarak HO aktivitesini inhibe edecek bir inhibitör gerekmiştir. Bu nedenle araştırmamızda daha önce incelenmiş olan metaloporfirinlerden HO aktivitesinin seçici bir inhibitörü CrMP kullanılmıştır(Appleton ve diğerleri., 1999). L-Sistein gevşemelerinde görüldüğü üzere HO-1 inhibitörü CrMP varlığında gevşeme yanıtlarındaki azalma, endojen CO üreten hem oksijenaz enziminin inhibe edilmesinin bir sonucudur. Buna karşın ortamda eksojen ve endojen CO varlığında gevşeme artmıştır. HO/CO yolu'nun erektile fonksiyondaki rolü, HO ekspresyonu ve CO'nun kavernoöz dokuda gevşemeyi indüklemesi ile gösterilmiştir. HO/CO sisteminin erektile fonksiyonda bir sinyal molekülü olarak NO'ı domine ettiği öne sürülmektedir. HO-1 indüksiyonunun, cGMP seviyelerini yükselterek ED'yi düzelttiği bildirilmiştir. NO'nin kendisinin HO-1'ı CO üretmek için indüklediği gösterilmiştir(M. T. Abdel Aziz ve diğerleri., 2008; Mohamed T. Abdel Aziz ve diğerleri., 2009; M. Aziz ve diğerleri., 2005; M. T. Aziz ve diğerleri., 2008). Bu çerçevede, sGC, NO'nin cGMP'yi arttırmak için önemli bir hedef olarak kabul edilmekle birlikte, NO gibi CO aktivasyonu için sGC'ye bağlanabilir. Ancak, H₂S sGC'yi uyarak cGMP seviyesini arttırırken, bu 3 gazotransmitter için sGC her zaman hedef olarak ilişkilendirilmez(Mostafa ve

diğerleri., 2019; G. Yetik-Anacak, Xia, Dimitropoulou, Venema, & Catravas, 2006). Bir diğer çalışmada ise endojen CO ve CORM-2'nin neden olduğu CC gevşemenin altında yatan moleküler mekanizmanın tamamen farklı olduğu vurgulanmaktadır. HO-1/CO, çözünebilir guanilil siklazı (sGC) aktive ederek siklik guanozin monofosfat (cGMP) konsantrasyonlarını artırarak CC gevşemeyi indüklediğini, CORM-2'nin neden olduğu CC gevşemede ise yer alan moleküler mekanizmanın, sGC aktivasyonu ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir (Decaluwé, Pauwels, Boydens, & Van de Voorde, 2012).

Metilen mavisi deneyimizde, CORM-2'nin çözücüsü olarak DMSO (dimetil sülfoksit) ve Hemin'in çözücüsü olarak NaOH kullanılarak H₂S (hidrojen sülfür) ölçümleri yapılmıştır. Bu iki çözücü grubunun H₂S seviyeleri, kontrol grubundaki L-sistein ile kıyaslandığında neredeyse aynı düzeyde çıkmıştır. Bu sonuç, CORM-2 ve Hemin'in gevşeme yanıtlarının ya da H₂S'deki artışın çözücü kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, literatürde önceki çalışmalarla bu durumun aslında böyle olmadığı kanıtlanmıştır. CORM-2 molekülü, DMSO (dimetil sülfoksit) çözücüsü ile çözündüğünde dimer formundan monomer formuna geçer. Bu geçiş sırasında, CORM-2'nin içerisindeki geçiş metali ligand (bağlanıcı) olarak hizmet eden DMSO, CO (karbon monoksit) salınımına olanak tanır. Dolayısıyla, DMSO ile çözülen CORM-2, ortama CO gazı salınımını sağlar ve bu gaz, gazatransmitter olarak işlev görür.

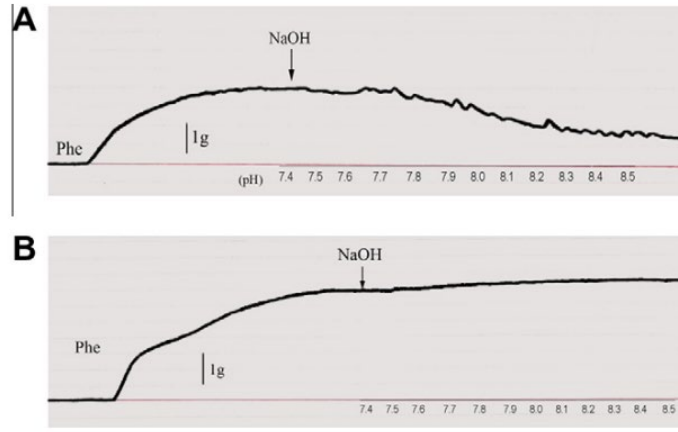


Şekil 28. CORM-2 ile DMSO Arasındaki Tepkime(Juszczak, Kluska, Wysokinski, & Wozniak, 2020)

Bu işlem, ligand değişimi ile tetiklenir ve fac-[RuCl₂(CO)₃(DMSO)] [1] ve cis, cis, trans-[RuCl₂(CO)₂(DMSO)₂] [2] bileşiklerine yol açar (Şekil 28). Daha sonra, trans-[RuCl₂(CO)₂(DMSO)₂] [2] izomeri yavaşça daha kararlı olan tüm cis izomerine dönüşür (Juszczak ve diğerleri., 2020).

Bir diğer çalışmada ise Fenilefrin (Phe) ile önceden kasılmış sıçan torasik aort halkalarında, NaOH ile ekstraselüler alkali hale getirildikten sonra yalnızca endotel

intact halkalarda gevşemeye neden olduğunu ve tamamen nitrik oksit sentaz (NOS), Ca^{2+} /kalmmodulin ve $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ değiştirici (NCX) inhibisyonu ile ortadan kaldırıldığı belirtilmiştir(Şekil 29)(Celotto ve diğerleri., 2010).



Şekil 29. Ekstraselüler Alkali Hale Getirmeye Maruz Bırakılan Endotel İntact Ve Endotel-Denuded Sıçan Torasik Aort Halkalarında pH Yanıt Eğrisi(Celotto ve diğerleri., 2010).

Diğer yandan H_2S 'in ve CO'nin çeşitli patolojilerdeki koruyucu etkisi, en azından, HO-1'i indükleyici etkisiyle açıklanabilir. H_2S , insan böbrek hücrelerinde HO-1'i arttırmıştır(D'Araio ve diğerleri., 2014). Heme ve H_2S sistemi arasındaki pozitif etkileşime başka bir örnek ise CBS eksikliğidir; H_2S eksikliği heme biyosentetik yolunu ve heme taşınmasını bozmaktadır(P. Zhao ve diğerleri., 2019). Aspirin ile indüklenen hemorajik mide mukozası modelinde, hem CORM-2 hem de NaHS gastroprotektif etkiye sahiptir; daha da önemlisi, CORM-2'nin koruyucu etkisi H_2S 'den bağımsız görünmektedir(Magierowski ve diğerleri., 2016). Sıçan böbrek hasarı modelinde, NaHS böbrek fonksiyonunu iyileştirmiştir, böbrekteki nitrik oksit (NO) ve $\text{TNF-}\alpha$ seviyelerini düşürmüştür. Ancak antioksidan, HO-1 aktivitesini ve IL-10 konsantrasyonunu artırmıştır(N. M. Aziz, Elbassuoni, Kamel, & Ahmed, 2020). Bir diğer in vitro ve in vivo çalışmaları baz alan araştırmada ise gastrointestinal hastalıklarda bildirilen endojen gaz mediyatörleri olan nitrik oksit (NO), hidrojen sülfür (H_2S) ve karbon monoksitin (CO) sitoprotektif etkisi, bu gazların gastrik ve bağırsak hasarlarının tedavisinde, önlenmesinde ve hatta inflamatuvar hastalıklarda önemi olduğu belirtilmiştir(Pineda-Peña & Chávez-Piña, 2023).

Sonuç ve Öneriler

Araştırmamızda fare penil dokusunda H₂S'in, hem eksojen CO donörü CORM-2'nin hem de endojen üretilen CO'nin hem oksijenaz yolağı ile ilişkisindeki edinilen sonuçlar şu şekildedir:

- Endojen ve eksojen CO konsantrasyona bağılı olarak endojen H₂S ile gevşemeyi arttırmıştır.
- CO'nin H₂S gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi DMSO'dan etkilenmemiştir.
- Eksojen CO donörü CORM-2'nin endojen H₂S üzerindeki etkisi, HO-1 aracılı üretilen endojen CO etkisinden daha fazladır.
- HO-1 inhibitörü CrMP varlığında endojen CO'nin gevşemeye olan etkisi sağlıklı kontrol grubuna kıyasla azalmıştır. Bu ise normal koşullarda HO-1 aktivatörü Hemin olmaksızın endojen H₂S gevşemesinde CO rolünü ortaya koymaktadır.
 - Bu sonuç ortamda CO varlığında H₂S düzeylerinin artması ile desteklenmiştir.
- Ortamda H₂S inhibitörü AOAA varlığında ise CO'nin neden olduğu H₂S düzeylerindeki artış azalmıştır.

Elde edilen bu sonuçlar CO'nin penil dokudaki vazodilatör etkisinin H₂S ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, erektil disfonksiyonda ve endotelial disfonksiyonda CO ve H₂S mekanizmalarının iyi aydınlatılması için ileride yeni araştırmalar yapılması gerektiğini göstermektedir. İleride bu 2 gazotransmitterle ilgili gerçekleştirilecek yeni araştırmalara ışık tutmak amacıyla verebileceğimiz öneriler şu şekildedir:

CO'nun, H₂S üretiminde rol oynayan CBS'i inhibe etmesi, endojen H₂S'in azalmasıyla gevşemenin ters orantılı olabileceğini düşündürmektedir. Bu durumda CO'nin tek başına vazoaktif özellik göstermesi sonucunda gevşemeye neden olduğu ya da H₂S'in diğer 2 enzim tarafından aşırı ekspresyonu sonucunda CO'le birlikte gevşemeyi arttırdığını düşündürmektedir. Bu düşüncemiz AOAA dışında H₂S üretiminden sorumlu diğer enzimlere özgü farklı inhibitörlerle gerçekleştirilecek çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir. Diğer bir önerimiz ise eksojen CORM-2,

endojen HO-1/CO aktivatörü Hemin, H₂S inhibitörü ve CrMP ile inkübe edilerek fenilefrin sonrası Ach gevşeme yanıtlarındaki etkilerine bakılması CO/H₂S gazotransmitterleri arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.



Kaynaklar

- Abdel Aziz, M. T., El-Asmar, M. F., Mostafa, T., Atta, H., Fouad, H. H., Roshdy, N. K., . . . Olszanecki, R. (2008). Effect of hemin and carbon monoxide releasing molecule (CORM-3) on cGMP in rat penile tissue. *J Sex Med*, 5(2), 336-343. doi:10.1111/j.1743-6109.2007.00695.x
- Abdel Aziz, M. T., Mostafa, T., Atta, H., Wassef, M. A., Fouad, H. H., Rashed, L. A., & Sabry, D. (2009). Putative Role of Carbon Monoxide Signaling Pathway in Penile Erectile Function. *The Journal of Sexual Medicine*, 6(1), 49-60. doi:https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01050.x
- Adach, W., Błaszczyk, M., & Olas, B. (2020). Carbon monoxide and its donors - Chemical and biological properties. *Chemico-Biological Interactions*, 318, 108973. doi:https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.108973
- Adach, W., & Olas, B. (2017). The role of CORM-2 as a modulator of oxidative stress and hemostatic parameters of human plasma in vitro. *PloS one*, 12(9), e0184787.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., . . . Kessel, D. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250-281.
- Albersen, M., Fandel, T. M., Zhang, H., Banie, L., Lin, G., De Ridder, D., . . . Lue, T. F. (2011). Pentoxifylline promotes recovery of erectile function in a rat model of postprostatectomy erectile dysfunction. *Eur Urol*, 59(2), 286-296. doi:10.1016/j.eururo.2010.10.034
- Albersen, M., Mwamukonda, K. B., Shindel, A. W., & Lue, T. F. (2011). Evaluation and treatment of erectile dysfunction. *Med Clin North Am*, 95(1), 201-212. doi:10.1016/j.mcna.2010.08.016
- Andersson, K. E. (2011). Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction. *Pharmacol Rev*, 63(4), 811-859. doi:10.1124/pr.111.004515
- Appleton, S. D., Chretien, M. L., McLaughlin, B. E., Vreman, H. J., Stevenson, D. K., Brien, J. F., . . . Marks, G. S. (1999). Selective inhibition of heme oxygenase, without inhibition of nitric oxide synthase or soluble guanylyl cyclase, by

- metalloporphyrins at low concentrations. *Drug Metab Dispos*, 27(10), 1214-1219.
- Aziz, M., Elasmr, M., Mostafa, T., att, H., Wassef, M., Fouad, H., . . . Sabry, D. (2005). Effects of Nitric Oxide Synthase and Heme Oxygenase Inducers and Inhibitors on Molecular Signaling of Erectile Function. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition - J CLIN BIOCHEM NUTR*, 37, 103-111. doi:10.3164/jcbrn.37.103
- Aziz, M. T., Mostafa, T., Atta, H., Rashed, L., Marzouk, S. A., Obaia, E. M., . . . Aziz, A. T. (2008). The role of PDE5 inhibitors in heme oxygenase-cGMP relationship in rat cavernous tissues. *J Sex Med*, 5(7), 1636-1645. doi:10.1111/j.1743-6109.2007.00729.x
- Aziz, M. T. A., El-Asmar, M. F., Mostafa, T., Atta, H., Wassef, M. A. A., Fouad, H. H., . . . Sabry, D. (2005). Effects of nitric oxide synthase and heme oxygenase inducers and inhibitors on molecular signaling of erectile function. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 37(3), 103-111.
- Aziz, N. M., Elbassuoni, E. A., Kamel, M. Y., & Ahmed, S. M. (2020). Hydrogen sulfide renal protective effects: possible link between hydrogen sulfide and endogenous carbon monoxide in a rat model of renal injury. *Cell Stress and Chaperones*, 25(2), 211-221.
- Burnett, A. L. (2004). Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. *Int J Impot Res*, 16 Suppl 1, S15-19. doi:10.1038/sj.ijir.3901209
- Burnett, A. L., Johns, D. G., Kriegsfeld, L. J., Klein, S. L., Calvin, D. C., Demas, G. E., . . . Poss, K. D. (1998). Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. *Nat Med*, 4(1), 84-87. doi:10.1038/nm0198-084
- Celotto, A. C., Capellini, V. K., Restini, C. B., Baldo, C. F., Bendhack, L. M., & Evora, P. R. (2010). Extracellular alkalization induces endothelium-derived nitric oxide dependent relaxation in rat thoracic aorta. *Nitric Oxide*, 23(4), 269-274. doi:10.1016/j.niox.2010.07.008
- d'Emmanuele di Villa Bianca, R., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(11), 4513-4518. doi:10.1073/pnas.0807974105

- D'Araio, E., Shaw, N., Millward, A., Demaine, A., Whiteman, M., & Hodgkinson, A. (2014). Hydrogen sulfide induces heme oxygenase-1 in human kidney cells. *Acta diabetologica*, 51, 155-157.
- de Souza, I. L. L., Ferreira, E. D. S., Vasconcelos, L. H. C., Cavalcante, F. A., & da Silva, B. A. (2022). Erectile Dysfunction: Key Role of Cavernous Smooth Muscle Cells. *Front Pharmacol*, 13, 895044. doi:10.3389/fphar.2022.895044
- Decaluwé, K., Pauwels, B., Boydens, C., & Van de Voorde, J. (2012). Divergent Molecular Mechanisms Underlay CO- and CORM-2-Induced Relaxation of Corpora Cavernosa. *The Journal of Sexual Medicine*, 9(9), 2284-2292. doi:https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2012.02831.x
- Donnarumma, E., Trivedi, R., & Lefer, D. (2017). Protective Actions of H₂S in Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. In (Vol. 7, pp. 583-602).
- Eto, K., Ogasawara, M., Umemura, K., Nagai, Y., & Kimura, H. (2002). Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *J Neurosci*, 22(9), 3386-3391. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-09-03386.2002
- Gao, Y. (2010). The multiple actions of NO. *Pflugers Arch*, 459(6), 829-839. doi:10.1007/s00424-009-0773-9
- García-Gallego, S., & Bernardes, G. J. L. (2014). Carbon-Monoxide-Releasing Molecules for the Delivery of Therapeutic CO In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(37), 9712-9721. doi:https://doi.org/10.1002/anie.201311225
- Giuffrè, A., & Vicente, J. B. (2018). Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 6290931. doi:10.1155/2018/6290931
- Haines, D. D., & Tosaki, A. (2020). Heme Degradation in Pathophysiology of and Countermeasures to Inflammation-Associated Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9698. Retrieved from https://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9698
- Hannan, J. L., Albersen, M., Kutlu, O., Gratzke, C., Stief, C. G., Burnett, A. L., . . . Bivalacqua, T. J. (2013). Inhibition of Rho-Kinase Improves Erectile Function, Increases Nitric Oxide Signaling and Decreases Penile Apoptosis in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury. *The Journal of Urology*, 189(3), 1155-1161. doi:https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.09.104

- Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y., & Noguchi, M. (2004). Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*, 336(2), 241-250. doi:10.1016/j.gene.2004.04.002
- Hedlund, P., Ny, L., Alm, P., & Andersson, K. E. (2000). Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J Urol*, 164(3 Pt 1), 868-875. doi:10.1097/00005392-200009010-00064
- Jackson, G. (2013). Erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Arab J Urol*, 11(3), 212-216. doi:10.1016/j.aju.2013.03.003
- Jin, Y. C., Gam, S. C., Jung, J. H., Hyun, J. S., Chang, K. C., & Hyun, J. S. (2008). Expression and Activity of Heme Oxygenase-1 in Artificially Induced Low-Flow Priapism in Rat Penile Tissues. *The Journal of Sexual Medicine*, 5(8), 1876-1882. doi:10.1111/j.1743-6109.2008.00886.x
- Juszczak, M., Kluska, M., Wysokinski, D., & Wozniak, K. (2020). DNA damage and antioxidant properties of CORM-2 in normal and cancer cells. *Scientific Reports*, 10. doi:10.1038/s41598-020-68948-6
- Kabe, Y., Yamamoto, T., Kajimura, M., Sugiura, Y., Koike, I., Ohmura, M., . . . Suematsu, M. (2016). Cystathionine β -synthase and PGRMC1 as CO sensors. *Free Radical Biology and Medicine*, 99, 333-344. doi:https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.025
- Kautz, A. C., Kunz, P. C., & Janiak, C. (2016). CO-releasing molecule (CORM) conjugate systems. *Dalton Trans*, 45(45), 18045-18063. doi:10.1039/c6dt03515a
- Kautz, A. C., Kunz, P. C., & Janiak, C. (2016). CO-releasing molecule (CORM) conjugate systems. *Dalton Transactions*, 45(45), 18045-18063.
- Kolluru, G. K., Shen, X., Yuan, S., & Kevil, C. G. (2017). Gasotransmitter Heterocellular Signaling. *Antioxid Redox Signal*, 26(16), 936-960. doi:10.1089/ars.2016.6909
- La Fuente, J. M., Sevilleja-Ortiz, A., García-Rojo, E., El Assar, M., Fernández, A., Pepe-Cardoso, A. J., . . . Angulo, J. (2020). Erectile dysfunction is associated with defective L-cysteine/hydrogen sulfide pathway in human corpus

- cavernosum and penile arteries. *European Journal of Pharmacology*, 884, 173370. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173370>
- Maas, R., Schwedhelm, E., Albsmeier, J., & Boger, R. H. (2002). The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vasc Med*, 7(3), 213-225. doi:10.1191/1358863x02vm429ra
- Maggi, M., Filippi, S., Ledda, F., Magini, A., & Forti, G. (2000). Erectile dysfunction: from biochemical pharmacology to advances in medical therapy. *Eur J Endocrinol*, 143(2), 143-154. doi:10.1530/eje.0.1430143
- Magierowski, M., Magierowska, K., Hubalewska-Mazgaj, M., Adamski, J., Bakalarz, D., Sliwowski, Z., . . . Brzozowski, T. (2016). Interaction between endogenous carbon monoxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastroprotection against acute aspirin-induced gastric damage. *Pharmacological Research*, 114, 235-250.
- Mostafa, T., Rashed, L., Nabil, N., Abo-Sief, A. F., Mohamed, M. M., & Omar, M. S. (2019). Cavernosal hydrogen sulfide levels are associated with nitric oxide and hemeoxygenase levels in diabetic rats. *Int J Impot Res*, 31(2), 105-110. doi:10.1038/s41443-018-0084-9
- Motterlini, R., Mann, B. E., Johnson, T. R., Clark, J. E., Foresti, R., & Green, C. J. (2003). Bioactivity and pharmacological actions of carbon monoxide-releasing molecules. *Curr Pharm Des*, 9(30), 2525-2539. doi:10.2174/1381612033453785
- Motterlini, R., & Otterbein, L. E. (2010). The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat Rev Drug Discov*, 9(9), 728-743. doi:10.1038/nrd3228
- Nielsen, V. G., & Garza, J. I. (2014). Comparison of the effects of CORM-2, CORM-3 and CORM-A1 on coagulation in human plasma. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 25(8), 801-805.
- Özlem, Ö. (2021). FARE AORTASINDA KARBON MONOKSİT ARACILI VASKÜLER YANITLAR VE DİĞER GAZOTRANSMİTERLER İLE İLİŞKİSİ. (Yüksek Lisans). Ege Üniversitesi, BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ. (TYL-2019-20636)

- Pineda-Peña, E., & Chávez-Piña, A. (2023). Gaseous mediators (H₂S, NO and CO) a new approach in gastrointestinal protection. *Mexican Journal of Medical Research ICSA*, 11, 39-47. doi:10.29057/mjmr.v11i21.9436
- Qinyu, Z., Shuhua, H., Fengzhi, C., Li, W., Liren, Z., Jialiang, H., . . . Anyang, W. (2021). Administration of H₂S improves erectile dysfunction by inhibiting phenotypic modulation of corpus cavernosum smooth muscle in bilateral cavernous nerve injury rats. *Nitric Oxide*, 107, 1-10. doi:https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.11.003
- Qiu, X., Villalta, J., Lin, G., & Lue, T. F. (2012). Role of hydrogen sulfide in the physiology of penile erection. *J Androl*, 33(4), 529-535. doi:10.2164/jandrol.111.014936
- Quan, F.-S., & Lee, G.-J. (2021). Analytical Methods for Detection of Gasotransmitter Hydrogen Sulfide Released from Live Cells. *BioMed Research International*, 2021, 5473965. doi:10.1155/2021/5473965
- Rochette, L., Cottin, Y., Zeller, M., & Vergely, C. (2013). Carbon monoxide: mechanisms of action and potential clinical implications. *Pharmacol Ther*, 137(2), 133-152. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.09.007
- Romão, C. C., Blättler, W. A., Seixas, J. D., & Bernardes, G. J. (2012). Developing drug molecules for therapy with carbon monoxide. *Chemical Society Reviews*, 41(9), 3571-3583.
- Ryter, S. W., Alam, J., & Choi, A. M. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*, 86(2), 583-650. doi:10.1152/physrev.00011.2005
- Shin, D., Pregarz, G., Jr., & Gardin, J. M. (2011). Erectile dysfunction: a disease marker for cardiovascular disease. *Cardiol Rev*, 19(1), 5-11. doi:10.1097/CRD.0b013e3181fb7eb8
- Sinem, Y. (2019). CORM-2 Molekülünün Penil Dokuda Vasküler Tonus Üzerine Etkisi. (Yüksek Lisans). Ege Üniversitesi,
- Srilatha, B., Adaikan, P. G., Li, L., & Moore, P. K. (2007). Hydrogen Sulphide: A Novel Endogenous Gasotransmitter Facilitates Erectile Function. *The Journal of Sexual Medicine*, 4(5), 1304-1311. doi:10.1111/j.1743-6109.2007.00561.x

- Thomas, J. A. (2002). Pharmacological aspects of erectile dysfunction. *Jpn J Pharmacol*, 89(2), 101-112. doi:10.1254/jjp.89.101
- Ushiyama, M., Kuramochi, T., Yagi, S., & Katayama, S. (2008). Antioxidant treatment with alpha-tocopherol improves erectile function in hypertensive rats. *Hypertens Res*, 31(5), 1007-1013. doi:10.1291/hypres.31.1007
- Ushiyama, M., Morita, T., Kuramochi, T., Yagi, S., & Katayama, S. (2004). Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide. *Hypertens Res*, 27(4), 253-261. doi:10.1291/hypres.27.253
- Wu, L., & Wang, R. (2005). Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev*, 57(4), 585-630. doi:10.1124/pr.57.4.3
- Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., . . . Wang, R. (2008). H₂S as a Physiologic Vasorelaxant: Hypertension in Mice with Deletion of Cystathionine β -Lyase. *Science*, 322(5901), 587-590. doi:10.1126/science.1162667
- Yetik-Anacak, G., Dikmen, A., Coletta, C., Mitidieri, E., Dereli, M., Donnarumma, E., . . . Sorrentino, R. (2016). Hydrogen sulfide compensates nitric oxide deficiency in murine corpus cavernosum. *Pharmacological Research*, 113, 38-43. doi:https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.08.015
- Yetik-Anacak, G., Sorrentino, R., Linder, A. E., & Murat, N. (2015). Gas what: NO is not the only answer to sexual function. *Br J Pharmacol*, 172(6), 1434-1454. doi:10.1111/bph.12700
- Yetik-Anacak, G., Xia, T., Dimitropoulou, C., Venema, R. C., & Catravas, J. D. (2006). Effects of hsp90 binding inhibitors on sGC-mediated vascular relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(1), H260-268. doi:10.1152/ajpheart.01027.2005
- Zhang, Y., Yang, J., Wang, T., Wang, S.-G., Liu, J.-H., Yin, C.-P., & Ye, Z.-Q. (2016). Decreased Endogenous Hydrogen Sulfide Generation in Penile Tissues of Diabetic Rats with Erectile Dysfunction. *The Journal of Sexual Medicine*, 13(3), 350-360. doi:10.1016/j.jsxm.2016.01.002
- Zhao, P., Qian, C., Chen, Y.-J., Sheng, Y., Ke, Y., & Qian, Z.-M. (2019). Cystathionine β -synthase (CBS) deficiency suppresses erythropoiesis by

disrupting expression of heme biosynthetic enzymes and transporter. *Cell Death & Disease*, 10(10), 708.

Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., & Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*, 20(21), 6008-6016. doi:10.1093/emboj/20.21.6008



Ekler

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onayı

EGE ÜNİVERSİTESİ	
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	
SAYI: 2022-112	28.12.2022
KONU: Onay	
Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda “FARE PENİL DOKUSUNDA H2S YANITLARININ HEM OKSİJENAZ YOLAĞI İLE İLİŞKİSİ” isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.	
Yürütücü:	Doç. Dr. Gönen ÖZŞARLAK SÖZER, EÜ Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD YL. Öğr. Kuvvat SHAMEMEDOV, EÜ Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD Araş. Gör. Elif ALAN, EÜ Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD Araş. Gör. Deniz ÇATAKLI, Süleyman Demirel Ün. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD
Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda 40 adet erkek swiss albino fare deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.	

Teşekkür

Yüksek lisans yolculuğum boyunca sadece bir öğretmen olarak değil, aynı zamanda manevi ve her anlamda yanımda olduğunu hissettiren, sadece bilgi vermekle kalmayıp, aynı zamanda bana öğrenme sürecinde derin bilgi birikimi ve tecrübesiyle rehberlik eden kişiliği ve tarif edilemez bir değere sahip Doç. Dr. Gönen ÖZŞARLAK SÖZER'e içten teşekkür ederim.

Her zaman beni manevi ve maddi anlamda destekleyen ne kadar uzakta olsalar da yanımda olduğunu bildiğim, onlara bu başarıyı sunmakla gurur duyduğum Aileme teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim süresince hiçbir çıkar gözetmeksizin bilgi ve deneyimleriyle manevi anlamda yanımda olan arkadaşlarım Ümran KIZRAK YILMAZ'a ve Ozan MERT'e minnettarım.

Kısmen de olsa ismi geçen Arş. Gör. Elif ALAN ALBAYRAK'a laboratuvar deneyimiyle araştırmamıza verdiği emek ve zaman için teşekkür ederim.

Bu çalışma 123S228 numaralı TÜBİTAK-1002A projesi olarak TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Bu projeyi destekledikleri için TÜBİTAK ve Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir, 25.08.2024

Kuvvat SHAMAMEDOV

Özgeçmiş

Eğitim Bilgileri:

Lisans: Kimya

(2017-2021)

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi (İzmir / Türkiye)

Yüksek Lisans: Farmakoloji Anabilim Dalı

(2021-2024)

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi

İletişim Bilgileri:

E-mail:

İş Deneyimi:

Mentor: Bilim Festivali No. 1188668b "Bilim Hayatımızda" TÜBİTAK 4007 tarafından desteklenmiştir (Temmuz 2018 / İzmir-Türkiye).

Gönüllü Stajyer:

Laboratuvar Analisti: Daşoguz Genel İl Hastanesi (Temmuz-Ekim 2019 / Türkmenistan).

Aplikasyon Uzmanı: BioSystems Diyagnostik ve Analitik Laboratuvar Ürünleri TİC. LTD. ŞTİ. (Mays 2019 / İzmir-Türkiye)

Dil Bilgisi:

İngilizce: B2

Rusça: C1

Türkçe: C1

Türkmençe: Ana Dili

Onur ve Ödüller:

- Türkiye Scholarships Bursları Kazananı (Eylül-2015)
- “Diyabetik Ratlarda SGLT2’nin Antioksidan Etkisi: Glukozürikten Fazlası”
Ulusal İç Hastalıklar Kongresi sözlü sunum birincilik ödülü.
- “Diyabetik Ratlarda SGLT2’nin Kalp Dokusuna Etkisi: Gizem Çözüldü mü?”
Diyabet ve Eşlik Eden Hastalıklar Tedavi Kongresi sözlü sunum birincilik
ödülü.

Sertifikalar:

BIO305: Genetik – Saylor.org

App Inventor ile Mobil Programlama Girişi – BILGEIS.NET

HumBio101x: Temel İnsan Biyolojisi: Hücreler ve Dokular,

BIOOC300.1x: Proteinler: Biyolojinin İş Gücü – edx.org

Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası – Ege Üniversitesi / Laboratuvar Hayvanları

Uygulama ve Araştırma Merkezi

Projeler:

- “Fare penil dokusunda H₂S yanıtlarının hem oksijenaz yolu ile ilişkisi” , (TÜBİTAK-1002A, Yüksek Lisans tezi). Proje Koordinatörü: Doç. Dr. Gönen ÖZSARLAK SOZER.
- “Tip 2 Diyabet Gelişen Kardiyomiyopati Üzerinde Yeni Tedavi Hedefleri Olan SGLT2 İnhibitörlerinin Sarkolipin ve Endotelin B Reseptörü Proteinleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi” , (TÜBİTAK 2209-A). Proje Koordinatörü: Prof. Dr. Zeliha KERRY. *(Araştırmacı)*
- “Deneyisel Tip 2 Diyabette SGLT2 İnhibitörü ile Tedavi Edilen Diyabetik Nefropati Tedavisinde Sirtuinlerin Rolü” , (Aliye Ustel Vakfı). Proje Koordinatörü: Prof. Dr. Zeliha KERRY. *(Araştırmacı)*
- “Deneyisel Tip 2 Diyabette SGLT2 İnhibitörü ile Tedavi Edilen Vasküler Hasar ve Kardiyomiyopati Tedavisinde Sirtuinlerin Rolü” , Çok Disiplinli Öncelikli Alan Araştırma Projesi (Proje ID: 24026). Proje Koordinatörü: Prof. Dr. Zeliha KERRY. *(Araştırmacı)*
- “Streptozotosin ile İndüklenmiş Diyabetik Sıçan Beyninde Metforminin Otomaji Yolu Üzerine Etkisi” , (TÜBİTAK 2209-A). Proje Koordinatörü: Doç. Dr. Gönen ÖZSARLAK SOZER. *(Araştırmacı)*

Bildiriler:

- “Diyabetik farelerde SGLT2i'nin kalp dokusuna etkisi: SIRT1 bağlantısı” Yılmaz-Kızrak Ü, Özşarlak-Sözer G, Şamamedov K, Alan-Albayrak E, Çilaker-Micili S, Cavdar Z, Ural C, Çetinkalp S, Bilici-Güler G, Kerry Z. (9. Uluslararası Avrupa Farmakoloji Kongresi(EPHAR 2024) – Atina/Yunanistan)
- “Tip 2 diyabetik kardiyomiyopatide yeni tedavi hedefleri olan SERCA2a/Sarkolipin üzerine SGLT2 İnhibitörlerinin etkileri” Esgü S,

Özşarлак-Sözer G, Yılmaz-Kızrak Ü, Şamamedov K, Kerry Z. (9. Uluslararası Avrupa Farmakoloji Kongresi(EPHAR 2024) – Atina/ Yunanistan)

- “Empagliflozin, diyabetik sıçanlarda NO-aracılı vasküler faydalı etkiler göstermektedir” Yılmaz-Kızrak Ü, Özşarлак-Sözer G, Şamamedov K, Alan-Albayrak E, Çilaker-Micili S, Ural C, Cavdar Z, Çetinkalp S, Bilici-Güler G, Kerry Z. (9. Uluslararası Avrupa Farmakoloji Kongresi(EPHAR 2024) – Atina/ Yunanistan)
- “Fare Corpus Cavernosum'unda H₂S yanıtlarının Heme Oksijenaz Yolağı ile İlişkisi” Şamamedov K, Alan-Albayrak E, Çatakli D, Özşarлак-Sözer G. (9. Uluslararası Avrupa Farmakoloji Kongresi(EPHAR 2024) – Atina/ Yunanistan)
- “Diyabetik sıçanlarda empagliflozin'in antioksidan etkisi” Yılmaz-Kızrak Ü, Şamamedov K, Alan-Albayrak E, Özşarлак-Sözer G, Çetinkalp S, Çilaker-Micili S, Ural C, Cavdar Z, Kerry Z. (9. Uluslararası Avrupa Farmakoloji Kongresi(EPHAR 2024) – Atina/ Yunanistan)