



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**WNT/ β -KATENİN SİNYAL YOLAĞI
İNHİBİTÖRÜ NİKLOZAMİD'İN DİYABETİK
EREKTİL DİSFONKSİYONDA KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seçkin ENGİN

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Feride Sena SEZEN

TRABZON-2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**WNT/ β -KATENİN SİNYAL YOLAĞI
İNHİBİTÖRÜ NİKLOZAMİD'İN DİYABETİK
EREKTİL DİSFONKSİYONDA KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seçkin ENGİN

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Feride Sena SEZEN

TRABZON-2020

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Seçkin Engin'in hazırladığı "Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibitörü Niklozamid'in diyabetik erektil disfonksiyonda koruyucu etkisinin araştırılması" başlıklı çalışma Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 31.01.2020

Prof. Dr. Feride Sena SEZEN
(Danışman)



Prof. Dr. Rasin ÖZYAVUZ



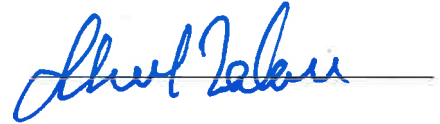
Prof. Dr. Mine DUMAN



Prof. Dr. Hatice Kübra ELÇİOĞLU



Doç. Dr. Selçuk TAKIR



Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne/...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

31.01.2020
Seçkin ENGİN



İthaf

Bu doktora tezimi, her daim yanımda olan biricik aileme ve eğitim hayatımda emeği olan değerli hocalarıma ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince değerli bilgi ve tecrübeleri ile ufkumu genişleten ve yolumu aydınlatan, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Feride Sena SEZEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim ve çalışmalarım boyunca değerli katkıları ve destekleri nedeniyle KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU'ya ve kıymetli öğretim üyeleri hocalarıma teşekkür ederim.

Akademik çalışmalarım da her zaman özveri ile beni destekleyen, hoşgörü ve güvenini esirgemeyen, eğitimime katkıda bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Mine DUMAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Yeşim Kaya YAŞAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu eğitim sürecinde beraber yol aldığım, her zaman yanımda olan, çok kıymetli anılar paylaştığım değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Elif Nur BARUT'a ve Ecz. Merve KILIÇ'a gösterdiği anlayış ve fedakarlıktan dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında bilgi, tecrübe ve olanakları ile desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Arzu ÖZEL'e, Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER'e; yardımları ve manevi desteklerinden dolayı kıymetli çalışma arkadaşlarıma tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her zaman ve her koşulda yanımda olan, şefkatlerini ve yardımlarımı esirgemeyen kıymetli biricik aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Doktora tez çalışmamı destekledikleri için TÜBİTAK (2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı) ve KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP06, Proje Kodu: TDK-2018-7328) teşekkür ederim.

Seçkin ENGİN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Penil Ereksiyon Fizyolojisi	3
2.2. Diyabetik Erektıl Disfonksiyon (ED)	8
2.2.1. Patofizyoloji	9
2.2.1.1. Psikolojik Faktörler	9
2.2.1.2. Eşlik Eden Hastalıklar	10
2.2.1.3. Hipogonadizm	10
2.2.1.4. Kavernöz Düz Kasta Yapısal Değişiklikler	10
2.2.1.5. Endotel Disfonksiyonu	11
2.2.1.6. Nöropati	16
2.2.2. Diyabetik ED Tedavisi	16
2.3. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı	20
2.3.1. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı ve Diyabet	26
2.3.3. Niklozamid	28
2.3.4. XAV939	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Gereç	32

3.1.1. Kimyasallar	32
3.1.2. Antikorlar	33
3.1.3. Cihazlar	34
3.1.4. Kitler	35
3.1.5. Çözelti ve Tamponlar	35
3.1.5.1. Stok Çözelti ve Tamponların Hazırlanması	35
3.1.5.2. Çalışma Çözeltileri ve Tamponların Hazırlanması	37
3.2. Yöntem	39
3.2.1. Deney Hayvanları	39
3.2.2. Tip 1 Diyabet İndüksiyonu ve Deney Protokolü	39
3.2.3. İn vivo Kan Basıncı Ölçümü	40
3.2.4. İn vivo İntrakavernozal Basınç Ölçümü	41
3.2.5. Doku Homojenatlarının Hazırlanması	43
3.2.5.1. Total Doku Homojenatlarının Hazırlanması	43
3.2.5.2. Sitozolik ve Nükleer Fraksiyonlar için Doku Homojenatlarının Hazırlanması	44
3.2.6. Total Protein Tayini	45
3.2.7. Western Blot Yöntemi	45
3.2.7.1. Jellerin Hazırlanması	45
3.2.7.2. Örneklerin Hazırlanması	46
3.2.7.3. Elektroforez	46
3.2.7.4. Jelden Membrana Transfer İşlemi	47
3.2.7.5. Bloklama	48
3.2.7.6. Antikorla İşaretleme	48
3.2.7.7. Görüntüleme	49
3.3. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR	51
4.1. Vücut Ağırlıkları, Kan Glukoz Düzeyi ve Kan Basıncı Verileri	51
4.2. Erektile Fonksiyon Sonuçları	53
4.3. Penil Dokuda Protein Ekspresyonu Sonuçları	60
4.3.1. Penil Dokuda DKK1 Protein Ekspresyonu	61
4.3.2. Penil Dokuda GSK3 β ^{Ser9} Protein Ekspresyonu	62
4.3.3. Penil Dokuda β -katenin Protein Ekspresyonu	63

4.3.4. Sitolik ve Nükleer Fraksiyonlarına Ayrılmış Penil Homojenatlarda β -katenin Protein Ekspresyonu	64
4.3.5. Penil Dokuda Fibronektin Protein Ekspresyonu	66
4.4. MPG’de Protein Ekspresyonu Sonuçları	66
4.4.1. MPG’de DKK1 Protein Ekspresyonu	67
4.4.2. MPG’de GSK3 β ^{Ser9} Protein Ekspresyonu	67
4.4.3. MPG’de β -katenin Protein Ekspresyonu	68
4.4.4. Sitolik ve Nükleer Fraksiyonlarına Ayrılmış MPG Homojenatlarında β -katenin Protein Ekspresyonu	69
4.4.5. MPG’de Prokaspaz-3 Protein Ekspresyonu	71
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	72
6. KAYNAKLAR	79
7. EKLER	93
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	94
8. ÖZGEÇMİŞ	96

TABLolar DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Deney grupları	40
Tablo 2.	Deney gruplarına ait başlangıç (0. hafta) vücut ağırlıkları ortalamaları	51
Tablo 3.	Deney gruplarına ait OAB değerleri	53
Tablo 4.	1 voltluk stimülasyona ait mİKb/OAB ve total İKB/OAB değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması	54
Tablo 5.	4 voltluk stimülasyona ait mİKb/OAB ve total İKB/OAB değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması	56
Tablo 6.	8 voltluk stimülasyona ait mİKb/OAB ve total İKB/OAB değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	İnsan penis enine kesitinde anatomik yapıların yerleşimi	3
Şekil 2.	Ereksiyona aracılık eden yapıların (a) gevşek ve (b) erekte penisteki durumları	4
Şekil 3.	İnsan penisinin nöronal kontrolü	5
Şekil 4.	Kavernöz düz kas tonusunu düzenleyen lokal mekanizmalar	7
Şekil 5.	Diyabetik ED patofizyolojisi	9
Şekil 6.	Diyabetik ED patofizyolojisinde oksidatif stres	12
Şekil 7.	Diyabetik ED patofizyolojisinde AGE ve polioll yolakları	13
Şekil 8.	Diyabetik ED patofizyolojisinde heksozamin yolağı	14
Şekil 9.	Diyabetik ED patofizyolojisinde eNOS kenetsizlenmesi	15
Şekil 10.	Penil ereksiyonda cGMP'nin rolü ve PDE5 inhibitörleri	17
Şekil 11.	Wnt/ β -katenin sinyal yolağı	23
Şekil 12.	Wnt/ β -katenin yolağını hedef alan moleküller	25
Şekil 13.	NZ'nin kimyasal yapısı	29
Şekil 14.	NZ'nin Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki hedefleri	30
Şekil 15.	XAV939'un kimyasal yapısı	31
Şekil 16.	Haftalara göre deney gruplarına ait (a) vücut ağırlığı ve (b) kan glukoz düzeyi ortalamaları	52
Şekil 17.	Kavernöz sinirin 1 voltluk elektriksel stimülasyonu ile elde edilen (a) mİKB/OAB ve (b) total İKB/OAB değerleri.	54
Şekil 18.	Kavernöz sinirin 4 voltluk elektriksel stimülasyonu ile elde edilen (a) mİKB/OAB ve (b) total İKB/OAB değerleri	56
Şekil 19.	Kavernöz sinirin 8 voltluk elektriksel stimülasyonu ile elde edilen (a) mİKB/OAB ve (b) total İKB/OAB değerleri.	58
Şekil 20.	(a) Nondiyabetik+Taşıyıcı, (b) Diyabetik+Taşıyıcı ve (c) Diyabetik+NZ10 gruplarına ait kavernöz sinirin 8 voltluk elektriksel stimülasyonu sırasında kaydedilen İKB ve kan basıncı veri kayıt örnekleri	60
Şekil 21.	Total penis homojenatlarında β -tübulin ve lamin B1 ekspresyonlarını	

gösteren temsili membran görüntüsü	61
Şekil 22. Peniste DKK1 (29 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüsü. (b) Densitometrik analiz sonuçları	62
Şekil 23. Peniste GSK3 β ^{Ser9} (inaktif GSK3 β , 46 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüsü. (b) Densitometrik analiz sonuçları	63
Şekil 24. Peniste β -katenin (defosforile haldeki aktif form; 92 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüsü. (b) Densitometrik analiz sonuçları.	64
Şekil 25. Penil homojenatların sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında β -katenin (defosforile aktif form; 92 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüleri. (b) Densitometrik analiz sonuçları	65
Şekil 26. Peniste fibronektin (262 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüsü. (b) Densitometrik analiz sonuçları	66
Şekil 27. MPG'de DKK1 (29 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüsü. (b) Densitometrik analiz sonuçları	67
Şekil 28. MPG'de GSK3 β ^{Ser9} (inaktif GSK3 β , 46 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüsü. (b) Densitometrik analiz sonuçları	68
Şekil 29. MPG'de β -katenin (defosforile aktif form; 92 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüsü. (b) Densitometrik analiz sonuçları	69
Şekil 30. MPG homojenatlarının sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında β -katenin (defosforile haldeki aktif form; 92 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüleri. (b) Densitometrik analiz sonuçları	70
Şekil 31. MPG'de prokaspaz-3 (35 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüsü. (b) Densitometrik analiz sonuçları	71

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Deney hayvanlarına ait bilgi kaydı için tasarlanmış kafes etiketi	40
Resim 2.	İn vivo OAB ölçümü. (a) Boyun insizyonu, (b) Sol karotid arterin tespiti, (c) Karotid arterin iki ucunun sıkıştırılması ve arterin askıya alınması, (d) PE-50 kanülün karotid artere yerleştirilmesi	41
Resim 3.	MPG ve kavernoöz sinirin (a) şematik gösterimi ve (b) sıçanlarda anatomik yerleşimi	42
Resim 4.	İn vivo İKB ölçümü. (a) Sağ korpusun tespiti, (b) Korpusa kanülün yerleştirilmesi, (c) Bipolar platin elektrod ile kavernoöz sinirin elektriksel stimülasyonu.	43
Resim 5.	Jel dökme işleminin gösterimi	46
Resim 6.	Elektroforez işleminin gösterimi	47
Resim 7.	Jelden membrana transfer işlemi (a) Islak transfer işlemi gösterimi, (b) Transfer işleminden sonra Ponceau S ile boyanan PVDF membran görüntüsü	48

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AC	Adenilat siklaz
ACh	Asetilkolin
AGE	İleri glikozilasyon ürünleri
APC	Adenomatöz polipozis koli proteini
APS	Amonyum persülfat
BSA	Sığır serum albümin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
CK1	Kazein kinaz 1
dk	Dakika
DKK	Dickkopf
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dvl	Dishevelled
DTT	Dithiothreitol
ED	Eretil disfonksiyon
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
EMA	Avrupa İlaç Ajansı (<i>European Medicines Agency</i>)
ET	Endotelin
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (<i>Food and Drug Administration</i>)
FZD	Frizzled reseptörü
g	Gram
GK1	cGMP-bağımlı protein kinaz G1
GLP-1	Glukagon benzeri peptit-1
GSK3β	Glikojen sentaz kinaz 3 β
GSK3β^{Ser9}	9.pozisyondaki serin rezidüsünden fosforillenmiş Glikojen sentaz kinaz 3 β
IC₅₀	Maksimum inhibitör konsantrasyonunun yarısı

IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu (<i>International Diabetes Federation</i>)
İKB	İntrakavernozal basınç
i.p	İntraperitoneal
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
L	Litre
LRP-5/6	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili proteinleri 5/6
M	Molarite
MA	Molekül ağırlığı
mİKB	Maksimum intrakavernozal basınç
mL	Mililitre
mmHg	Milimetre cıva
MPG	Majör pelvik gangliyon
N	Normalite
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaPPi	Sodyum pirofosfat
NaVan	Sodyum ortovanadat
NANC	Nonadrenerjik nonkolinerjik
NA	Noradrenalin
NF-κβ	Nükleer faktör kappa β
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NZ	Niklozamid
OAB	Ortalama arteriyel kan basıncı
PDE5	Fosfodiesteraz tip 5
PE	Polietilen
PGE₁	Prostaglandin E ₁
PMSF	Fenil metil sülfonil florid
PVDF	Poliviniliden florür

RAGE	İleri glikozilasyon ürünleri reseptörleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Ser	Serin
sn	Saniye
STZ	Streptozotosin
TBS	Tris tamponlu serum fizyolojik
TBS-T	Tween 20 içeren tris tamponlu serum fizyolojik
TCF/LEF	T hücresi faktörü/lenfoid artırıcı faktöre
TEMED	Tetrametiletilendiamin
TGF-β1	Transforme edici büyüme faktörü β1
TGS	Tris-Glisin-Sodyum dodesil sülfat
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UDP-GlcNAc	Üridin difosfat N-asetilglukozamin

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa

Formüller

BH₂	7,8-dihidrobiopterin
BH₄	Tetrahidrobiopteridin
Ca²⁺	Kalsiyum iyonu
C₄H₁₁NO₃	Tris-baz
HCl	Hidroklorik asit
K⁺	Potasyum iyonu
MgCl₂	Magnezyum klorür
NaCl	Sodyum klorür
NAF	Sodyum florür
NaOH	Sodyum hidroksit
Na₃VO₄	Sodyum orthovanadat
O₂⁻	Süperoksit anyonu

ÖZET

Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı İnhibitörü Niklozamid'in Diyabetik Erektıl Disfonksiyonda Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Diyabete bağı erektıl disfonksiyon (ED) diyabetik erkeklerde yaygın görülen bir komplikasyondur. Diyabetik ED patogeneğinde henüz mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış vasküler ve nörolojik süreçler yer alır. Diyabetin diğerkomplikasyonlarında ilişkisi gösterilen Wnt/ β -katenin sinyal yolağının diyabetik ED'de rolü henüz tanımlanamamıştır. Bu çalışmada amacımız bir Wnt/ β -katenin sinyal yolağının diyabetik ED'de rolünü ve bu yolağın inhibitörü olan Niklozamid'in (NZ) diyabetik sıçanlarda erektıl fonksiyon üzerine etkisini araştırmaktır.

Erkek Sprague-Dawley sıçanlara (8-10 haftalık) tek doz streptozosin (75 mg/kg) intraperitoneal (i.p) uygulanarak tip 1 diyabet modeli oluşturuldu. 8 hafta sonra, diyabetik ve nondiyabetik sıçanlara 4 hafta taşıyıcı, NZ (10 mg/kg), NZ (25 mg/kg) veya XAV939 (Wnt sinyali inhibitörü, 1 mg/kg) i.p olarak uygulandı. 12. haftada kavernoöz sinir elektriksel stimülasyonu ile intrakavernoözal basınç (İKKB) ölçümü yapıldı, maksimum İKB/Ortalama Arteriyel Kan Basıncı (mİKB/OAB) ve total İKB/OAB oranları hesaplandı. Western blot yöntemi ile penis ve majör pelvik gangiyonda (MPG) aktif β -katenin, fosforile GSK3 β ve DKK1, peniste fibronektin ve MPG'de prokaspaz-3 ekspresyonları değerlendirildi.

Diyabetik+Taşıyıcı grubunda mİKB/OAB ve total İKB/OAB oranları anlamlı azaldı. NZ (10 mg/kg) tedavisi ise diyabete bağı düşüşü azalttı. Diyabetik+Taşıyıcı grubu Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında peniste aktif β -katenin ve fosforile GSK3 β ekspresyonları azalırken, MPG'de değişiklik gözlenmedi. NZ ve XAV939 tedavileri ekspresyon düzeyinde değişikliğe neden olmadı. Diyabetik+Taşıyıcı grubunda penil dokuda fibronektin ekspresyonu arttı, NZ (10 mg/kg) tedavisi bu artışı azalttı. MPG'de prokaspaz-3 ekspresyonları gruplar arası fark göstermedi.

Çalışmamızın sonuçlarına göre; diyabette sıçan penis dokusunda Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibe olmaktadır ve 10 mg/kg dozda NZ, bu yolaktan bağımsız antifibrotik etkisiyle diyabetik sıçanlarda erektıl fonksiyonu iyileştirmektedir.

Anahtar Sözcükler: Erektıl disfonksiyon, İntrakavernoözal basınç, Majör pelvik ganliyon, Niklozamid, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı

ABSTRACT

The Investigation of the Protective Effect of Wnt/ β -catenin Signal Pathway Inhibitor Niclosamide on Diabetic Erectile Dysfunction

Diabetes-induced erectile dysfunction (ED) is a common complication in diabetic men. The pathogenesis of diabetic ED involves vascular and neurological factors and their mechanisms have not yet completely elucidated. Wnt/ β -catenin signaling pathway has been implicated in some complications of diabetes, but the role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in diabetic ED has not yet been identified. The aim of this study was to investigate the role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in diabetic ED and the effect of niclosamide (NZ), an inhibitor of this pathway, on erectile function in diabetic rats.

Type 1 diabetes was induced in male Sprague–Dawley rats (8-10 weeks old) by streptozotocin (75 mg/kg, intraperitoneally). After 8 weeks, diabetic and nondiabetic rats were treated with NZ (10 mg/kg), NZ (25 mg/kg), XAV939 (Wnt signaling inhibitor, 1 mg/kg) or vehicle for 4 weeks. All drugs were administered intraperitoneally. At week 12, intracavernous pressure (ICP) was measured, maximum ICP/mean arterial blood pressure (mICP/MAP) and total ICP/MAP ratios were calculated. Expression levels of active β -catenin, p-GSK3 β , DKK1, fibronectin and procaspase-3 in penis and/or major pelvic ganglia (MPG) were evaluated by western blot.

A significant reduction was observed in mICP/MAP and total ICP/MAP values in vehicle-treated diabetic rats, which was prevented by the treatment with NZ (10 mg/kg). In vehicle treated diabetic rats, active β -catenin and p-GSK3 β expressions were decreased in the penis, while no change was observed in MPG. NZ or XAV939 did not cause any change in expression level. Fibronectin expression was increased in diabetic rat penis, which was decreased by the treatment with NZ (10 mg/kg). Procaspase-3 expressions in MPG did not differ among groups.

To our results, Wnt/ β -catenin signaling pathway was inhibited in diabetic rat penis and treatment with NZ at 10 mg/kg improves erectile function in diabetic rats possibly by its antifibrotic effect through Wnt/ β -catenin-independent pathways.

Keywords: Erectile dysfunction, Intracavernous pressure, Major pelvic ganglion, Niclosamide, Wnt/ β -catenin signaling pathway

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Diabetes Mellitus (diyabet), günümüzde en yaygın kronik metabolik hastalıklardan biridir. Dünya genelinde diyabet prevalansı giderek artmaktadır. Başlıca tip 1 ve tip 2 diyabet olarak sınıflandırılan olguların büyük bir çoğunluğunu (%90-95) tip 2 diyabet oluşturmaktadır (1). Hastanın yaşam kalitesini olumsuz etkileyen, morbidite ve mortalite riskini artıran ve sağlık harcamalarında ciddi artışa yol açan diyabetik mikro ve makrovasküler komplikasyonlar nedeniyle diyabet önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır (2). Diyabetik erkeklerde erektil disfonksiyon (ED) oldukça sık görülen ve yaşam kalitesini olumsuz etkileyen önemli komplikasyonlardan biridir (3). Diyabetik ED patogeneğinde, otonomik nöropati ve vasküler endotelial hasara bağlı olarak gelişen nitrik oksit (NO) etkinliğindeki azalmanın ve kavernoöz dokudaki fibrotik süreçlerin önemli rol oynadığı bilinmekle beraber bu süreçlerin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır ve etkili tedavi kısıtlıdır (3,4). Wnt/ β -katenin sinyal yolağı, embriyonik gelişim ve yetişkin doku homeostazisinde hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının regülasyonunda önemli rol oynar. Son yıllarda yapılan çalışmalar bazı kanser türlerinde bu yolak aktivitesinin arttığını göstermekte ve yolağı inhibe eden birtakım maddeler anikanser aktivite için taranmaktadır (5). Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivitesindeki anomaliliklerin diyabetik retinopati, nefropati, kardiyomiyopati ve osteopeni gibi komplikasyonların gelişimine aracılık ettiğini gösteren deneysel çalışmalar bulunmaktadır. Ancak, diyabetik ED ile Wnt/ β -katenin sinyal yolağı arasındaki ilişki henüz tanımlanamamıştır (6-9).

İlaç keşfi oldukça uzun ve yüksek maliyetli bir süreçtir. Bir ilacın piyasaya çıkması ortalama 10-15 yıl gerektirmektedir. Bu nedenle son yıllarda ilaç araştırma ve geliştirme çalışmaları, ilaçta yeniden konumlandırma (*drug repositioning*) stratejisi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu stratejik yaklaşımda, klinikte kullanılan bir ilaç başka yeni bir endikasyon için değerlendirilmektedir. Böylece, mevcut güvenlik verileri nedeniyle ilaç geliştirmeye süreci önemli ölçüde kısaltmakta ve maliyet düşmektedir (10). Wnt/ β -katenin sinyal yolağının bazı kanser türlerinde rolünün aydınlatılması ve son yıllarda çeşitli non-steroidal antiinflatuvar ve antiparazit ilaçların bu yolağı inhibe ettiğinin gösterilmesi, bu ilaçların ilaçta yeniden konumlandırma kapsamında antikanser aktivitelerinin araştırılmasına yol açmıştır. Antihelmintik ucuz bir ilaç olan Niklozamid'in (NZ) in vitro ve in vivo birçok çalışmada Wnt/ β -katenin yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir (11).

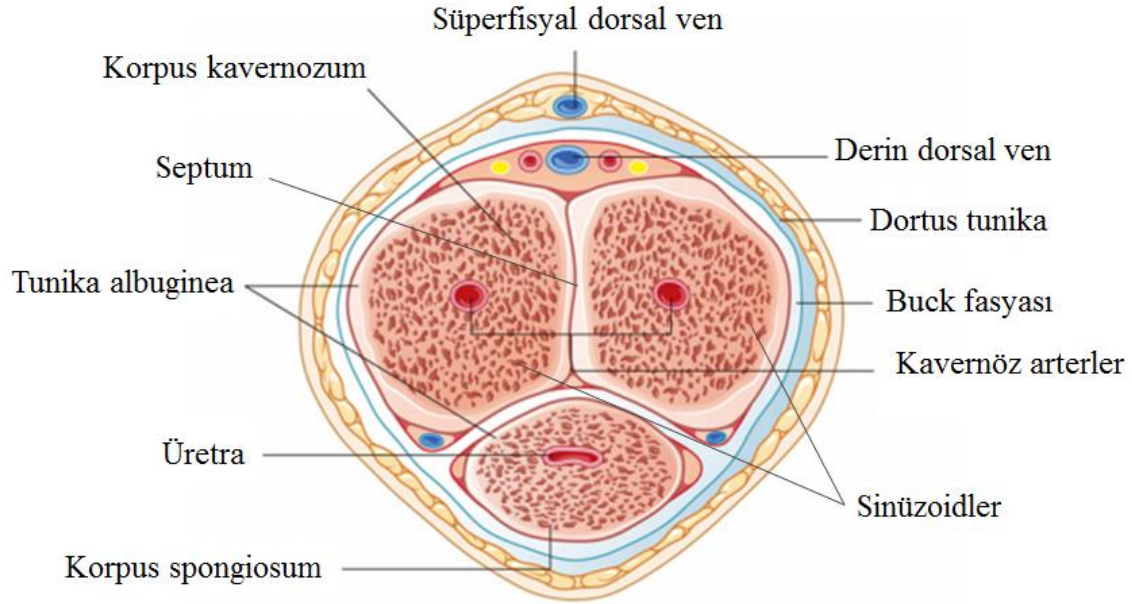
Yukarıda verilen bilgiler ışığında bu tez çalışmasının amacı, sıçanlarda streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik ED modelinde klinikte kullanılan ucuz bir ilaç olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibitörü NZ'nin ve bu yolağın deneysel selektif inhibitörü XAV939'un etkisini fonksiyonel ve moleküler olarak araştırmaktır. Bu kapsamda a-) in vivo intrakavernozal basınç (İKKB) ölçümü yöntemi ile sıçanların erektil fonksiyonunun değerlendirilmesi ve b-) western blot yöntemi ile majör pelvik gangliyon (MPG) ve penis dokularında Wnt/ β -katenin sinyal yolağında yer alan aktif β -katenin, fosforile glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β) ve Dickkopf 1(DKK1) proteinlerinin ekspresyonları ile peniste fibröz protein fibronektin ve MPG'de apoptoz belirteci prokaspaz-3 protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



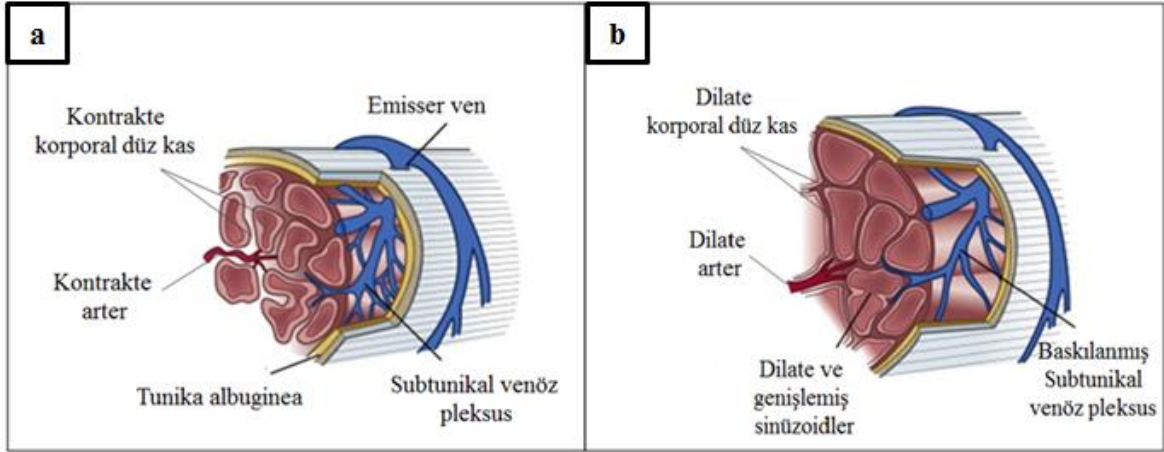
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Penil Ereksiyon Fizyolojisi

Penil ereksiyon santral ve periferik sinir sistemi ile penil düz kas sisteminin etkileşimi sonucu meydana gelen karmaşık nörovasküler bir olaydır. Ereksiyona korporal düz kası oluşturan korpus kavernozum ile kavernöz arterler ve sinüzoidleri çevreleyen endotelyum aracılık eder (Şekil 1). Penil ereksiyonun başlaması, idamesi ve son bulması intrakavernöz kan akımı ile ilişkilidir (12). Kavernöz arterler kanı pudental arterden kavernöz dokuya taşıırken, tunica albuginea tabakası boyunca seyreden emisser venler ise kanı penisten uzaklaştıran venöz pleksusa katkıda bulunur (12, 13). Penil düz kaslar kontrakte iken penis gevşek durumdadır. Cinsel uyarı durumunda arterlerde ve sinüzoidlerdeki gevşeme korpus kavernozumda kan akımının ve basıncın artmasına yol açar. Kan ile dolan dilate sinüzoidler ile rijit tunika albuginea tabakası arasında mekanik kompresyona uğrayan emisser venlerde akım yavaşlar, kan sinüzoidlerde hapsolür ve böylece penis erekte hale gelir, iskiokavernöz kasının kasılması ile rijit ereksiyon meydana gelir (Şekil 2) (14).



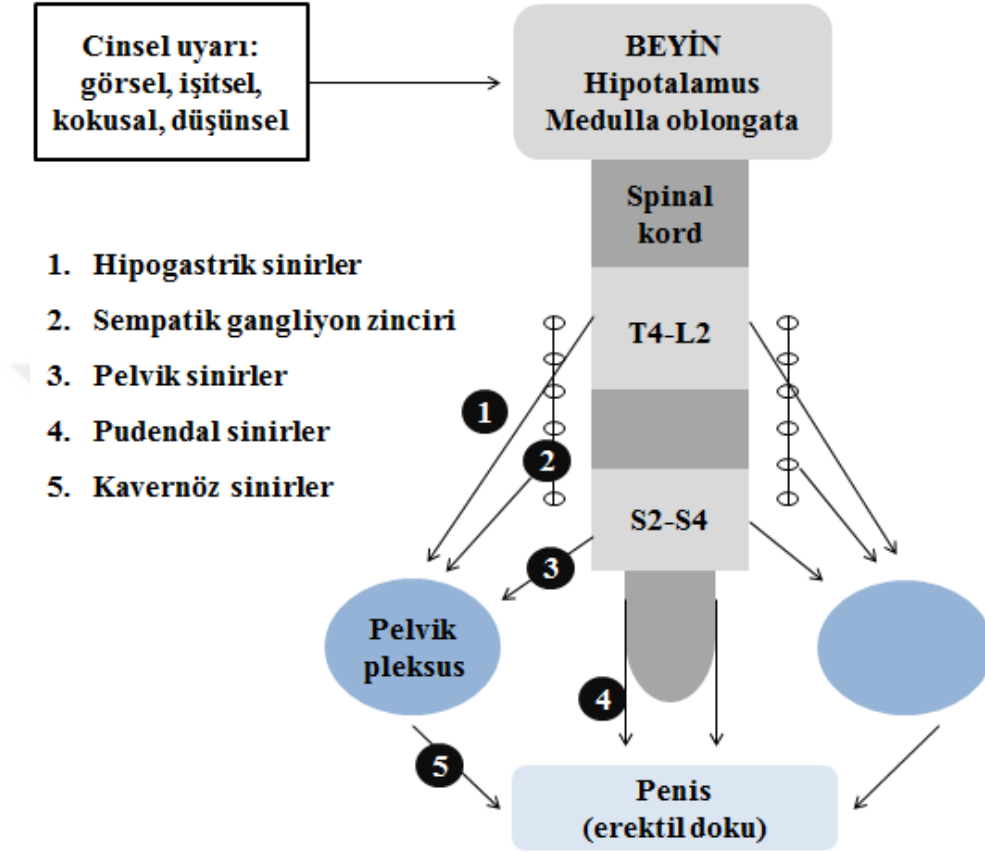
Şekil 1. İnsan penisinin enine kesitinde anatomik yapıların yerleşimi (Suh'tan, 15)



Şekil 2. Ereksiyona aracılık eden yapıların (a) gevşek ve (b) erekte penisteki durumları (Keegan'dan, 16)

Korporal tonus ve buna bağlı erektil fonksiyon nöronal (santral ve periferik) ve düz kas düzeyinde çok sayıda mekanizmalar ve sinyal ileti molekülleri tarafından düzenlenmektedir. Ereksiyonu düzenleyen santral mekanizmalar son derece karmaşıktır ve tam olarak aydınlatılamamıştır (17). Medial preoptik alan ve paraventriküler nükleustaki hipotalamik nöronların görsel, işitsel, kokusal ve düşünsel cinsel uyarıların koordinasyonunda görev aldığı düşünülmektedir. Bu nöronların dopamin ve oksitosinle uyarılması ereksiyonla sonuçlanmaktadır. Paraventriküler oksitosinerjik nöronlar ve NO arasındaki etkileşim ereksiyonun santral regülasyonunda ana mekanizmayı oluşturur (14, 18). Dopamin santral düzeyde etki gösteren diğer önemli proerektil nörotransmitterdir. G-proteini ile kenetli beş farklı reseptörü bulunan dopamin, davranışsal etkilerinin pek çoğunu D2 reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir. Apomorfine, levodopa ve bromokriptin gibi dopaminerjik ajanlar ile tedavi edilen hastalarda artmış libido ve ereksiyonların raporlanması dopaminerjik aşırımın cinsel fonksiyondaki önemini göstermektedir (19). Diğer önemli santral eksitator mekanizma melanokortin sistemidir. Ön beyin ve spinal korddaki melanokortin reseptörlerinin uyarılması ile sıçanlarda ve insanlarda ereksiyonun indüklendiği gözlenmiştir (20, 21). Opioid peptidler, γ -aminobütirik asit (GABA) ve serotonin ise inhibitör santral mekanizmalara aracılık etmektedir (22). Erektile fonksiyonun periferik kontrolünde penisteki vasküler süreçleri etkileyen nöronal ve lokal faktörler görev alır (22). Penis hem otonomik (sempatik ve parasempatik) hem de somatik inervasyona sahiptir. Penisin bölümleri temel olarak spinal kordun sakral segmentinden (S2-S4) başlayan ve primer duyuşsal ve motor lifler içeren pudendal sinirler ile pelvik pleksustan

çıkan sempatik, parasempatik ve nonadrenerjik nonkolinerjik (NANC) lifleri içeren kavernöz sinirler ile inerve edilir (Şekil 3) (17, 23).



Şekil 3. İnsan penisinin nöronal kontrolü (Argiolas'tan, 23)

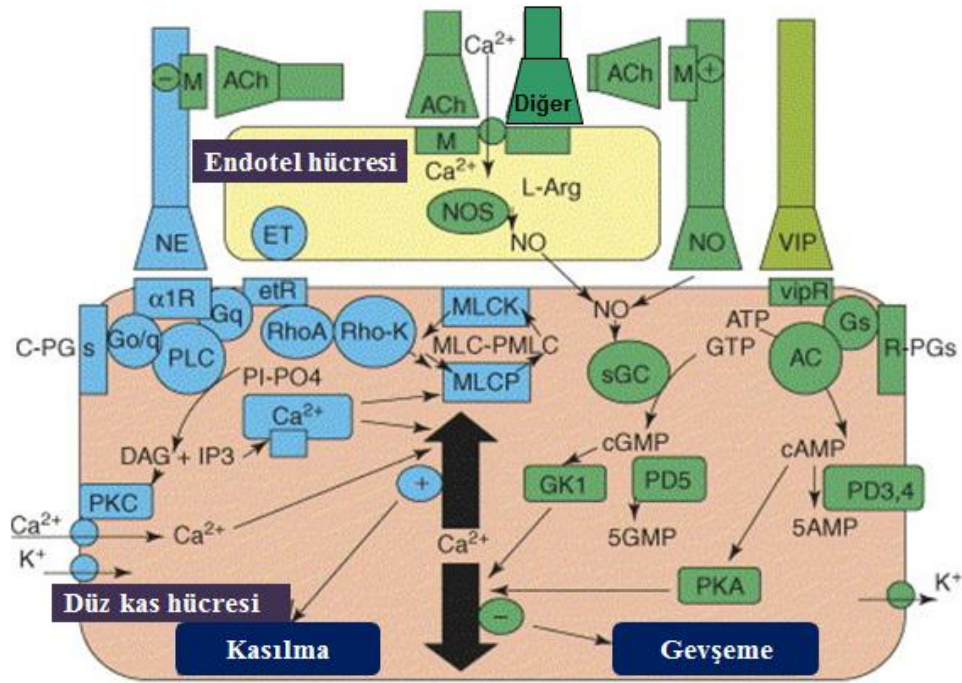
Adrenerjik, kolinerjik, NANC sinir uçlarından salıverilen nörotransmitterler vasküler endotelyum ve korporal düz kası etkileyerek penil tonusu ve böylece ereksiyonu modüle ederler. Sempatik sinir uçlarından salıverilen noradrenalin (NA) aracılı bazal sempatik tonus ereksiyonu inhibe ederken, parasempatik ve NANC sinir uçlarından salıverilen asetilkolin (ACh) ve NO ise ereksiyonu stimüle eder (17).

Cinsel uyarının olmadığı koşullarda NA aracılı sempatik tonusun etkisiyle kavernöz düz kas kontrakte haldedir (24). NA, korporal ve vasküler düz kas hücrelerinde bulunan Go/q proteini ile kenetli $\alpha 1$ adrenerjik reseptörlere bağlanır ve Fosfolipaz C'yi aktive ederek inozitol trifosfat ve diaçilgliserol oluşumuna neden olur. İnozitol trifosfat hücre içi depolardan kalsiyum (Ca^{2+}) salımına aracılık ederken, diaçilgliserol protein kinaz C'yi

aktive ederek hücre içi serbest Ca^{2+} düzeyini artırır ve böylece kontraksiyon meydana gelir (17). Endotelin, (ET) korporal düz kasta kontraksiyona yol açan önemli peptid mediyatördür. ET-1, penil dokudaki kontraksiyonda ET-2 ve ET-3'ten daha potenttir. Tromboksan A_2 ve Prostaglandin $F_{2\alpha}$ gibi vasküler endotelyumdan salıverilen kontraktıl prostaglandinler penil tonusu artırırılar (17, 23). ET'lerin endotelin reseptörlerine bağlanması ile aktive olan Rho A-Rho kinaz sistemi kontraktıl uyarıya aracılık eder. Rho kinaz düz kas kontraksiyonunda rol oynayan bir serin (Ser)-treonin kinazdır. Rho kinaz aktivasyonu miyozin hafif zincir kinazı fosfatazı inhibe ederek miyozin hafif zincirlerinin fosforile kalmasına neden olur ve böylece kontraksiyondan sorumlu aktin-miyozin kompleksini stabilize eder (25, 26).

Cinsel uyarı ile parasempatik ve NANC sinir uçlarından salıverilen ACh ve NO en önemli proerektil faktörlerdir. NO, ayrıca arterlerin ve korporal sinüzoidlerin endotelyum tabakalarından ACh aracılığıyla da salıverilir. NO, NO sentaz (NOS) tarafından katalize edilen L-arjininin L-sitrüline dönüşüm reaksiyonu sırasında açığa çıkar (17). Sinir uçlarındaki NO sentezinde nöronal NOS (nNOS), penil vasküler ve sinüzoidal endotelyum tabakalarındaki NO sentezinde ise endotel NOS (eNOS) izoformları görev alır. NO, kavernoöz düz kas hücrelerinde çözünebilir guanilat siklazı uyararak hücre içi siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyini artırır ve cGMP-bağımlı protein kinaz G1'i (GK1) aktive eder. GK1 hücre içi Ca^{2+} düzeyini regüle eden çeşitli Ca^{2+} ve potasyum (K^+) kanallarını, iyon pompalarını ve enzimleri fosforile ederek hücre içi serbest Ca^{2+} düzeyinde azalmaya neden olur, düz kasta gevşeme ve böylece penil ereksiyon meydana gelir. cGMP fosfodiesteraz (PDE) enzimleri tarafından 5'-GMP'ye dönüştürülür ve etkinlikleri sonlandırılır. PDE tip 5 (PDE5) cGMP'nin hidrolizini katalizleyen penil dokuda en yaygın bulunan izoformdur (23, 27, 28). Parasempatik sinir uçlarından salıverilen ACh ise penil vasküler ve sinüzoidal endotelyumdan NO salınımını uyararak ve sempatik sinir uçlarından NA salınımını azaltarak gevşemeye yol açar (17). ACh düz kas endotel hücrelerindeki muskarinik reseptörleri uyararak hücre içi Ca^{2+} düzeyini artırır. Bu durum eNOS aktivasyonuna ve böylece NO oluşumuna neden olur. NO, endotel hücrelerinden düz kasta difüze olarak etkilerini başlatır ve gevşeme oluşturur (23). Ayrıca ACh dışında artan kan akımı nedeniyle oluşan akım kuvveti (*shear stress*) de eNOS aktivasyonuna yol açarak NO oluşumuna aracılık eder. Hipotetik olarak nNOS ile sentezlenen NO'nun ereksiyonun başlangıcından, akım kuvveti aracılığıyla eNOS ile sentezlenen NO'nun ise ereksiyon boyunca penil rijiditenin idamesinden sorumlu olduğu

düşünülmektedir (29). Vazoaktif intestinal polipeptid, kalsitonin geni ile ilişkili peptid gibi parasemtaik sinir uçlarından salıverilen peptitler ve prostaglandin E₁ (PGE₁) ve E₂ gibi endotelyumdan salıverilen gevşetici prostaglandinler de proerektel faktörler arasındadır (17, 23). Vazoaktif intestinal polipeptid ve gevşetici prostaglandinler kavernoöz düz kas hücrelerindeki stimülatör G proteini ile kenetli reseptörlerine bağlanarak adenilat siklazı aktive ederler, böylece hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeyi artar. cAMP, protein kinaz A'yı aktive ederek hücre içi serbest Ca²⁺ düzeyini azaltır ve ereksiyona yol açar. cAMP, PDE tip 3 ve 4 enzimleri ile hidrolize uğrar (Şekil 4) (23).



Şekil 4. Kavernoöz düz kas tonusunu düzenleyen lokal mekanizmalar (Argiolas'tan, 23). AC, adenilat siklaz; ACh, asetilkolin, ATP, adenozin trifosfat; cAMP, siklik adenozin monofosfat; C-PGs, kasıcı prostaglandinler, DAG, diaçilgliserol; ET, endotelin; etR, endotelin reseptörleri; GK1, cGMP-bağımlı protein kinaz G1; Gs, stimülatör G proteini; GTP, guanozin trifosfat; IP₃, inozitol trifosfat; L-Arg, L-arjinin; M, muskarinik reseptörleri, MLC, miyozin hafif zincirleri; MLCK, miyozin hafif zincir kinaz; MLCP, miyozin hafif zincir fosfataz; NE=NA, noradrenalin; NO, nitrik oksit; NOS, nitrik oksit sentaz; PD3,4=PDE3,4, fosfodiesteraz tip 3 ve 4; PD5=PDE5, fosfodiesteraz tip 5; PKA, protein kinaz A; PKC, protein kinaz C; PLC, fosfolipaz C; PMLC, fosforile MLC; Rho-K, Rho kinaz; R-PGs, gevşetici prostaglandinler; sGC, çözünebilir guanilat siklaz; VIP, vazoaktif intestinal peptid; vipR, VIP reseptörleri; α1R, adrenerjik alfa-1 reseptörleri.

Eretil fonksiyonun düzenlenmesinde santral ve periferik düzeyde rol oynayan bu mekanizmalardaki bozukluklar ED'ye yol açmaktadır.

2.2. Diyabetik ED

Tatmin edici cinsel ilişki için yeterli ereksiyonu başlatma ve/veya sürdürmede kalıcı yetersizlik olarak tanımlanan (ED), erkeklerde en sık görülen cinsel fonksiyon bozukluklarından biridir (30, 31). Günümüzde dünya genelinde yaklaşık 152 milyon erkekte ED görüldüğü ve bu sayının 2025 yılına kadar 322 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (32). ED prevalansı yaş ile birlikte artmaktadır. Prevalans 40 yaş altı erkeklerde %1-10, 40-49 yaş arası erkeklerde %2-9, 60-69 yaş arası erkeklerde %20-40 ve 70 yaş ve üzeri erkeklerde ise %50-100 arasında değişmektedir (33). Türkiye'de yapılan bir çalışmada 40-70 yaş arası erkeklerde ED prevalansı %69.2 olarak saptanmıştır (34). ED patofizyolojisinde psikolojik, endokrin, vasküler ve nörolojik faktörler yer alır. ED etiyojisine göre psikojenik, organik (nörojenik, hormonal, arteriyel, kavernoza faktörler ve ilaç kullanımı) ve karma (psikojenik ve organik) tip olarak ayrılır ve olguların yaklaşık %80'i organik kökenlidir (33, 35).

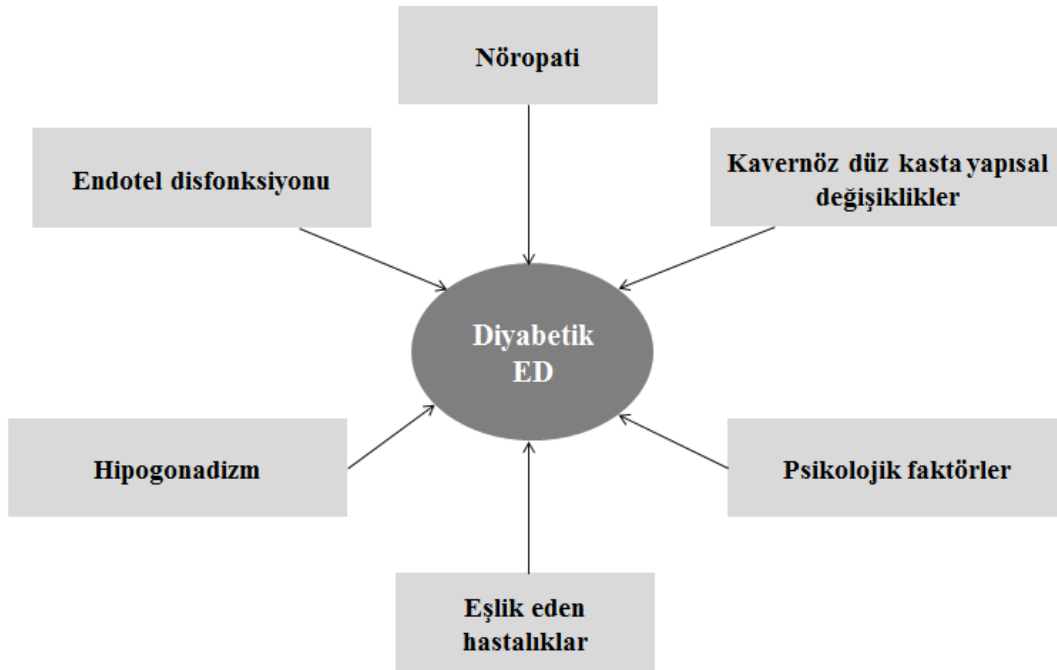
Diyabet, insülin sekresyonunda ve/veya insülin etkisindeki bozukluk nedeniyle gelişen kronik hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Başlıca üç tip diyabet bulunmaktadır: Tip 1 diyabet, immün ve idiyopatik nedenlere bağlı olarak gelişen mutlak insülin yetmezliği ile ilişkilidir ve tedavisinde insülin replasman tedavisi gereklidir. Tip 2 diyabet ise kısmi insülin yetmezliği ile birlikte insülin direnci ile karakterizedir. Tip 2 diyabet tedavisinde temel olarak oral antidiyabetik ilaçlar kullanılır ancak bazı durumlarda insülin tedavisi de gerekli olabilir (36, 37). Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun (IDF) verilerine göre, 2019 yılında 20-79 yaş arası popülasyonda diyabet hastası sayısı 463 milyon iken, bu sayının 2045 yılında 700 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (38). Olguların yaklaşık %90'ını tip 2 diyabet oluşturmaktadır. 2019 yılında 20-79 yaş aralığında gerçekleşen dört milyon ölüm diyabetle ilişkilidir ve diyabet dünyada ilk on ölüm nedeni arasında yer almaktadır (36, 38). IDF verilerine göre Türkiye, 2019 yılında 6 milyon 600 bin diyabet hastası ile Avrupa bölgesinde Rusya ve Almanya'nın ardından üçüncü sıradadır ve 2045 yılında ise bu sayının 10.4 milyona ulaşacağı ve Türkiye'nin diyabet hasta sayısı açısından dünyada onuncu sırada yer alacağı öngörülmektedir (38). Yetersiz glisemik kontrol ile seyreden diyabet, önemli morbidite ve moratilitite nedeni olan

mikrovasküler (nöropati, nefropati ve retinopati) ve makrovasküler (kardiyovasküler hastalıklar, inme ve periferik arter hastalığı) komplikasyonlara neden olmaktadır (39).

Nöronal, endokrin ve vasküler değişikliklere neden olan diyabet, ED için önemli bir risk faktörüdür. ED, diyabetik erkeklerde yaşam kalitesini olumsuz etkileyen yaygın bir komplikasyondur (40). Diyabetik erkeklerde ED prevalansı %35-75 arasında değişmektedir ve diyabetik erkeklerde ED gelişme riski, diyabet olmayanlara göre 2-3 kat daha fazladır. Diyabetik erkeklerde ED normal popülasyona göre 10-15 yıl daha erken ortaya çıkmaktadır (41).

2.2.1. Patofizyoloji

Diyabetik ED patofizyolojisi nörojenik, endokrin ve vasküler mekanizmaları içeren oldukça karmaşık süreçleri kapsamaktadır (Şekil 5) (42).



Şekil 5. Diyabetik ED patofizyolojisi

2.2.1.1. Psikolojik Faktörler

Stres, depresyon, performans anksiyetesi ve obsesif-kompulsif bozukluk ED gelişimine yol açan psikolojik faktörlerdir (41). Diyabet hastalarında depresyon riski normal popülasyona göre 2 kat daha fazladır. ED kişinin öz saygısını ve sosyal ilişkilerini

olumsuz yönde etkilediğinden, mevcut depresif semptomların daha da kötüleşmesine neden olabilmektedir (42). Depresyon, stres ve anksiyete durumlarındaki aşırı sempatik deşarj ereksiyonu inhibe ederek ED gelişimine aracılık etmektedir (43).

2.2.1.2. Eşlik Eden Hastalıklar

Hiperlipidemi, hipertansiyon ve obezite ED için önemli risk faktörleridir ve yaygın olarak diyabete eşlik etmektedirler (42). Ayrıca spinal kord hasarı, multiple skleroz, prostatektomi başta olmak üzere bazı cerrahi girişimler ve pelvik radyoterapi gibi sinir sistemini etkileyen durumlar da ED'ye neden olabilmektedir (41).

ED olgularının yaklaşık %25'i ilaç kaynaklıdır (44). Diyabetik hastalarda eşlik eden kardiyovasküler ve psikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılan antihipertansif ve psikotropik ilaçlar, ED'ye neden olan ilaç gruplarının başında gelmektedirler. Selektif serotonin geri alım inhibitörleri, venlafaksin, benzodiyazepinler, risperidon, olanzapin gibi santral sinir sistemi ilaçları ile tiyazid diüretikler ve beta blokörler gibi antihipertansif ilaçlar erektil fonksiyonu olumsuz etkilemektedir (33, 42).

2.2.1.3. Hipogonadizm

Testosteron başta olmak üzere andojenler, cinsel istek ve noktürnal ereksiyon oluşumunda önemlidir (33). Androjenlerin ereksiyon fizyolojisinde yer alan NOS ve PDE5 enzimlerinin ekspresyon ve aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynadıkları gösterilmiştir (45). Çok sayıda epidemiyolojik çalışmada androjen eksikliği veya hipogonadizmin osteoporoz, dislipidemi, diyabet, metabolik sendrom, depresyon ve cinsel işlev bozuklukları ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (35).

Hipogonadizm, metabolik sendrom ve tip 2 diyabette yaygındır. Düşük serum testosteron düzeyinin glisemik kontrolü olumsuz etkilediği ve ED'yi kötüleştirdiği bildirilmiştir (42). Tip 2 diyabetli erkeklerde total ve serbest serum testosteron düzeyleri göreceli olarak düşük bulunmuştur (41). Bu durumun nedeni tam olarak aydınlatılamamış olsa da plazma seks hormonu bağlayıcı globülin düzeyindeki azalmanın ve viseral adipoz dokuda artan aromataz aktivitesi ile testosteronun östradiole dönüşümündeki artışın diyabette görülen hipogonadizme aracılık ettiği düşünülmektedir (42).

2.2.1.4. Kavernoöz Düz Kasta Yapısal Değişiklikler

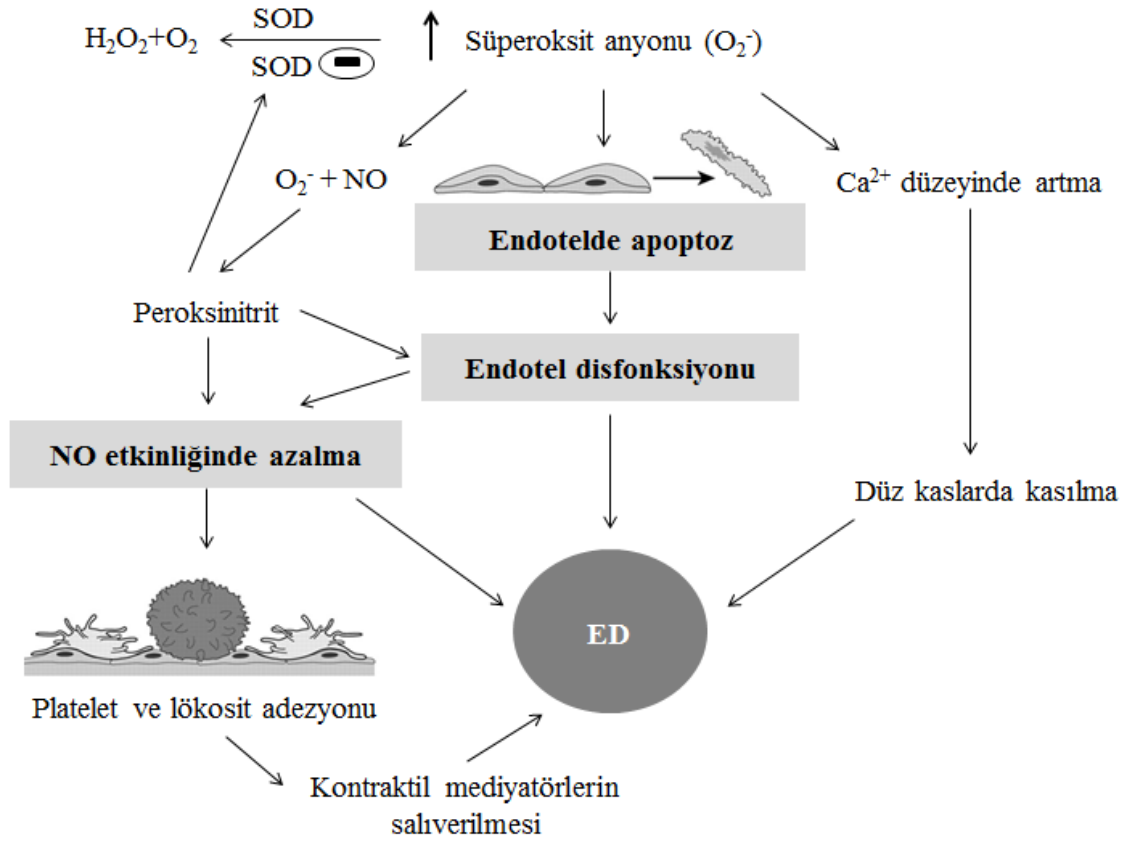
Penil dokuda düz kas hücre kaybı ve fibrozis diyabetik ED patofizyolojisinde önemlidir. Diyabette vasküler ve nöronal hasar sonucu korpus kavernozumun nitretrjik

gevşeme yanıtındaki azalma ile kan akımı yavaşlar ve kronik kavernozaal hipoksi gelişir (46). Hipoksi ile aktive olan transforme edici büyüme faktörü β -1 (TGF- β 1)/Smad yolağı kolajen, fibronektin gibi fibröz proteinler içeren ekstraselüler matriks birikimine, PGE₁ ve cAMP düzeylerinde azalmaya neden olur ve sonuç olarak fibrozis gelişir (47, 48). Düz kas hücre sayısında azalma, kolajen içeriğinde artma, bazal laminada kalınlaşma ve endotel hücre sayısında azalma diyabete bağı olarak gelişen ve ED'ye aracılık eden önemli yapısal değişikliklerdir (43).

2.2.1.5. Endotel Disfonksiyonu

Diyabetik hastalarda ve deneysel diyabetik hayvan modellerinde kavernoza dokunun ACh ve NO gevşeme yanıtında azalma meydana gelmektedir (49, 50). NO etkinliğindeki bu azalma eNOS ekspresyon ve aktivitesindeki değişiklikler, artan NO yıkımı, NOS kenetsizlenmesi, endojen NOS inhibitörü asimetrik dimetiltarjinin düzeyindeki artış gibi mekanizmalarla ilişkilendirilmektedir (49).

Hiperglisemi nedeniyle artan oksidatif stres, diyabette endotel disfonksiyonuna aracılık eden pek çok mekanizmayı aktive eder (49). Süperoksit anyonu (O₂⁻), NO ile reaksiyona girer ve peroksinitrit radikalının oluşumuna neden olur. Peroksinitrit, süperoksit anyonunu temizleyen süperoksit dismutaz enzimini inhibe ederek oksidatif strese katkıda bulunur (50). Artan oksidatif stres, endotelde apoptotik mekanizmaları aktive ederek endotel hücresi kaybına neden olur ve NO üretimi azalır (51). NO etkinliğindeki azalma platelet ve lökositlerin endotel hücrelerine adezyonuna ve tromboksan A₂, lökotrienler gibi kontraktıl mediyatörlerin salıverilmesine neden olur. Ayrıca O₂⁻, Ca²⁺ mobilizasyonunu etkileyerek doğrudan kontraksiyon oluşturur. Oksidatif strese bağı kavernoza doku ve arterlerdeki kontraksiyon, ED'ye aracılık etmektedir (Şekil 6) (50). Vitamin E, sodyum selenit, melatonin, askorbik asit ve α -lipoik asit gibi antioksidanların deneysel tip 1 ve tip 2 diyabetik hayvan modellerinde, korpus kavernozaumdaki endotel disfonksiyonuna karşı etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (49).

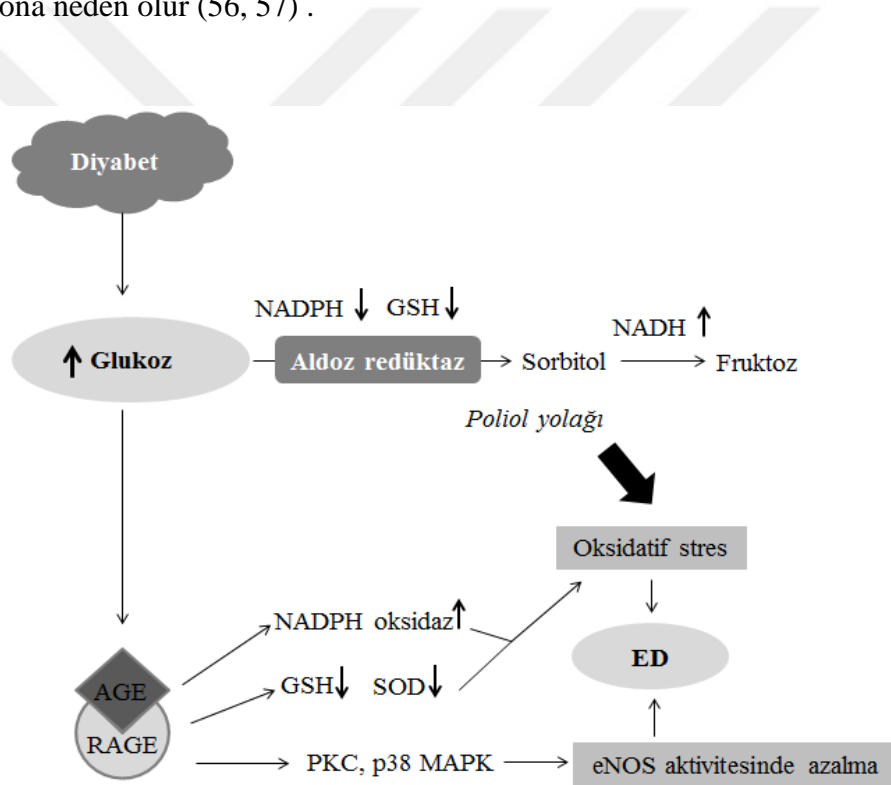


Şekil 6. Diyabetik ED patofizyolojisinde oksidatif stres (Agarwal'dan, 50). ED, erektil disfonksiyon; NO, nitrik oksit; SOD, süperoksit dismutaz.

Hiperglisemi ile aktive olan ve oksidatif strese aracılık eden diyabete özgü yollardan biri polioliol yolağıdır (Şekil 7) (52). Aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri polioliol yolağı ile glukozun metabolizmasında rol oynar. Aldoz redüktaz nikotinamid adenin dinükleotit fosfatı (NADPH) kullanarak glukozu sorbitole indirger, sorbitol dehidrogenaz ise nikotinamid adenin dinükleotid kullanarak sorbitolu fruktoza okside eder. Hiperglisemi durumunda daha fazla glukoz polioliol yolağı ile sorbitole indirgenir ve bu durum NADPH düzeyinde azalmaya neden olur. NADPH düzeyindeki azalma, endojen antioksidan sistemin önemli parçası olan hücresel indirgenmiş glutatyon seviyesini azaltır ve böylece oksidatif strese katkıda bulunur (52, 53). Ayrıca NADPH, NOS'un ko-faktörü olduğundan polioliol yolağı aşırı aktivitesi, NO üretiminde azalmaya da neden olmaktadır (53).

Diyabette endotel disfonksiyonuna aracılık eden mekanizmalardan biri de ileri glikozilasyon son ürünleri (AGE) oluşumudur (Şekil 7). AGE proteinler, lipitler ve nükleik

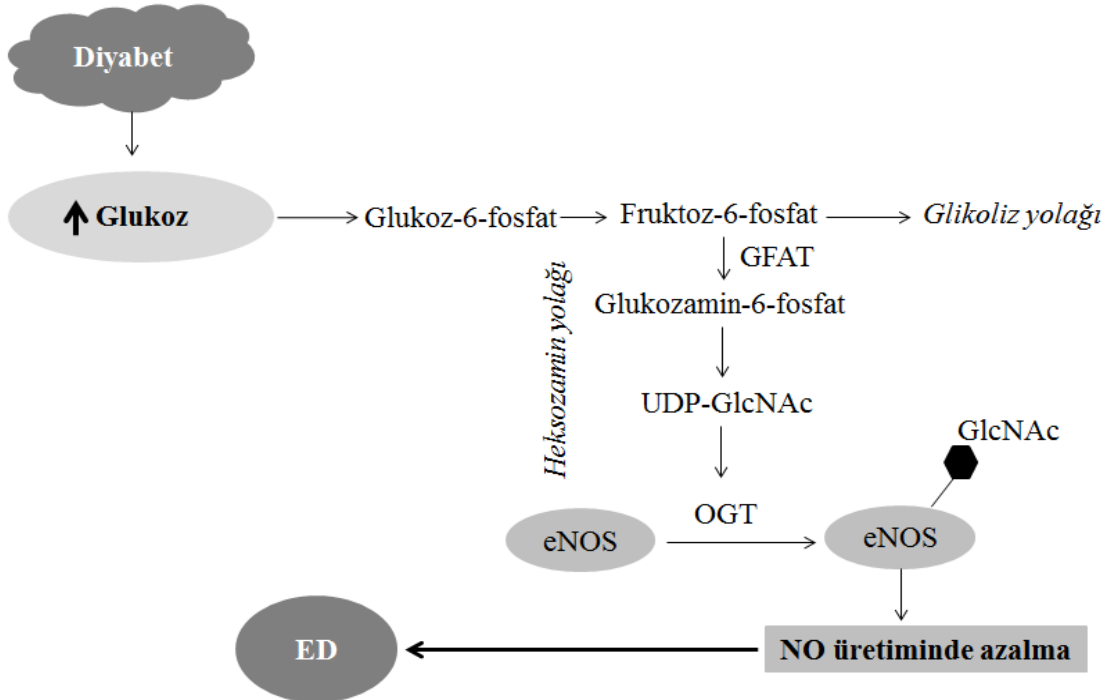
asitlerin enzimatik olmayan glikasyonu sonucu oluşurlar (54). Diyabet durumunda oluşumu ve dokularda birikimi artan AGE'nin, diyabetin vasküler komplikasyonlarının mekanizmasında rol aldığı gösterilmiştir (55). AGE, transmembranal reseptörlerine (RAGE) bağlanarak nükleer faktör κ B, mitojen ile aktive edilen protein kinaz ve NADPH oksidaz gibi oksidatif ve inflamatuvar süreçlere aracılık eden mekanizmaları aktive eder. AGE-RAGE etkileşimi sonucu artan oksidatif stres katalaz ve süperoksit dismutaz etkinliğinde azalma, glutatyon depolarının tükenmesi ve protein kinaz C aktivasyonu ile ilişkilidir. AGE-RAGE sinyal yolağı ile aktive olan protein kinaz C ve p38 mitojen ile aktive edilen protein kinaz eNOS'u fosforile eder, eNOS aktivitesi ve sonuçta NO üretimi azalır. Ayrıca AGE, endotel hücrelerinde ET-1 ekspresyonunu artırarak düz kasta kontraksiyona neden olur (56, 57) .



Şekil 7. Diyabetik ED patofizyolojisinde AGE ve polioliol yolları. AGE, ileri glikozilasyon son ürünleri; GSH, indirgenmiş glutatyon; NADH, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid; NADPH, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat; PKC, protein kinaz C, p38 MAPK, p38 mitojenle aktive edilen protein kinaz; SOD, süperoksit dismutaz.

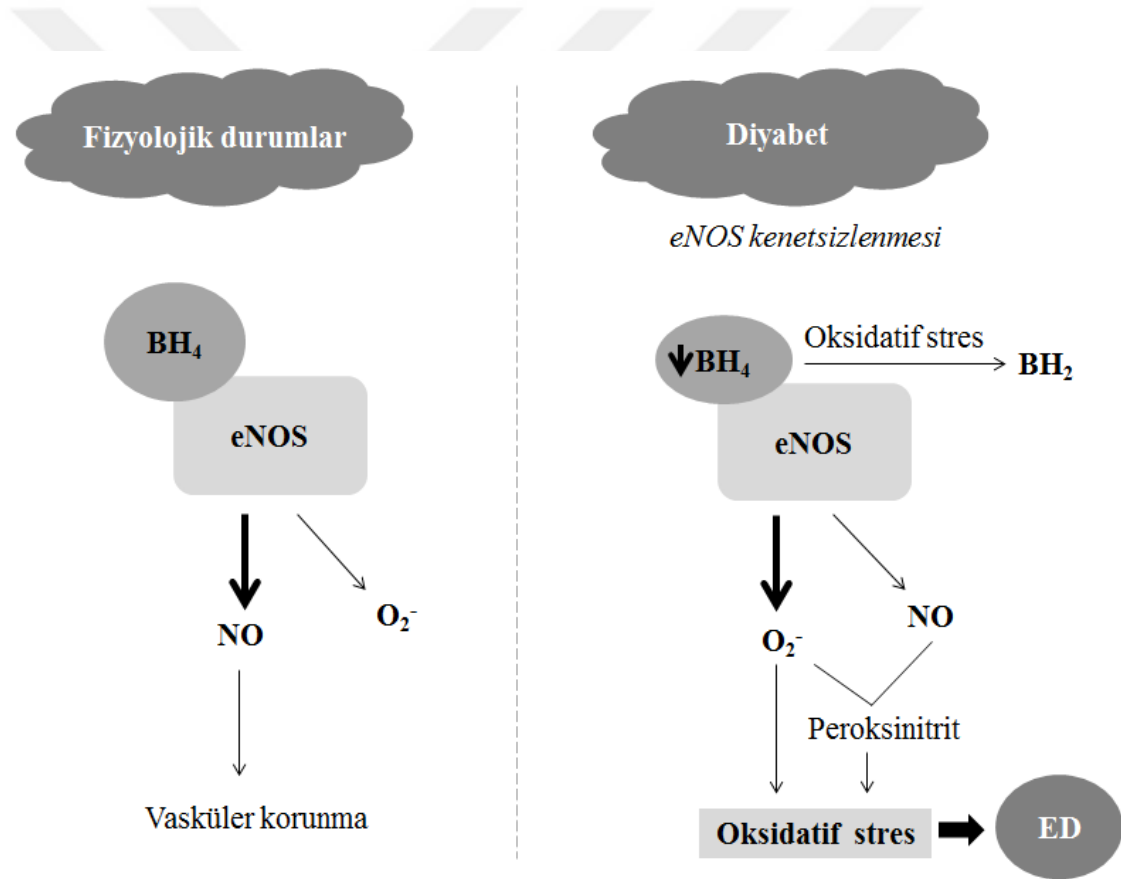
Diyabette endotel disfonksiyonu oluşuma aracılık eden mekanizmalardan bir diğeri hiperglisemi ile aktivitesi artan heksozamin yolağıdır. Normoglisemik koşullarda hücrelerde glukozun büyük bir kısmı glikolize uğrarken, glukozun %1-3'ü ise

heksozamin yolağı ile metabolize edilir (58). Bu yolakta fruktoz-6-fosfat, glutamin:fruktoz-6-fosfat aminotransferaz ile glukozamin-6-fosfata dönüştürülür ve daha sonra üridin difosfat N-asetilglukozamin (UDP-GlcNAc) oluşur. UDP-GlcNAc, O-GlcNAc transferaz ile çeşitli efektör proteinlerin spesifik Ser ve treonin noktalarına eklenir. O-GlcNAc modifikasyonu, proteinlerin aktivitelerini değiştirerek pek çok hücresel olayı etkiler. Hiperglisemi durumunda glutamin:fruktoz-6-fosfat aminotransferaz aktivitesi artar ve daha fazla glukoz heksozamin yolağı ile metabolize edilir (59). O-GlcNAc modifikasyonu eNOS aktivitesini de regüle eder. Diyabetik hasta ve diyabetik hayvanlardan izole edilen çeşitli vasküler yapıların endotel hücrelerinde O-GlcNAc modifikasyonuna uğrayan eNOS'un aktivitesinde azalma tespit edilmiştir (60, 61). Penis dokuda eNOS'un 1177. pozisyonundaki Ser rezidüsünden fosforilasyonu aktiviteyi artırırken, 495. pozisyonundaki treonin rezidüsünden fosforilasyonu ise aktiviteyi azaltmaktadır. Diyabetik sıçan penisinde eNOS'un 1177. pozisyonundaki Ser rezidüsünden O-GlcNAc modifikasyonuna uğradığı ve böylece bu konumdan fosforilasyonunun önlenmesi sonucu aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 8) (49).



Şekil 8. Diyabetik ED patofizyolojisinde heksozamin yolağı. ED, erektil disfonksiyon; eNOS, endotelial nitrik oksit sentaz; GFAT, glutamin:fruktoz-6-fosfat aminotransferaz; GlcNAc, N-asetilglukozamin; OGT, O-GlcNAc transferaz; UDP- GlcNAc, üridin difosfat N-asetilglukozamin.

Tetrahydrobiopteridin (BH_4), eNOS tarafından NO üretimi için gerekli önemli bir kofaktördür. BH_4 , eNOS'un dimerik aktif formunu stabilize eder. Bir alt ünitenin redüktaz kısmından diğer alt ünitenin oksijenaz kısmına elektron akışını kolaylaştırır, L-arjinine afinitesini artırır ve enzimin hem prostetik grubunun aktif redoks formunda kalmasını sağlar. Hiperglisemi durumunda endotel hücrelerinde eNOS'un BH_4 bağlayan bölgesi harabiyete uğrar ve ayrıca oksidatif stres nedeniyle BH_4 , 7,8-dihidrobiopterin'e (BH_2) okside olur. Bu durum aktif dimerik form oluşumunu azaltır. Monomer durumda aktive olan eNOS, NO'dan çok O_2^- üretir ve peroksinitrit oluşumuna aracılık eder. eNOS kenetsizlenmesi ile oluşan nitrozatif ve oksidatif stres endotel fonksiyonunu bozar (Şekil 9) (49, 62).



Şekil 9. Diyabetik ED patofizyolojisinde eNOS kenetsizlenmesi. BH_4 , tetrahydrobiopteridin; BH_2 , 7,8-dihidrobiopterin; ED, erektil disfonksiyon; eNOS, endotelial nitrik oksit sentaz; NO, nitrik oksit.

Diyabette yukardaki mekanizmalarla meydana gelen endotel disfonksiyonu, penil vasküler ve kavernozaal düz kas tonusu regülasyonunda kontraktıl ve relaksan faktörler

arasında dengenin bozulmasına ve görece antierektil mekanizmaların etkinliklerinin artmasına neden olarak ED gelişime aracılık etmektedir.

2.2.1.6. Nöropati

Diyabete bağlı olarak gelişen nöropati, nitretrjik sinirlerde dejenerasyona neden olarak nNOS aktivitesinde ve buna bağlı olarak korpus kavernozum nitretrjik gevşeme yanıtında azalmaya yol açmaktadır (43). Çok sayıda deneysel çalışmada, diyabetik sıçanlardan izole edilen korpus kavernozum düz kasının elektriksel alan stimülasyonu ile indüklenen nitretrjik gevşeme yanıtında azalma gözlenmiştir (63, 64). Poliol yolağı, heksozamin yolağı, AGE oluşumu, protein kinaz C aktivitesindeki artış, oksidatif stres gibi mekanizmalar diyabetik nöropati oluşumunda rol oynamaktadır (65). Ayrıca periferik sinirlere kan desteğı sağlayan vasa nervorum adı verilen küçük çaplı arterlerde meydana gelen diyabetik mikroanjyopati, sinir perfüzyonunun azalmasına ve endonöral hipoksi gelişimine aracılık eder. Hipoksi membran iletkenliğı, aksiyon potansiyeli oluşumu, sinir iletimi ve aksonal taşınmada bozulmalara neden olarak nöronal disfonksiyona katkı sağlar (66).

Diyabetik sıçanlarda penis ve gastrik piloru inerve eden nitretrjik nöronlarda yürütölen çalışmalarda nöronlardaki dejenerasyonun iki fazda gerçekleştiğı gösterilmiştir. Birinci fazda nNOS içeriğinin sinir gövdelerinde değil aksonlarda azaldığı tespit edilmiştir ve bu fazdaki değışiklikler insölin ile tedavi edilebilmiştir. İkinci fazda ise nöronların apoptoza uğradığı ve böylece nNOS içeriğinin tamamen kaybolduğı gösterilmiştir. İkinci fazda insölin tedavisi etkili olamamış, hayvanlar insölin tedavisi ile öglisemik duruma getirildiklerinde bile nitretrjik fonksiyon kaybı devam etmiştir (56). Cellek ve arkadaşları ikinci fazda AGE oluşumu ile indüklenen kaspaz-3 bağımlı apoptotik dejenerasyonun rol oynadığını göstermişlerdir (67). Diyabetle indüklenen oksidatif stresin nöronal apoptoza aracılık ettiğı bilinmektedir (68). Kavernoöz sinir hasarı ile oluşturulan otonomik nöropati modellerinde MPG'de apoptoz ve kaspaz-3 ekspresyon artışı gözlenmiştir (69).

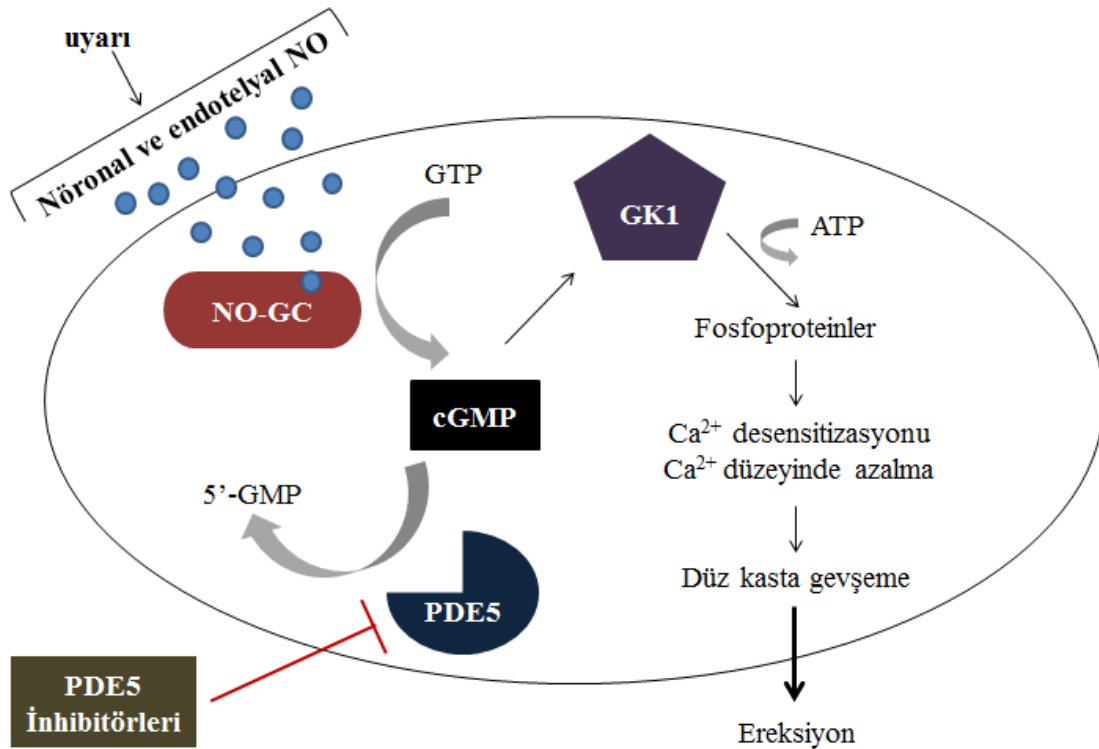
2.2.2. Diyabetik ED Tedavisi

ED farmakoterapisinde çok önemli gelişmeler kaydedilmesine rağmen, diyabetik ED tedavisi multifaktöriyel etiyolojisi nedeniyle zor olabilmektedir (40). Oral ilaçlar tedavide ilk sırada tercih edilirler (35). Oral ilaçların kullanılmadığı ve/veya etkisiz olduğu durumlarda vakum ereksiyon cihazları ve intrakavernoözal vazoaaktif madde

enjeksiyonlarını kapsayan ikinci sıra tedavi seçenekleri değerlendirilir. Penil protez ve penil revaskülarizasyon cerrahisi üçüncü sıra tedavi seçenekleridir (40).

Diyabetik ED tedavisinde ilk basamak, oral anti diyabetik ilaçlar ve/veya insülin ile glisemik kontrolün sağlanmasıdır. Hipertansiyon ve dislipidemi gibi risk faktörlerinin uygun tedavilerle giderilmesi gereklidir. Sigara kullanımı bırakılmalı ve alkol tüketimi sınırlandırılmalıdır. Hastanın kullandığı ilaçlar ED riski açısından değerlendirilmeli ve gerektiğinde ilaç değişikliğine gidilmelidir (40, 41).

PDE5 inhibitörleri yüksek etkililik oranı ve uygun güvenlik profili ile ED'nin oral tedavisinde ilk sıra ilaçlardır (43). PDE5 inhibitörleri kimyasal yapı olarak cGMP'ye benzerler ve enzimin katalitik bölgesi için cGMP ile yarışır. PDE5 inhibisyonu ile yıkılımı engellenen cGMP'nin etkinliği uzar. cGMP, GK1'i aktive eder ve çeşitli proteinlerin fosforilasyonu sonucu intraselüler Ca^{2+} düzeyini azaltır ve Ca^{2+} sinyalinde duyarısızlaşmaya neden olur (Şekil 10) (70).



Şekil 10. Penil ereksiyonda cGMP'nin rolü ve PDE5 inhibitörleri (Francis'den, 71). ATP, adenosin trifosfat; cGMP, siklik guanozin monofosfat; GC, guanilat siklaz; GK1, cGMP-bağımlı protein kinaz G1; GMP, guanozin monofosfat; GTP, guanozin trifosfat; NO, nitrik oksit; PDE5, fosfodiesteraz tip 5.

Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış dünya genelinde yaygın bulunan PDE5 inhibitörleri; sildenafil, vardenafil, tadalafil ve avanafil'dir. Udenafil, mirodenafil ve lodenafil gibi diğer PDE5 inhibitörleri de bazı ülkelerde kullanıma sunulmuştur (72). Sildenafil ilk kullanıma giren PDE5 inhibitörüdür ve 2014 yılı itibariyle ED ilaçlarının dünya çapında toplam gelirinin %47'sini oluşturmaktadır (73). PDE inhibitörlerinin en yaygın yan etkileri baş ağrısı, flushing, rinit ve görme bozukluklarıdır (43). PDE5 inhibitörleri, PDE5 ve PDE6 izoformlarının katalitik bölgelerindeki benzerlikten dolayı PDE6 enzimine de afinite gösterirler. PDE6 inhibisyonu bu ilaçlara bağlı geçici görme bozukluklarının mekanizmasını oluşturur (56). PDE5 inhibitörlerinin efikasiteleri benzer rağmen, farmakokinetik özellikleri ve enzim selektiviteleri arasında farklar bulunur (72). Sildenafil ve vardenafil görece hızlı absorpsiyonu nedeniyle bir saat içinde ereksiyon sağlar ve etki 10-12 saat devam eder (43). Etkinin başlama süresi ve toplam etki süresi bakımından mirodenafil ve lodenafil, sildenafil benzer (72). Geciktirilmiş absorpsiyon profili nedeniyle udenafil ve tadalafil sırasıyla 12 ve 36 saata kadar etkiye olanak sağlar (43, 72). Yüksek PDE5 selektivitesi olan avanafil ise 6 saatten uzun süre etki gösterir (72). PDE5 inhibitörleri nitrat ve α -adrenerjik reseptör blokörleri ile kullanıldığında şiddetli hipotansiyona neden olabilmektedir (41). Tadalafilin ilaç etkileşime yol açma riskinin daha az olduğu kabul edilir ve bu nedenle kronik hastalık durumunda diğer PDE5 inhibitörlerine tercih edilir (71).

Cinsel uyarı sonucu vasküler endotel tabakası ve sinir uçlarından salıverilen NO'nun guanilat siklazı aktive etmesi sonucu cGMP oluşur. Bu nedenle PDE5 inhibitörlerinin etkinlikleri NO'ya bağımlıdır (40). Endotel disfonksiyonu ve nöropati sonucu diyabette NO ve dolayısıyla yeterli cGMP üretiminin azalması nedeniyle diyabetik ED'de PDE5 inhibitörlerinin etkinlikleri sınırlıdır (70).

Yohimbin, apomorfin, trazodon, fentolamin ED tedavisinde kullanılan diğer oral ilaçları oluşturur. Papaverin, minoksidil, nitrogliserin topikal uygulanır; ancak etkinlikleri sınırlıdır (35, 41). Testosteron korpus kavernozumda NOS ekspresyonunu ve NO üretimini artırarak penil ereksiyona katkı sağlar. Testosteron replasman tedavisi sadece düşük serum testosteron düzeyi ve/veya primer gonadal yetersizliği olan hastalar için önerilmektedir. Replasman tedavisinin kilo artışı, akne, hipertansiyon, jinekomasti ve ödem gibi yan

etkileri vardır. Androjen tedavisine başlanmadan önce hastanın benign prostat hiperplazisi ve prostat kanseri açısından değerlendirilmesi gerekir (40).

İntrakavernozal vazoaktif madde enjeksiyonları, PDE5 inhibitörlerini kullanamayan ve/veya bu inhibitörlerin etkisiz olduğu durumlarda tercih edilen ikinci sıra ilaçlardır (41, 43). Sentetik PGE₁ analogu alprostadil, ED'nin intrakavernozal tedavisinde ilk onaylanan ilaçtır (35). İntrakavernozal yoldan kullanılan diğer ilaçlar fentolamin, papaverin ve VIP'tir. Tedavisi zor olgularda papaverin-fentolamin ve papaverin-fentolamin-alprostadil kombine tedavileri kullanılmaktadır (35, 40). Cinsel ilişkiden 10-15 dakika önce enjeksiyon yapılır ve etki için cinsel uyarı gerekmez (41). İntrakavernozal ilaç uygulamanın önemli komplikasyonları penil ağrı, uzamış ereksiyon, priapizm ve fibrozistir (43). İnvazif bir yöntem olması nedeniyle hastaların uyuncu problemi olmaktadır. İntraüretral alprostadil, daha az invazif bir yöntem olması ve komplikasyonlarının görece daha az olması nedeniyle intrakavernozal enjeksiyonların alternatifidir (40, 70).

Vakum ereksiyon cihazı içi boş silindirik tüp ve elle çalışan veya akülü bir pompa sisteminden oluşur. Tüp penisin üzerine yerleştirilir ve pompa aktifleştirildiğinde oluşan negatif basınç ile korporal yapı kan ile dolar (40). Ereksiyondan sonra penisin tabanına yerleştirilen halka penis içine dolan kan hapsedilir. Hastaların %30'u yetersiz sertlik, penil ağrı ve ejakülasyonda başarısızlık nedeniyle kullanmayı terk etmektedir (43).

Penil protezler Peyronie hastalığı gibi ciddi organik kökenli ED hastalarda kullanılabilir. Pahalı bir yöntem olması nedeniyle öncelikle diğer tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi önerilir (35). Penil protez implantasyonundan sonra enfeksiyon oranı %1.8-6.5 arasında değişmektedir (43). Bu komplikasyona çözüm olarak önerilen rifampin ve minosiklin kaplı protez 2001 yılında FDA tarafından onaylamıştır. Kavernozal arteriyel kan desteğini artırmak için gerçekleştirilen penis revaskülarizasyon cerrahisi ise diyabetik hastalar için önerilmemektedir (35).

ED tedavisinde kullanılan ilaçların etkinliklerinin sınırlı olması ve/veya yan etkileri, daha etkin ve güvenli ilaçların gerekliliğini ortaya koymaktadır. Doku rejenerasyonu ve gen transferi gibi yeni yaklaşımlar tedavi seçenekleri olarak araştırılmaya devam etmektedir (74).

2.3. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı

Embriyonik gelişim ve yetişkin doku homeostazisi için gerekli birçok temel biyolojik sürece aracılık eden Wnt/ β -katenin sinyal yolağı adını Wnt proteinlerinden alır. Wnt geni ilk kez 1982 yılında fare meme tümöründe yapılan çalışmalarda protoonkogen olarak keşfedilmiş ve Int-1 geni adını almıştır. Daha sonra bu genin *Drosophila*'daki segment polaritesinde rol alan Wingless geni ile sekans ve fonksiyon benzerlikleri saptanmış ve bu iki genin isminin kombinasyonu ile Wnt terimi türetilmiştir (75, 76). Wnt genleri ve bu genlerin ürünleri olan Wnt proteinleri hayvanlar aleminde çok sayıda türde görülmektedir. Günümüzde insanda tanımlanmış 19 adet Wnt geni bulunmaktadır ve Wnt proteinleri 12 alt aileye ayrılmaktadır (77). Yaklaşık 350 aminoasit uzunluğunda ve 36-40 kDa ağırlığındaki Wnt proteinleri; hematopoietik hücreler, epitel dokunun bazal hücreleri, beyin, karaciğer, akciğer gibi doku ve organlarda erişkin kök hücreler tarafından sentez edilir. Fare Wnt3a proteini saflaştırılan ve biyokimyasal olarak karakterize edilen ilk Wnt proteindir (78, 79). Glikoprotein yapısındaki Wnt proteinleri oldukça korunmuş sistince zengin sinyal sekansları içerir ve N-ucundaki bu korunmuş sistinlerin mutasyonu durumunda Wnt aktivitesi ortadan kalkmaktadır (80). Sentezleri sırasında endoplazmik retikulumda yapılarına palmitoleik asit eklenir ve böylece Wnt proteinleri hidrofobik yapıya kavuşur. Endoplazmik retikulum transmembran proteini olan ve O-açıl transferaz bölgesi içeren Porcupine, Wnt proteinlerinin lipid modifikasyonunu katalize eder. Wnt proteinlerinin lipid modifikasyonunu aktiviteleri için gereklidir (78, 80). Glikozillenmiş ve lipid eklenmiş Wnt proteinleri Wntless proteini aracılığıyla golgi cisimciğinden plazma membranına taşınır. Wnt proteinleri Wntless içeren endositik veziküller ile ekstraselüler matrikse salıverilir. Wntless, retromer kompleks tarafından endozomdan alınır ve tekrar kullanılmak üzere golgi cisimciğine taşınır. Salıverilen olgun Wnt proteinleri ekstraselüler ortamda heparan sülfat proteoglikanları ve lipoprotein partiküllerine bağlanabilir veya birbirleriyle multimer kompleksler oluşturur (78).

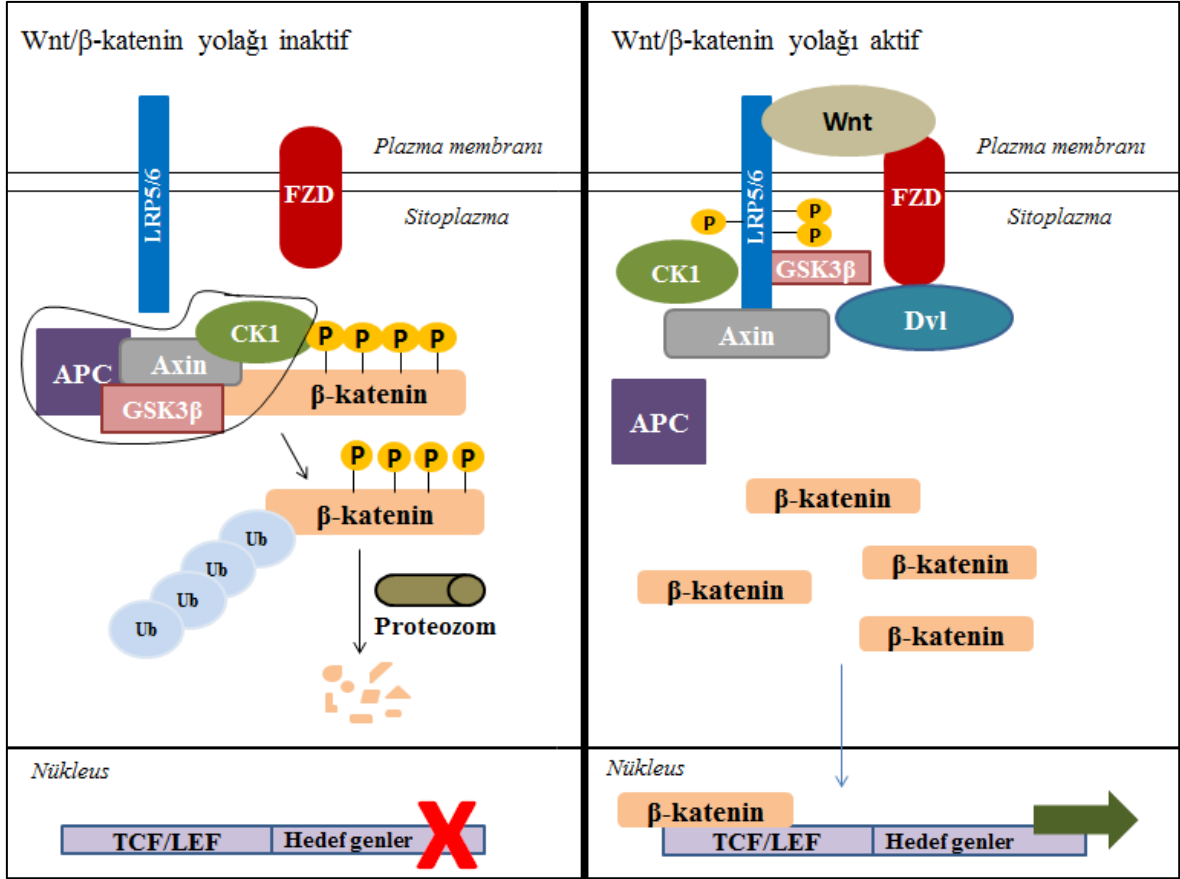
Wnt proteinleri hücre farklılaşması, proliferasyonu ve migrasyonu gibi temel biyolojik süreçlerde rol oynayan oldukça korunmuş glikoprotein yapılı sinyal molekülleridir (77). Günümüze kadar üç farklı Wnt sinyal yolu tanımlanmıştır: Wnt/ β -katenin sinyal yolu, hücre polaritesinin sağlanmasında rol oynayan Wnt sinyal yolu ve Wnt/ Ca^{2+} yolu. Bunlar içerisinde Wnt/ β -katenin yolağı, biyolojik ve patolojik süreçlerle ilişkisi en çok araştırılan Wnt sinyal yolağıdır ve kanonikal Wnt yolağı olarak

adlandırılmaktadır (77, 80). Hücre polaritesinin sağlanmasında rol oynayan Wnt sinyal yolu ve Wnt/Ca²⁺ yolu ise nonkanonikal yollar olarak tanımlanmıştır. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı; Frizzled (FZD) reseptörü, koreseptör olan düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili proteinleri 5/6 (LRP-5/6) ve Wnt proteinlerini içermektedir. Nonkanonikal yollarda Wnt proteinleri, FZD reseptörü ve diğer alternatif reseptörler ile etkileşir (80, 81). Wnt proteinleri arasında kanonikal ve nonkanonikal yolları tercihleri açısından farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Wnt1, Wnt2, Wnt3a, Wnt7a, Wnt8b, Wnt10b daha çok β -katenin bağımlı kanonikal yolak ile ilişkili iken; Wnt4, Wnt5a ve Wnt11 ise nonkanonikal Wnt sinyal yolağı üzerinde etkilidir. Ayrıca nonkanonikal Wnt yollarının, β -katenin bağımlı kanonikal yolağı antagonize ettiği düşünülmektedir (82, 83).

Yaklaşık 500-700 aminoasit uzunluğunda ve 63-80 kDa ağırlığında olan FZD reseptörleri, yedi transmembranal segmentli G proteini ile kenetli reseptör ailesinin bir üyesidir. FZD geni, ilk kez 1996 yılında *Drosophila*'nin epidermal hücre polaritesi araştırmaları sırasında keşfedilmiştir. FZD proteinleri ilkel metazoalar da dahil olmak üzere hayvanlar aleminde eksprese edilmektedir; ancak bitkilerde ve tek hücreli ökaryotlarda bulunmamaktadır (84, 85). Günümüze kadar memelilerde 10 adet FZD geni tanımlanmış ve bunlar FZD_{1/2/7}, FZD_{5/8}, FZD_{9/10}, FZD₄ ve FZD_{3/6} olmak üzere beş alt gruba ayrılmıştır. FZD reseptörlerinin ekstraselüler alandaki N-terminal ucunda 10 adet sistein rezidüsünden oluşan ve Wnt proteinlerinin bağlandığı oldukça korunmuş bölge bulunur. İntraselüler alandaki C-terminal ucu ise sitoplazmik proteinlerle etkileşme bölgesidir. FZD proteinlerinin fonksiyonları genetik çalışmalar ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. FZD2 geni silinmiş farelerin yaklaşık yarısında yarık dudak gözlenmiş, yarısında ise neonatal ölüm gerçekleşmiştir. FZD7 geni silinmiş farelerin yaklaşık %15'inde ventriküler septal defekt ve geri kalan yaklaşık %85'inde bükülmüş kuyruk fenotipi görülmüştür. FZD5 geninin silinmesi gebeliğin ortasında plasental yetersizliğe bağlı ölümlere neden olmuştur. FZD4 geni silinmiş farelerde ise retinal vaskülarizasyonda ciddi bozukluklar, progresif nitelikte duyma kaybı ve kan-beyin bariyerinin kaybı ile ilişkili olarak serebellar dejenerasyon görülmektedir. İnsanlarda ise FZD4 genindeki mutasyonlar ailevi eksudatif vitreoretinopati sendromu ile ilişkilendirilmektedir (85, 86). LRP-5/6 reseptörleri ise, lipoprotein reseptör ailesinin bir üyesidir. Yaklaşık 1600 aminoasit uzunluğunda ve 180 kDa ağırlığında olan LRP-5/6 reseptörleri; büyük bir ekstraselüler bölge, bir transmembranal segment ve kısa bir sitoplazmik kuyruk içerir. Wnt/ β -katenin sinyal yolunda Wnt-FZD ikilisinin koreseptörü olarak görev alır. LRP-5/6

reseptörünün intraselüler bölgesi fosforilasyon alanları içerir. Bu alanların fosforilasyonu Wnt/ β -katenin sinyalinin transdüksiyonunda oldukça önemlidir (87).

Wnt/ β -katenin yolağının en önemli hedefi β -katenin sitoplazmik seviyesinin düzenlenmesidir. Wnt/ β -katenin yolağı inaktif durumda iken β -katenin axin, glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β), kazein kinaz 1 (CKI) ve adenomatöz polipozis koli proteininden (APC) oluşan yıkıcı kompleks tarafından fosforillenir. β -katenin öncelikle CKI tarafından 45. pozisyondaki Ser rezidüsünden ve sonra GSK3 β tarafından 41. pozisyondaki treonin, 37. ve 33. pozisyonlardaki Ser rezidülerinden fosforilasyona uğrar. Fosforile haldeki β -katenin ubiquitin-ligaz kompleksinin bir parçası olan β -transducin taşıyan protein tarafından tanınır, ubiquitinlenir ve proteozomal degradasyona uğrar (78). Wnt/ β -katenin sinyali Wnt proteinlerinin hücre membranında bulunan FZD ve FZD'nin koreseptörü olan LRP-5/6 proteinine bağlanması ile başlar. Wnt-FZD-LRP5/6 kompleksi, LRP5/6'nın sitoplazmik kuyruğunun fosforilasyonuna neden olur. Sitozolda serbest halde bulunan Dishevelled (Dvl) proteini, FZD'ye bağlanır ve FZD-Dvl ikili kompleksi kurulur. Daha sonra yıkıcı komplekste bulunun axin, FZD-LRP5/6 reseptör kompleksine katılır ve β -katenin yıkıcı kompleksi inhibe olur. Sonuç olarak sitozolda biriken defosforile haldeki aktif β -katenin, nükleusa girerek T hücresi faktörü/lenfoit artırıcı faktöre (TCF/LEF) bağlanır (78, 80). TCF/LEF/ β -katenin kompleksi, DNA'nın uygun bölgesine bağlanarak p300 ve cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein ko-aktivatörlerinin yardımıyla Wnt hedef genlerinin transkripsiyonu başlatır (88) (Şekil 11). Hedef genlerin protein ürünleri hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte rol alır (75).



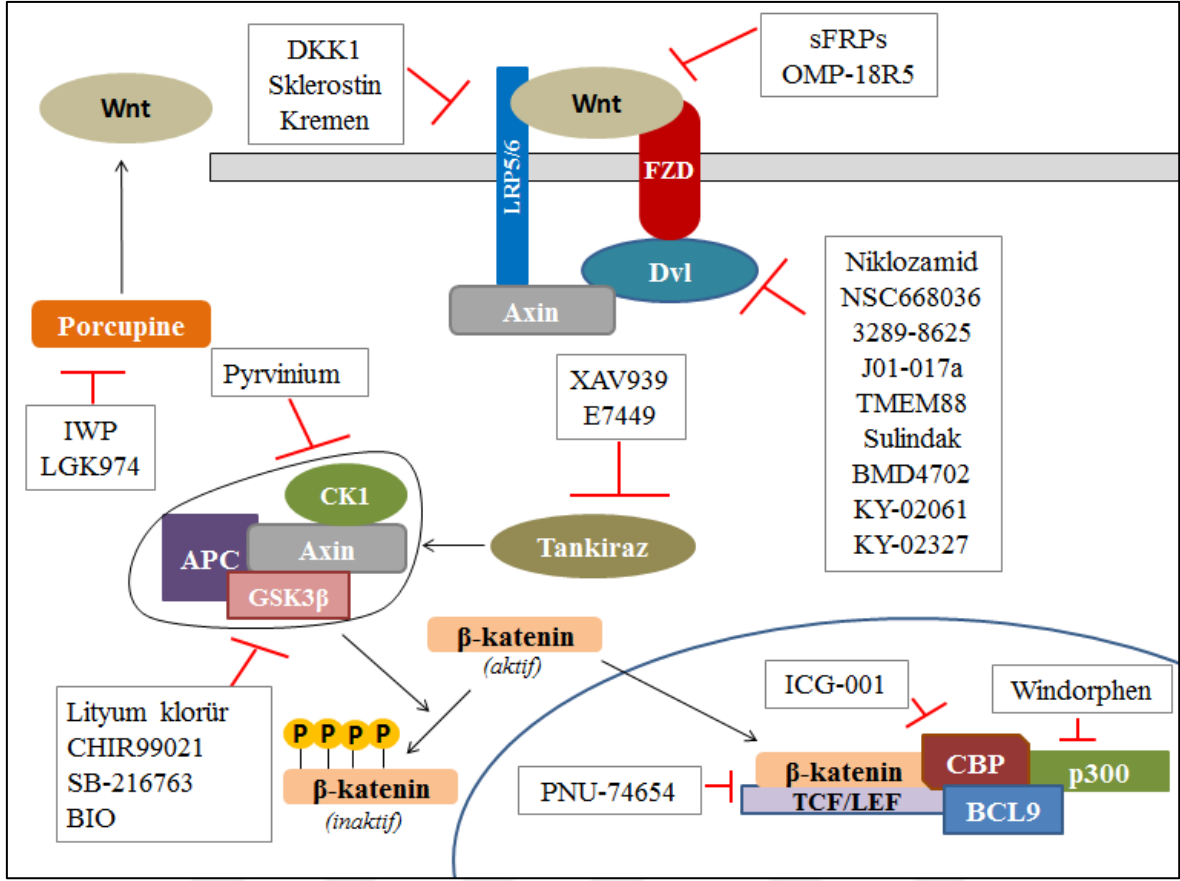
Şekil 11. Wnt/β-katenin sinyal yolağı. Sol panel, sinyal yolağı inaktif.; Sağ panel, sinyal yolağı aktif (Wang'dan, 89). APC, adenomatöz polipozis coli; CK1, kazein kinaz 1, Dvl, Dishevelled; FZD, frizzled reseptörleri, GSK3β, glikojen sentaz kinaz 3β; LRP5/6, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili proteinleri 5/6; TCF/LEF, T hücresi faktörü/lenfoid artırıcı faktör; Ub, ubikuitin.

GSK3, hücre büyümesi ve farklılaşmasında rolü olan önemli bir Ser/treonin kinazdır. İnsülin ve Wnt/β-katenin sinyal yolağının önemli bir parçasını oluşturan GSK3, memelilerde α ve β olmak üzere iki izoformda bulunur (90). GSK3β, Wnt/β-katenin sinyal yolağının regülasyonunda dual etki göstermektedir. Wnt proteinleri reseptörlerine bağlandığında GSK3β, LRP5/6'nın sitoplazmik kuyruğunu fosforile edilerek yolağın aktivasyonuna katkıda bulunur. Diğer taraftan GSK3β, β-katenin yıkıcı kompleksinde yer alan ve β-katenini fosforile ederek degradasyonuna aracılık eden kinazlardan biridir. GSK3β tarafından β-kateninin fosforilasyonu Wnt/β-katenin sinyal yolağının inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu dual etkinin hücrede iki farklı GSK3β havuzu tarafından yürütüldüğü düşünülmektedir. Plazma membranına bağlı GSK3β LRP5/6'yı fosforile ederek Wnt/β-katenin yolağını aktive ederken, sitozolik GSK3β ise β-katenini fosforile ederek Wnt/β-katenin yolağını antagonize eder (90, 91). Wnt/β-katenin sinyali

varlığında Wnt-FZD-LRP-5/6 üçlü kompleksinin oluşması sonucu GSK3 β , 9. pozisyonundaki Ser rezidüsünden fosforile olur (GSK3 β ^{Ser9}) ve böylece GSK3 β inhibisyonu gerçekleşir. Bu durumda fosforile olamayan aktif β -katenin sitoplazmada birikir, nükleusa transloke olur ve TCF/LEF-bağımlı hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (92).

Wnt sinyal yolağı birçok endojen protein tarafından sıkı şekilde kontrol edilmektedir. Salgılanmış Frizzled ilişkili proteinler ve Wnt inhibitör protein, wnt sinyal yolağını antagonize eder. Wnt inhibitör protein doğrudan Wnt proteinlerine, salgılanmış Frizzled ilişkili proteinler ise doğrudan Wnt proteinlerine ve/veya FZD reseptörlerine bağlanarak inhibisyona neden olur (78). DKK proteinleri örneğin DKK1, LRP-5/6 reseptörlerinin endojen antagonistidir ve Wnt yolağını inhibe eder. DKK1, LRP-5/6 reseptörlerinin internalizasyonunu indükler ve Wnt yolağı inhibisyonuna neden olur (93). WISE ve SOST proteinleri LRP-5/6 reseptörlerine bağlanır ve FZD-LRP-5/6 kompleksinin oluşumunu önleyerek Wnt sinyalini inhibe ederler. Norrin ve R-spondin proteinleri Wnt/ β -katenin yolağının agonistleridir. Norrin spesifik olarak FZD₄ reseptörüne, R-spondin ise LRP-5/6 ve/veya FZD reseptörlerine bağlanarak Wnt/ β -katenin yolağını aktive eder (78).

Wnt/ β -katenin yolağını aşırı aktivitesinin kolon kanseri başta olmak üzere çok sayıda kanser türü, Wnt sinyali hipoaktivitesinin ise çok sayıda nörodejeneratif hastalık ve kemik malformasyonları ile ilişkili oluşu gösterilmiştir (94). Bu nedenle Wnt/ β -katenin yolağının komponentlerini hedef olan çok sayıda inhibitör ve aktivatör molekül geliştirilmiştir ve halen geliştirilmeye devam etmektedir (Şekil 12).



Şekil 12. Wnt/β-katenin yolağını hedef alan moleküller (Zheng, 88'den). APC, adenomatöz polipozis coli; BCL9, B hücreli CLL/lenfoma 9 proteini; CBP, cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein; CK1, kazein kinaz 1, Dvl, Dishevelled; FZD, frizzled reseptörleri, GSK3β, glikojen sentaz kinaz 3β; LRP5/6, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili proteinleri 5/6; TCF/LEF, T hücresi faktörü/lenfoid artırıcı faktör; Ub, ubiquitin.

Bir FZD antikorunu olan OMP-18R5 kodlu bileşik Wnt proteinlerinin FZD reseptörlerine bağlanır ve Wnt/β-katenin yolağını inhibe eder (95). Dvl protein ile FZD'nin etkileşimi Wnt/β-katenin yolağı sinyal transdüksiyonu için gereklidir. NSC668036, KY-02061, J01-017a gibi Dvl-FZD etkileşimini çeşitli mekanizmalarla etkileyen çok sayıda inhibitör molekül sentezlenmiştir. Niklozamid (NZ) Dvl protein ekspresyonunu azaltarak, bir non-steroidal antiinflamatuvar ilaç olan sulindak ise spesifik olarak Dvl proteinin FZD ile etkileşim bölgesine bağlanarak Wnt/β-katenin sinyalini inhibe eder. Bir CK1 aktivatörü olan pyrvinium, β-katenin yıkımına katkıda bulunarak Wnt/β-katenin sinyalini antagonize eder (88). Wnt proteinlerinin sekresyonu ve aktivitesi için gerekli olan palmitulasyon porcupine enzimi tarafından katalize edilir (94). IWP, LGK974 gibi moleküller enzim aktivitesini inhibe ederek Wnt sinyalini inhibe ederler (88). Tankiraz enzimi axin

proteininin degradasyonuna aracılık ederek β -katenin yıkıcı kompleksini inhibe eder. XAV939, E7449 gibi tankiraz enzim inhibitörleri axin ve yıkıcı kompleksi stabilize eder, böylece Wnt sinyal yolağı inhibe olur (80, 88). Bazı Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibitörleri, nükleer β -katenin aktivitesi üzerine etki gösterirler. ICG-001, cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein ile β -katenin arasındaki etkileşimi bloke eder. PNU-74654, β -kateninin TCF üzerindeki bağlanma bölgesine afinite gösterir ve kompetitif inhibisyon oluşturur. Windorphen ise β -katenin ile p300 arasındaki etkileşimi bloke ederek Wnt sinyal yolağını inhibe eder (88).

Wnt/ β -katenin sinyali hipoaktivitesi ile ilişkili patolojik durumlarda gerekli aktivasyonun sağlanması için önemli mekanizmalardan biri GSK3 β inhibisyonudur. Bu enzim inhibe edildiğinde β -katenin fosforillenemez ve degrade olamayan defosforile haldeki aktif β -katenin nükleusa transloke olur ve wnt sinyali gerçekleşir (96). Lityum klorür, CHIR99021, SB-216763 ve BIO birçok in vitro modelde Wnt/ β -katenin sinyalini aktive ettiği gösterilmiş GSK3 β inhibitörleridir (88).

2.3. 1. Wnt/ β -katenin Yolağı ve Diyabet

Wnt/ β -katenin sinyal yolağının pankreatik β hücre proliferasyonu, lipid metabolizması ve glukozla indüklenen insülin sekresyonunda rol aldığı çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmada gösterilmiştir (97). Wnt/ β -katenin sinyal yolağı komponenti olan transkripsiyon faktörü-7 benzeri 2 ve Wnt5a tek nükleotid polimorfizmlerinin tip 2 diyabetle ilişkisi ortaya konmuştur. LRP5 polimorfizmleri ise obez fenotiple ilişkilidir. Wnt sinyali embriyogenez boyunca pankreatik adacıklarının gelişiminde ve yetişkin dönemde pankreas ve intestinal endokrin hücre fonksiyonlarında görev alır (98). Glukagon benzeri peptid-1'in (GLP-1) yetişkin fare pankreas adacıklarında Wnt aktivitesini artırdığı ve sıçan pankreatik β hücre serisinde GLP-1 ile indüklenen proliferasyonun β -katenin bağımlı olduğu gösterilmiştir (99). Kim ve arkadaşları, diyabetik sıçanlara insülin reseptörünü aşırı eksprese eden β hücre transplantasyonunun Wnt sinyalini aktive ederek hiperglisemiyi azalttığını ortaya koymuşlardır. İnsülin tedavisi ile intestinal L hücrelerinde nükleer β -katenin birikimi gözlenmiştir (100). Adiposit kaynaklı Wnt proteinlerinin β hücre proliferasyonunu ve insülin sekresyonunu indüklediği in vitro olarak gösterilmiştir. İnsülin ile aktive olan fosfotidilinozitol 3 kinaz, GSK3 β 'yı fosforile ederek inhibisyonuna neden olur. GSK3 β 'in inhibe olması sonucu β -katenin fosforillenemez ve nükleusa geçer

(101). Wnt sinyali ve insülin arasındaki bu ilişki preadipositlerde, iskelet kası hücrelerinde ve intestinal hücrelerde tanımlanmıştır (100).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Wnt/ β -katenin sinyal aktivitesindeki anomaliliklerin diyabetik komplikasyonların gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Liu ve arkadaşları fare diyabetik retinopati modelinde endojen Wnt antagonisti kallistatinin Wnt sinyalini inhibe ederek anti-anjiyogenik ve anti-nöroinflamatuvar etki gösterdiğini bulmuşlardır (102). Chen ve arkadaşları, diyabetik retinopati hastalarından alınan retina örneklerinde, immünohistokimyasal boyama yöntemi ile β -katenin düzeyinin arttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, sığır primer retinal kapiler endotel hücrelerinde hiperglisemik koşulların β -katenin düzeyini artırdığı ve sıçan diyabetik retinopati modelinde Wnt antagonisti DKK1 intravitreal uygulamasının, retinal inflamasyonu ve vaskularizasyonu azalttığı ortaya konmuştur (103). Diyabetik nefropati patogenezinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının dual etkili olduğu düşünülmektedir (7). Podosit hücre kültürleriyle yapılan çalışmalarda hiperglisemik koşulların hücrelerde Wnt/ β -katenin yolağını aktive ederek apoptoza yol açtığı gösterilmiştir. Wnt antagonisti DKK1 uygulaması ise podositlerdeki apoptozu azaltmıştır (104). Podosit spesifik β -katenin geni silinmiş hayvanların podosit hasarına ve böylece albuminüriye direçli oldukları görülmektedir. Ayrıca yabancı tip hayvanlarda Wnt/ β -katenin yolağının farmakolojik aktivasyonu ise albuminüriye neden olmaktadır. Diğer taraftan diyabetin Wnt/ β -katenin sinyal yolağını inhibe ederek mezengial hücrelerde apoptoz ve fibrozisi indüklediği gösterilmiştir (105). Lin ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada Wnt/ β -katenin yolağı aktivasyonu, glomerüler mezengial hücreleri yüksek konsantrasyon glukozla indüklenen apoptoz ve fibrozisten korumuştur (7). İn vitro çalışmalarda glomerüler mezengial hücrelerde yüksek konsantrasyon glukozla indüklenen apoptozun, nükleer defosforile haldeki aktif β -katenin düzeyindeki azalmayla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca yüksek konsantrasyon glukoz varlığında fosforile GSK3 β düzeyinde azalma tespit edilmiştir, bu durum GSK3 β enzim aktivitesindeki artışı ve dolayısıyla Wnt/ β -katenin sinyali inhibisyonunu göstermektedir (106). Hui Xi ve arkadaşları diyabetik sıçanlarda Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonunun miyokardiyal hasara ve kardiyomiyosit apoptozuna aracılık ettiğini göstermiştir (107). Resham ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada diyabetik sıçanlara intratekal LGK974 (porcupine inhibitörü), NCS668036 (Dvl inhibitörü) ve PNU-74654 (β -katenin inhibitörü) uygulaması ile Wnt sinyali inhibisyonunun nöropati gelişimini azalttığını ve siyatik sinirde nöron fonksiyonunu iyileştirdiğini rapor etmişlerdir

(108). Wnt/ β -katenin sinyal yolağının diyabetik osteopeni patogenezinde de rol oynadığı gösterilmiştir. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı osteoblast proliferasyonu, farklılaşması ve kemik remodelingi için gereklidir (109). Tip 1 diyabette azalmış Wnt/ β -katenin sinyalinin osteoblast aktivitesini bozduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (110). FK506'nın tip 1 diyabetik sıçan modelinde Wnt/ β -katenin yolağını aktive ederek kemik kaybını azalttığı gösterilmiştir (111).

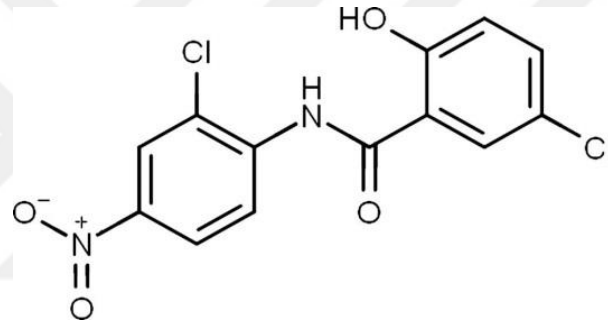
2.3.2. Niklozamid

Niklozamid (5-kloro-N-(2-kloro-nitrofenil)-2-hidroksibenzamid, NZ) 1953 yılında Bayer laboratuvarlarında keşfedilmiş ve 1959 yılında şistozomiyazisin ara konağı salyangozlarıldrmek için zirai mücadelede kullanılmak üzere mollusisit olarak piyasaya sunulmuştur. Bayer bilim insanları 1960 yılında NZ'nin insanlarda sestod enfeksiyonlarına karşı etkili olduklarını ortaya koymuş ve NZ 1962 yılında Yomesan ticari adıyla insanlarda antihelmintik olarak kullanılmaya başlanmıştır (112, 113). Sestod enfeksiyonlarının tedavisinde kullanımı 1982 yılında FDA tarafından onaylanan NZ, Dünya Sağlık rgt tarafından belirlenen temel ilaç listesi içerisinde yer almaktadır (112). NZ yetişkinlerde *Taenia saginata*, *Diphyllobothrium latum* ve *Dipylidium caninum* tedavisinde oral yıldıan tek doz 2 g olarak kullanılır. *Hymenolepis nana* tedavisinde ise aynı doz NZ yedi gün boyunca kullanılır. Antihelmintik etkisini duyarlı organizmalarda mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu etkileyerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir (114).

NZ bir salisilik asit türevi olan salisilanilid sınıfı bileşiklerin bir üyesidir ve molekül ağırlığı (MA) 327.12 g/moldür (112, 115) (şekil 13). Etanol, kloroform ve eterde orta derecede çözünür, suda ise znmez. Soluk sarı renkte kristal yapısındadır. Higroskobik anhidr formu ile H_A ve H_B olmak üzere iki farklı monohidrat kristal formu tanımlanmıştır. Kristal formuna göre NZ'nin erime noktası 228-230°C arasında değişmektedir. NZ zayıf asit yapısındadır ve kanda daha yüksek oranda anyonik bölgeler içerir (115). Biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre, çözünürlük ve permeabilite oral yoldan kullanılan bir ilacın absorpsiyonunu etkileyen iki önemli faktördür. Bu sınıflandırma sistemine göre NZ znrlğ düşük ilaçlar arasındadır (116).

NZ'nin oral biyoyarlanımı düşüktür. Chang ve arkadaşlarının sıçanlarda NZ'nin farmakokinetik özelliklerini araştırdığı bir çalışmada, sıçanlara oral yoldan 5 mg/kg dozda NZ verildiğinde biyoyarlanım yaklaşık %10 ve yarılanma ömrü ise yaklaşık 6 saat olarak saptanmıştır (112). Osada ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada oral yoldan 200 mg/kg

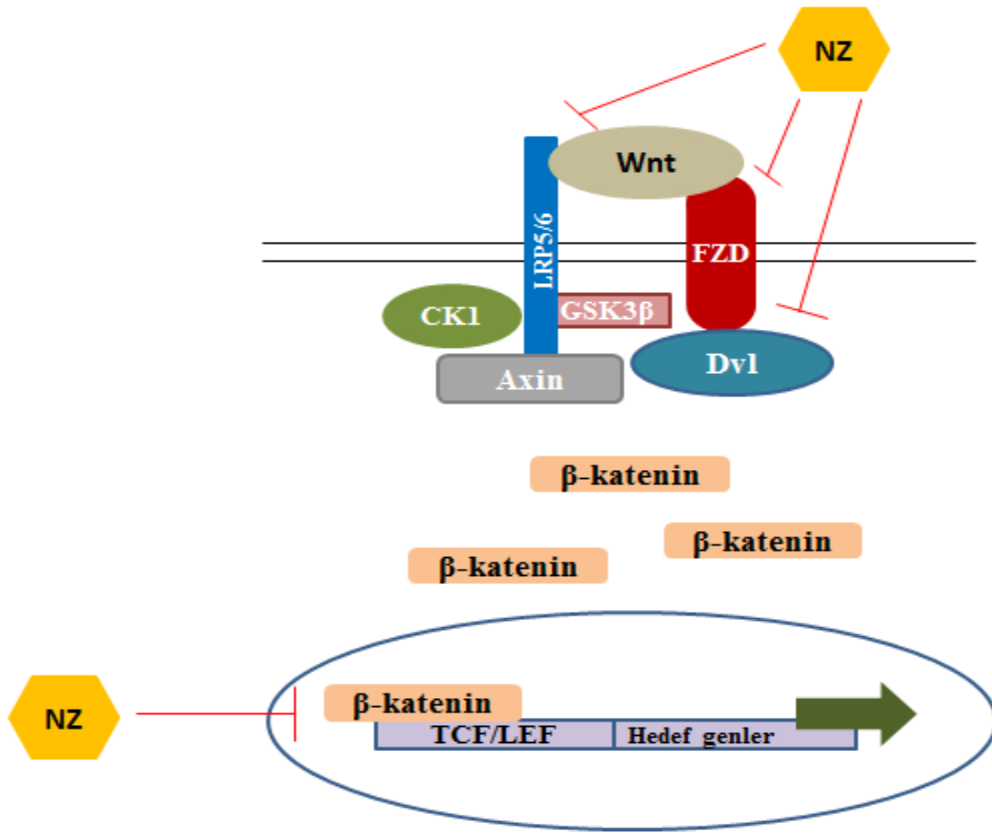
dozda NZ verilen farelerde de benzer farmakokinetik profil elde edilmiştir (117). 2 g NZ verilen gönüllü insanlarda maksimum serum konsantrasyonu 0.25-6 µg/mL olarak tespit edilmiş ve NZ iki günde elimine edilmiştir. NZ'nin yaklaşık %25'i idararla, geri kalanı ise feçesle elimine edilmiştir (118). NZ'nin düşük çözünürlük ve dolayısıyla düşük absorpsiyon profili gastrointestinal sistemde lokal etki göstermesi beklenen antihelmintik amaçlı kullanımında bir problem oluşturmamaktadır. Ancak, NZ'nin sistemik etki için kullanımı amaçlandığında bu durum büyük engel teşkil etmektedir (115). Son yıllarda NZ'nin başta kanser olma üzere, tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıklar, endometriyozis, nöropatik ağrı, romatoid artrit ve sistemik sklerozis gibi hastalıklara karşı etkinliğini gösteren çalışmalar nedeniyle NZ'nin absorpsiyonunu artırarak sistemik kullanımına olanak sağlayacak formülasyon çalışmaları tüm hızıyla devam etmektedir (112).



Şekil 13. NZ'nin kimyasal yapısı (Barbaso'dan, 115)

Son yıllarda NZ'nin özellikle kolon, meme, akciğer, over başta olmak üzere baş ve boyun kanseri, glioma ve lösemide in vitro ve in vivo antikanser etkinliğini gösteren çok sayıda çalışma rapor edilmiştir (112). NZ'nin antikanser etkisi Wnt/β-katenin sinyal yolağı, rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi yolağı, sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü-3 yolağı, nükleer faktör κB ve Notch sinyal yolağı gibi hücre içi mekanizmaların inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (115). NZ, Wnt/β-katenin sinyal yolağının birçok komponenti ile etkileşime girerek inhibitör etkiye eden olmaktadır (Şekil 14) (114). Lu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, prostat kanseri hücre serisi olan PC-3 hücrelerini 1.2 µM konsantrasyonda NZ ile 3, 6, 10 ve 24 saat inkübe ettiklerinde NZ'nin LRP6 degradasyonunu sağlayarak Wnt/β-katenin yolağını inhibe ettiğini göstermişlerdir (119). Ayrıca NZ kolon kanseri hücre serilerinde ve metastatik hastalığın cerrahi rezeksiyonu ile izole edilen sporadik kolorektal kanser hücrelerinde FZD reseptör

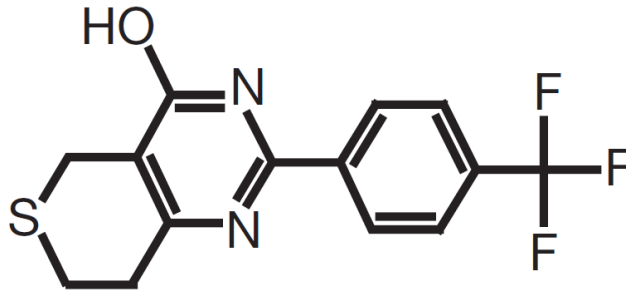
endositozuna aracılık etme, Dvl ekspresyonunda ve TCF/LEF aktivitesinde azalma mekanizmalarıyla Wnt/ β -katenin yolağını inhibe etmiştir (104). Osada ve arkadaşları insan kolorektal kanseri hücre serilerinde 1, 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda 18 saatlik NZ inkübasyonun Dvl ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (117). Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, LEF/TCF promoter lusiferaz raportör sistemi kullanılarak NZ'nin insan embriyonik böbrek 293 (HEK293) hücre serisinde Wnt3a ile indüklenen Wnt sinyali üzerindeki inhibitör etkinliği değerlendirilmiş ve maksimum inhibitör konsantrasyonun yarısı (IC_{50}) $0.5 \pm 0.05 \mu$ M bulunmuştur. Aynı çalışmada, insan kemik osteosarkom epitel hücre serisinde (U2OS) NZ'nin 1-7.5 μ M konsantrasyon aralığında Wnt3a ile indüklenen sitozolik β -katenin birikimini azalttığı gösterilmiş ve IC_{50} değeri yaklaşık 1 μ M olarak tespit edilmiştir (120). Monin ve arkadaşları sıçan kolon adenokarsinoma hücre serisinde (CC531) LEF/TCF promoter lusiferaz raportör sistemi ile yaptıkları analizlerde 3, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarda NZ ile 12 saatlik inkübasyonun Wnt sinyali üzerine etkisini araştırmış, 10 ve 50 μ M NZ'nin Wnt sinyalini inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (121).



Şekil 14. NZ'nin Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki hedefleri (Li'den, 114)

2.3.3. XAV939

Tankiraz, hedef proteinlere ADP-riboz ekleyen Poli (ADP-Riboz) polimeraz enzim ailesinin bir üyesidir. Wnt sinyali ile ilgili olarak tankiraz enzimi, β -katenin yıkıcı kompleksinde bulunan axin proteinine ADP-Riboz birimleri ekleyerek, axini degradasyonu için işaretler (82). Tiyopiranopirimidin yapısındaki XAV939 tankiraz enziminin selektif inhibitörüdür (Şekil 15). XAV939, tankiraz enzimini inhibe ederek axin degradasyonunu önler, yıkıcı kompleksin aşırı aktivitesine ve böylece Wnt/ β -katenin sinyal yolunun inhibisyonuna neden olur (88). Yapılan çalışmalarda tankiraz 1 ve 2 enzimleri için IC_{50} değerleri sırasıyla 0.0011 ve 0.004 μ M olarak tespit edilmiştir. XAV939'un tankiraz enzimi dışında henüz tanımlanmış başka bir hedef proteini bulunmamaktadır (122). Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ile ilgili in vitro ve in vivo deneysel çalışmalarda yolak inhibitörü olarak yaygın kullanılmaktadır (80).



Şekil 15. XAV939'un kimyasal yapısı (Huang'dan 122)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kimyasallar

	Marka/Kod
Amonyum persülfat (APS)	Bio-Rad, 161-0700
Bromofenolblue	Biomatik, A2223
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad, 1705061
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, 276855
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, 43815
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) tetrasodyum tuzu	ZAG Kimya, 10378-23-1
Fosfataz inhibitör kokteyl 1	Sigma, P2850
Fosfataz inhibitör kokteyl 2	Sigma, P5726
Fosfat tamponlu salin tablet	Sigma, P4417
Glukoz monohidrat	Merck, 104074
Gliserol	Sigma, G5516
Glisin	Sigma, G8898
HEPES	Sigma, 54457
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma, 3203331
Ketalar [®] (Ketamin HCl)	Pfizer
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	Sigma, M8266
Metanol	Isolab, 67-56-1
Nevparin [®] enjektabl flakon 5000IU/mL (Heparin)	Mustafa Nevzat İlaç
Niklozamid	Bayer
PMSF (Fenil metil sülfonil florid)	Sigma, 78830
Precision Plus Protein [™] Dual Color Standards	Bio-Rad, 1610374
Ponceau S	Sigma, P7170

Proteaz inhibitör kokteyl	Sigma, P8340
Rompun® %2 (Ksilazin)	Bayer
Sığır serum albümin (BSA)	Capricorn Scientific, BSA-1U
Sitrik asit	Sigma, 27109
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, L3771
Sodyum florür (NaF)	Sigma, S7920
Sodyum hidroksit (NaOH)	Tekkim, 1318-79-2
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma, 71383
Sodyum orthovanadat (NaVan-Na ₃ VO ₄)	Sigma, S6508
Sodyum sitrat	Sigma, W302600
Streptozotosin	Sigma, S0130
Sükroz	Fisher Chemical, 57-50-1
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma, T9281
Tris/Glycine/SDS Buffer 10x	Bio-Rad, 161-0772
Tris-Baz (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma, T1503
Triton X 100	Sigma, T8787
Tween 20	Sigma, P1379
Tween 80	Sigma, P1754
XAV939	Sigma, X3004
Yağsız süt tozu	Regilait
β-merkaptoetanol	Merck, 8.057440.0250

3.1.2. Antikorlar

Anti-DKK1 antikoru	Bioss, bs-2162R
Anti-fibronektin antikoru	Abcam, ab2413
Anti-kaspaz-3 antikoru	Cell signaling, 9662

Anti-Lamin B1 antikoru	Abcam, ab194109
Anti-p-GSK3 β (serin-9) antikoru	Cell signaling, 5558
Anti-non-p-(aktif)- β -katenin antikoru	Cell signaling, 8814
Anti-rabbit IgG HRP-linked antikoru	Cell signaling, 7074
Anti- β -tübülün antikoru	Abcam, ab6046

3.1.3. Cihazlar

Buz makinesi	Hoshaizaki, Japonya
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik, Türkiye
Chemidoc görüntüleme sistemi	Bio-Rad, ABD
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-80 °C)	Thermo Scientific, ABD
Dikey elektroforez ve transfer sistemi	Bio-Rad, ABD
Deiyonize su cihazı	Sartorius, Almanya
Elektriksel alan stimülatörü	MAY, Türkiye
Elektroforez güç kaynağı	Bio-Rad, ABD
Fosfat tamponlu salin tabletleri	Sigma, P4417
Hassas analitik terazi	Ohaus, ABD
Homojenizatör	Heidolph, Almanya
Isıtıcı	Witeg, Almanya
Kaba terazi	Premier, Türkiye
Kan glukozu ölçüm cihazı	Accu-Chek [®] Active, Almanya
Magnetik karıştırıcı	Witeg, Almanya
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific, ABD
Minisantrifüj cihazı	Isolab, Türkiye
Otomatik Pipetler	Eppendorf, ABD

pH metre	Ohaus, ABD
Platin elektrod	Grass Technologies, ABD
Sıvı azot tankı	Isotherm, Türkiye
Soğutmalı santrifüj	Sigma, ABD
Sonikatör	Bandelin, Almanya
Ultrasonik banyo	Elma Ultrasonics, Almanya
Veri kayıt ve analiz sistemi	MP35 BIOPAC, ABD
Vorteks	Isolab, Türkiye

3.1.4. Kitler

BCA protein konsantrasyonu ölçüm kiti	Thermo scientific, 23225
TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, %10	Bio-Rad, 161-0183

3.1.5. Çözelti ve Tamponlar

3.1.5.1. Stok Çözelti ve Tamponların Hazırlanması

50 mM sodyum sitrat (pH:4.5) tamponu

1.47 g sodyum sitrat ve 1.05 g sitrik asit ayrı balon jöjelerde 100'er mL deiyonize suda çözüldü. Daha sonra sitrik asit çözeltisi üzerine pH 4.5 oluncaya kadar sodyum sitrat çözeltisi ilave edildi. Hazırlanan çözelti bir hafta boyunca +4°C'de saklandı.

1 M Tris-Cl (pH:7.4) tamponu

121.1 g Trizma baz (MA: 121.14 g/mol) 800 mL deiyonize su içerisinde çözüldü. Derişik HCl çözeltisi ile pH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

5 M NaCl çözeltisi

29.22 g NaCl (MA: 58.44 g/mol) 100 mL deiyonize suda çözüldü. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Triton-X 100 (%20) çözeltisi

20 mL Triton-X 100 80 mL deiyonize suda çözüldü. Hazırlanan çözelti +4°C'de saklandı.

0.5 M EDTA çözeltisi

20.81 g EDTA tetrasodyum tuzu (MA: 416.201 g/mol) bir miktar deiyonize su içinde çözüldü. Derişik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile pH 8.0'e ayarlandı ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

50 mM Sodyum pirofosfat (NaPPi) çözeltisi

1.115 g NaPPi (MA: 444.06 g/mol) 50 mL deiyonize suda çözüldü. Hazırlanan çözelti 1.5 mL/2 mL'lik eppendorf tüplerde alikotlandı ve -20°C'de saklandı.

1 N NaOH Çözeltisi

4 g NaOH (MA: 40 g/mol) bir miktar deiyonize suda çözüldü ve çözelti deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

200 mM Sodyum ortovanadat (NaVan) çözeltisi

3.68 g Na₃VO₄ (MA: 183.91 g/mol) 90 mL deiyonize suda çözüldü ve 1N HCl ilavesi ile pH 10.0'a ayarlandı. Sarı renk alan çözelti renksiz oluncaya kadar kaynatılıp soğutuldu ve tekrar pH kontrol edildi. Hazırlanan çözelti 1.5 mL/2 mL'lik eppendorf tüplerde alikotlandı ve -20°C'de saklandı.

1 M Sodyum florür (NaF) çözeltisi

4.2 g NaF (MA: 41.99 g/mol) 100 mL deiyonize suda çözüldü. Hazırlanan çözelti 1.5 mL/2 mL'lik eppendorf tüplerde alikotlandı ve -20 °C'de saklandı.

100 mM PMSF çözeltisi

0.174 g PMSF (MA: 174.19 g/mol) 10 mL etanol içinde çözüldü. Hazırlanan çözelti 1.5 mL/2 mL'lik eppendorf tüplerde alikotlandı ve -20°C'de saklandı.

0.5 M Tris-HCl tamponu (pH: 6.8)

6.057 g Trizma baz (MA: 121.14 g/mol) 90 mL deiyonize suda çözüldü. Hazırlanan çözeltinin derişik HCl ile pH'ı 6.8'e ayarlandı ve toplam hacim deiyonize suyla 100 mL'ye tamamladı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

5X Yükleme tamponu

10 mL çözeltide 0.25 M Tris-Cl (pH:6.8), %10 SDS, %50 gliserol, %0.01 bromofenolblue olacak şekilde yükleme tamponu hazırlandı. Hazırlanan çözelti alikotlandı ve -20°C'de saklandı. Her bir alikota, çalışma çözeltisine seyreltilmeden önce son

konsantrasyonu 0.5 M olacak şekilde DTT (MA: 154.25 g/mol) eklendi ve kullanıma hazır hale getirildi.

10X Tris-Glisin tamponu

30.3 g Trizma baz (MA: 121.14 g/mol) ve 144 g Glisin (MA: 75.07 g/mol) 1 L deiyonize suda çözüldü. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

10X TBS çözeltisi

29.71 g Trizma baz (MA: 121.14 g/mol) ve 110 g (MA: 58.44 g/mol) NaCl 800 mL deiyonize suda çözüldü. Derişik HCl ile pH: 7.6'ya ayarlandı. Toplam hacim deiyonize suyla 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

%20'lik Tween 20 çözeltisi

20 mL Tween 20, 80 mL deiyonize suda çözüldü. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

%20'lik SDS çözeltisi

1 g SDS 5 mL deiyonize suda çözüldü. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

3.1.5.2. Çalışma Çözeltileri ve Tamponların Hazırlanması

Homojenizasyon tamponu

Son konsantrasyonları 50 mM Tris-Cl, pH: 7.4, 150 mM NaCl, % 1 Triton X-100, 1 mM EDTA pH: 7.0, 5 mM NaPPi, %1 proteaz inhibitör kokteyli, % 10 gliserol, 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF olacak şekilde çözeltiler birleştirildi ve hacim deiyonize su ile 50 mL'ye tamamlandı. Çözelti taze olarak hazırlandı ve deney boyunca kuru buz içerisinde tutuldu.

S tamponu

Son konsantrasyonları 250 mM sükroz, 50 mM Tris-HCl (pH: 7.4), 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA pH: 7.0, 5 mM NaPPi, %1 proteaz inhibitör kokteyli, 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF olacak şekilde deiyonize su ilavesi ile 50 mL çözelti hazırlandı. Çözelti taze olarak hazırlandı ve deney boyunca kuru buz içerisinde tutuldu.

N tamponu

Son konsantrasyonları 20 mM HEPES (pH: 7.4), 1.5 mM MgCl₂, 0.5 M NaCl, % 1 Triton X-100, 0.2 mM EDTA, 5 mM NaPPi, 1X proteaz inhibitörü, %10 gliserol, 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF olacak şekilde deiyonize su ilavesi ile 20 mL çözelti hazırlandı. Çözelti taze olarak hazırlandı ve deney boyunca kuru buz içerisinde tutuldu.

Tris-Glisin-SDS (TGS) yürütme tamponu

100 mL 10X TGS ve 900 mL deiyonize su cam şişede karıştırıldı. Çözelti her seferinde taze olarak hazırlandı.

Transfer tamponu

100 mL 10X Tris-Glisin tamponu ve 200 mL metanol balonda karıştırıldı ve çözelti hacmi deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı. Çözelti her seferinde taze olarak hazırlandı ve transfer işlemine kadar +4°C'de soğumaya bırakıldı.

TBS-T çözeltisi

10X TBS stok çözeltisinden 100 mL alınıp 800 mL deiyonize suyla seyreltildi. Son konsantrasyonu %0.05 olacak şekilde %20'lik Tween 20 çözeltisinden 2.5 mL çözeltime eklendi. Toplam çözelti hacmi deiyonize suyla 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

%0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisi

10X TBS çözeltisi 1X olacak şekilde deiyonize suyla seyreltildi ve 100 µL Tween 20 1X TBS çözeltisiyle 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

%3'lük Sığır serum albümini (BSA) çözeltisi

1.5 g BSA 50 mL %0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti +4°C'de saklandı.

%5'lik süt tozu çözeltisi

2.5 g yağsız süt tozu 50 mL %0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti +4°C'de saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Hayvanları

Çalışmada yaşlarına göre eşleştirilmiş, 245-412 g ağırlığında Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiş Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, merkezin 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusu bulunan sıcaklık ve nem kontrollü odalarında barındırıldı. Deney süresince sıçanlara *ad libitum* musluk suyu ve standart yem verildi. KTÜ Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan etik kurul onayı ile deneyleere başlandı (Dosya No:2016/59, Ek-1).

3.2.2. Tip 1 Diyabet İndüksiyonu ve Deney Protokolü

Tip 1 diyabet indüksiyonu, 16-18 saat aç bırakılmış sıçanlara intraperitoneal (i.p) yoldan 75 mg/kg dozda STZ uygulaması ile yapıldı. STZ, uygulamadan hemen önce sitrat tamponu (50 mM, pH: 4.5) içerisinde çözüldü. Nondiyabetik deney gruplarındaki hayvanlara i.p yoldan sitrat tamponu uygulandı. STZ uygulamasını takiben üç gün boyunca ani hipoglisemiye bağlı ölüm riskini azaltmak için sıçanların içme suyuna %5 oranında glukoz eklendi. Dördüncü gün 16-18 saat aç bırakılmış sıçanların kuyruk veninden kan örneği alınarak Accu-Chek® Active kan glukozu ölçüm cihazı ve ölçüm stripleri ile kan glukoz düzeyleri tespit edildi. Kan glukoz düzeyi 250 mg/dL'nin üzerinde olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Randomize olarak deney gruplarına ayrılan sıçanların bilgileri tasarlanan bir etikete kaydedildi ve etiket kafeslere yerleştirildi (Resim 1). Kan glukoz ölçümü yedinci gün tekrarlandı. Diyabet indüksiyonundan 8 hafta sonra, aşağıdaki tabloda belirtilen tedavi gruplarına göre sıçanlara 4 hafta süreyle ilaç uygulaması yapıldı (Tablo 1) (123). NZ ve selektif Wnt/ β -katenin yolağı inhibitörü XAV939; %1 DMSO, %5 Tween 80 ve fosfat tamponlu salinden oluşan taşıyıcı içerisinde verildi. Son kan glukoz ölçümü, 12.hafta sonunda in vivo deneyleer öncesinde yapıldı. Tedavi süresinin sonunda diyabetik ED'de tedaviye bağlı iyileşme olup olmadığı fonksiyonel olarak in vivo intrakavernozal basınç (İKB) ölçümü ile değerlendirildi. Deney hayvanlarında İKB, sistemik kan basıncına göre değerlendirildiği için İKB ile eş zamanlı olarak ortalama arteriyel kan basıncı (OAB) ölçüldü. Hayvanların vücut ağırlıkları her hafta ölçüldü ve kaydedildi. Kan basıncı verileri, sol karotid artere yerleştirilen kanül sonrası 60 sn'lik süredeki OAB hesaplanarak kaydedildi. Fonksiyonel ölçümler sonunda sıçanların penis ve MPG dokuları western blot analizleri için toplandı ve -80°C'de saklandı.

Anabilim dalı/Fakülte: _____ Etik kurul protokol no:# _____

Sorumlu araştirmacı: _____ İletişim : _____

Tarih:	Tür:	Cinsiyet:	Grup:
		<input type="checkbox"/> ♀ <input type="checkbox"/> ♂	

• Özel bakım uyarıları:

• Açıklamalar:

Proje no:# _____



Resim 1. Deney hayvanlarına ait bilgi kaydı için tasarlanmış kafes etiketi

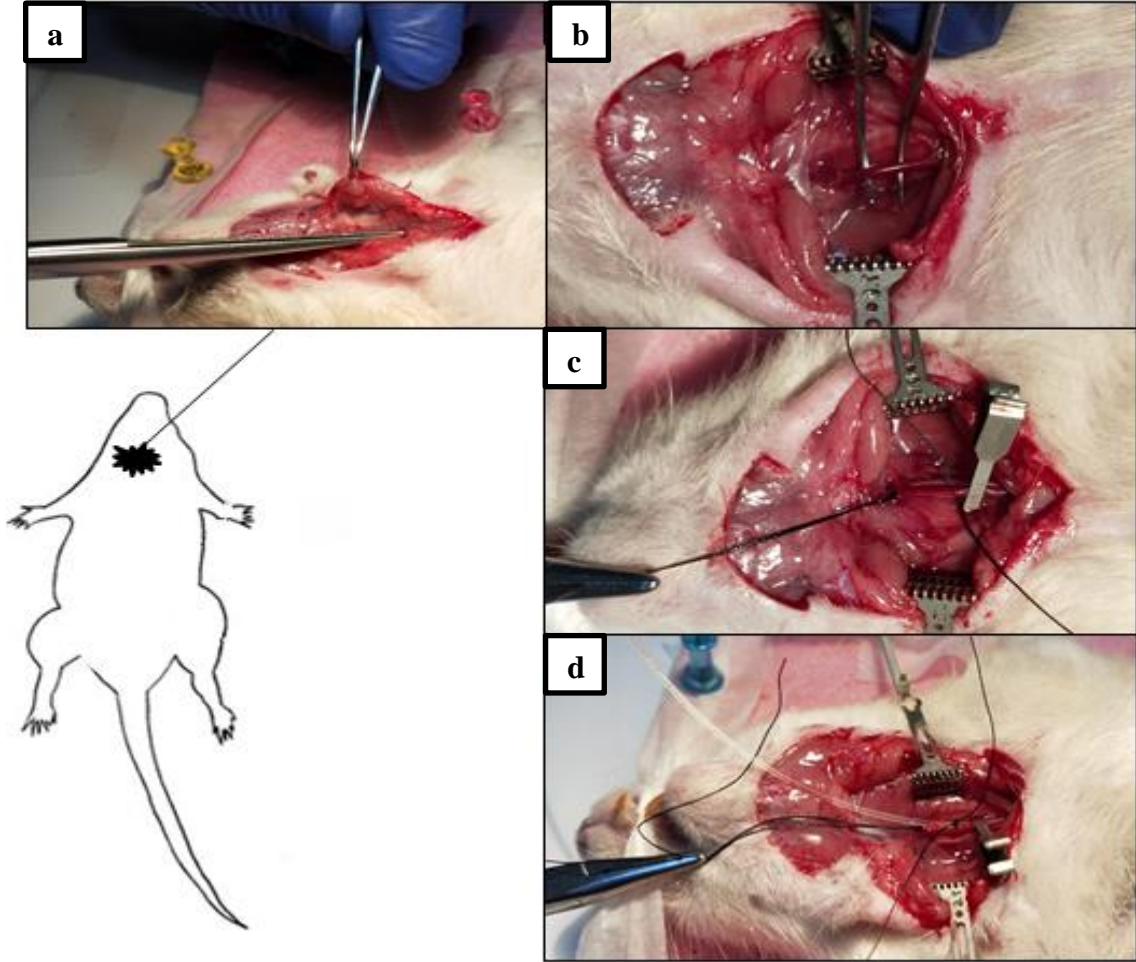
Tablo 1. Deney grupları

Deney Grupları	Hayvan sayısı (n)
Nondiyabetik+Taşıyıcı	7
Diyabetik+Taşıyıcı	6
Diyabetik+NZ (10 mg/kg)	6
Diyabetik+NZ (25 mg/kg)	7
Diyabetik+XAV939 (1 mg/kg)	6
Nondiyabetik+ NZ (10 mg/kg)	5
Nondiyabetik+ NZ (25mg/kg)	6
Nondiyabetik+XAV939 (1 mg/kg)	5
Toplam	48

3.2.3. İn vivo OAB Ölçümü

Ketamin/ksilazin (80 mg/kg, 5 mg/kg i.p.) anestezisi altında spin pozisyonunda yatırılan sıçanların ekstremite ve çeneleri sabitlendi. Boyun bölgesi traş edildi ve boyun insizyonu ile kas tabakaları dikkatlice ayrılarak trakeanın komşuluğundaki sol karotid arter tespit edildi (Resim 2a ve 2b). Karotid arter, çevredeki sinir liflerine zarar vermeden vagus

sinirinden ayrıldı ve arterin kranial ucu ipek iplik yardımıyla bağlanarak cerrahi pens yardımıyla askıya alındı (Resim 2c). Arterin kardiyak ucu klemp ile sıkıştırıldı ve böylece kan akımının durdurulduğu yaklaşık bir cm'lik alanın ipele bağlı ucuna yakın bir noktaya ince bir damar makası ile kesi atıldı. Bu kesiden diğer ucu basınç transdüserine bağlı olan ucu açılı olarak kesilmiş 250 U/mL heparin içeren polietilen 50 (PE-50) kanül yerleştirdi (Resim 2d).

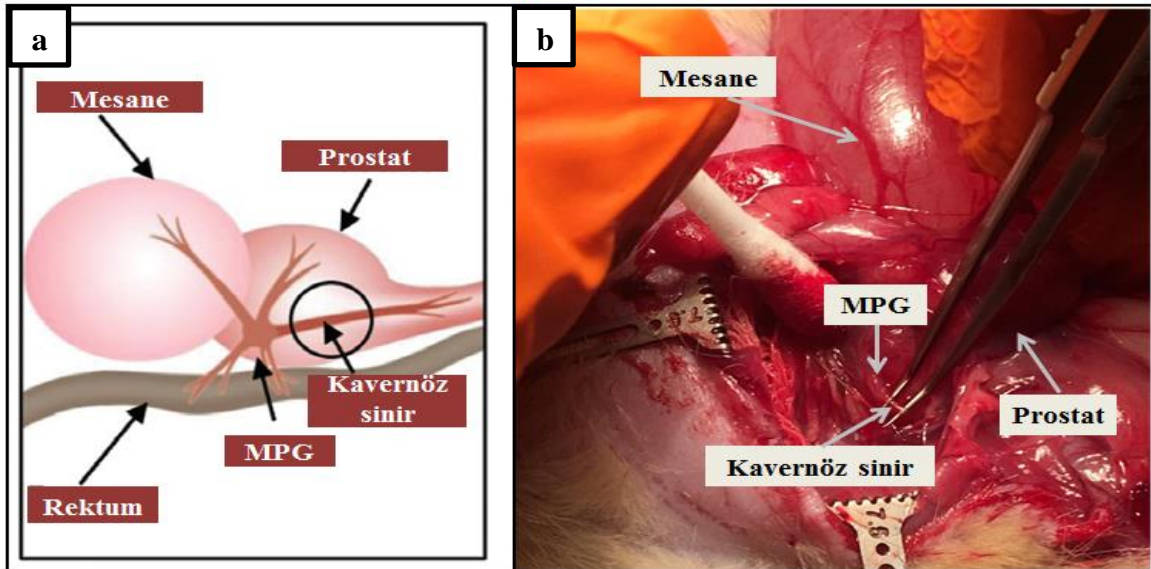


Resim 2. İn vivo OAB ölçümü. (a) Boyun insizyonu, (b) Sol karotid arterin tespiti, (c) Karotid arterin iki ucunun sıkıştırılması ve arterin askıya alınması, (d) PE-50 kanülün karotid artere yerleştirilmesi.

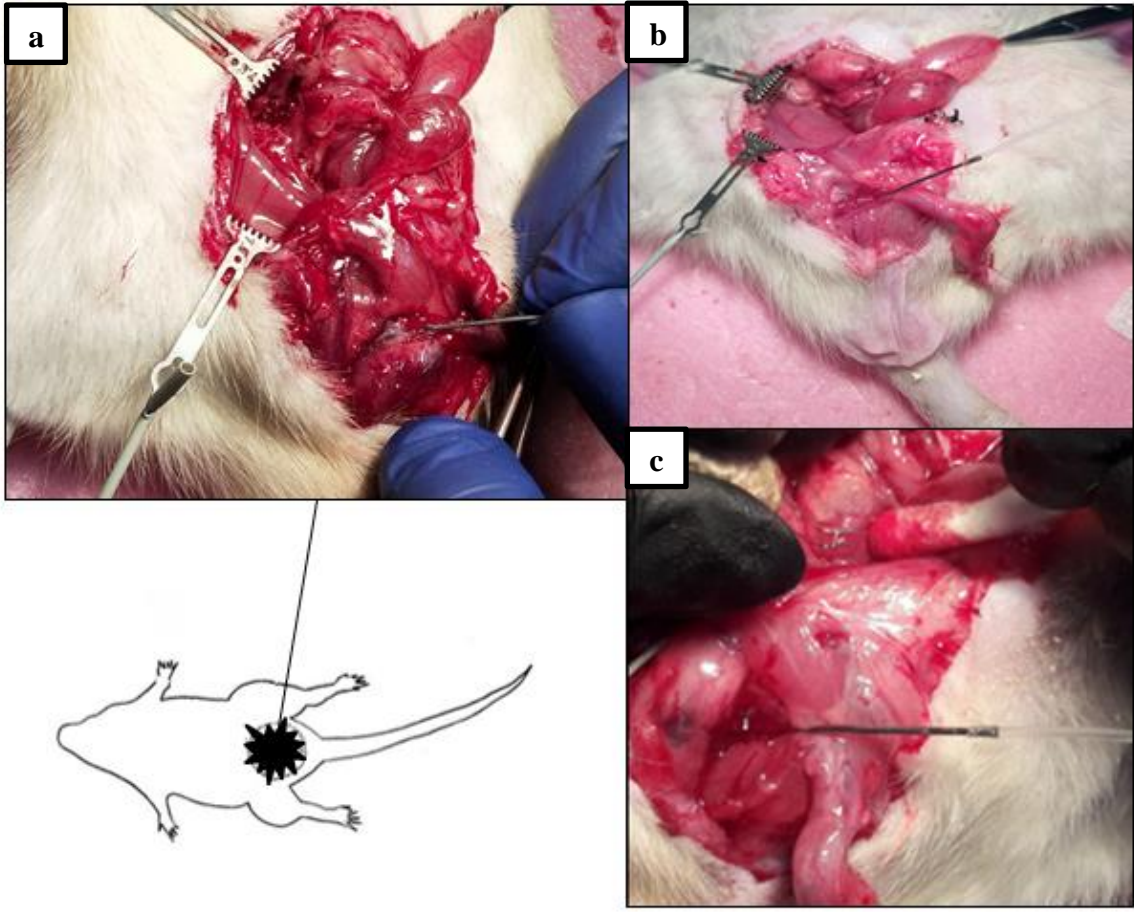
3.2.4. İn vivo İKB ölçümü

Sıçanlarda MPG ve buradan çıkan kavernöz sinir, penisin periferik inervasyonunda oldukça önemlidir (Resim 3) (124). İKB ölçümünde ereksiyon kavernöz sinirin elektriksel uyarımı ile oluşturuldu. Anestezi altında spin pozisyonunda yatırılmış ve sabitlenmiş

sıçanların vertikal abdominal orta hat insizyonu ile mesaneleri tesipt edildi. Mesane klemp yardımıyla laterale yatırıldı ve sabitlendi. Testisler yukarı retrakte edildi ve üst abdomen içine yerleştirildi. Prostat bezinin dorsolateralinde bulunan sağ MPG ve kavernöz sinir çevre dokulara zarar vermeden tespit edildi. Ardından alt abdominal bir kesiyle devam edilerek penis tamamen disekte edildi ve serbestleştirildi. Sağ korpus ince bir damar makasıyla iskiokavernöz kasta izole edildi (Resim 4a). Ucunda 27-G iğne bulunan ve diğer ucu basınç transdüserine bağlı 250 U/mL heparin içeren PE-50 kanül sağ korpusa tek hamlede yerleştirildi (Resim 4b). Kanül yardımıyla korpus içine heparinli serum fizyolojik gönderilerek sızdırma kontrolü yapıldı ve kanülün yerleşimi doğrulandı. Deney süresince basınç transdüserinin bağlı olduğu veri kayıt sistemi (BIOPAC MP35) aracılığı ile İKB (mmHg) ölçümü sağlandı. Kanül yerleştirildikten sonra ardından kavernöz sinir bir pens yardımıyla platin bipolar elektrodların (Grass Technologies, NC0578021) üzerine yerleştirildi (Resim 4c). Elektrodlar kablo ile stimülatöre (MAY ST95PT) bağlandı ve stimülasyon parametreleri 16 Hz, 1 ms duration, 1-4 ve 8 volt, 60 sn boyunca olacak şekilde ayarlandı. Her bir elektriksel stimülasyon uygulaması arasında üçer dk'lık interval bırakıldı. Her hayvan için 1,4 ve 8 volt değerlerine ait maksimum İKB/OAB (mİKB/OAB) ve İKB eğri altında kalan alan/OAB (total İKB/OAB) oranları hesaplandı ve erektil fonksiyonun göstergesi olarak kabul edildi.



Resim 3. MPG ve kavernöz sinirin (a) şematik gösterimi (Piao'dan, 125) ve (b) sıçanlarda anatomik yerleşimi



Resim 4. İn vivo İKB ölçümü. (a) Sağ korusun tespiti, (b) Korpusa kanülün yerleştirilmesi, (c) Bipolar platin elektrod ile kavernöz sinirin elektriksel stimülasyonu.

Fonksiyonel ölçümler tamamlandıktan sonra yaklaşık 30-60 sn içinde sağ ve sol MPG, 1-3 dk arasında ise penis dokuları çıkarıldı ve sıvı azotta hızlıca donduruldu. Western blot çalışmaları için -80°C 'de saklandı.

3.2.5. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

3.2.5.1. Total Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Deney hayvanından izole edilmiş ve -80°C 'de saklanmış penis buz üzerine yerleştirilmiş tüp içine aktarıldı ve üzerine 1 mL homojenizasyon tamponu ilave edildi. Cerrahi makas yardımıyla penis küçük parçalara ayrıldı. Ardından homojenat içeren tüp, buz ile doldurulmuş kap içerisine yerleştirildi ve homojenizatör ile 20 000 rpm'de 5 kez 5 sn aralıklarla 10 sn homojenize edildi. Bu işlemten sonra homojenatlar $10\ 000\times g$ 'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de

30 dk santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe alındı ve küçük hacimlerde alikotlanarak analiz gününe kadar -80°C 'de saklandı.

Deney hayvanından izole edilmiş ve -80°C 'de saklanmış her bir sıçanın sağ ve sol MPG dokuları buz üzerine yerleştirilmiş tüp içerisinde birleştirildi ve üzerine 100 μL homojenizasyon tamponu ilave edildi. MPG, cerrahi makas yardımıyla parçalandı. Ardından homojenat içeren tüp, buz ile doldurulmuş kap içerisine yerleştirildi ve sonikatör ile 20 kHz frekansta 3 kez 5 sn aralıklarla homojenize edildi. Bu işlemden sonra homojenatlar 10 000xg'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe alındı ve küçük hacimlerde alikotlanarak analiz gününe kadar -80°C 'de saklandı.

3.2.5.2. Sitozolik ve Nükleer Fraksiyon için Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Sitozolik ve nükleer fraksiyonlarına ayırma işlemi Dimaura ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak yapıldı (109). Nondiyabetik+Taşıyıcı ve Diyabetik+Taşıyıcı gruplarına ait penis dokuları ayrı ayrı buz içerisine yerleştirilmiş tüplere aktarıldı ve üzerlerine 800 μL S tamponu ilave edildi. Cerrahi makas yardımıyla penis küçük parçalara ayrıldı. Homojenat 30 dk buz içerisinde bekletildi ve ardından 15 sn vortekslendi. 800xg'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe alındı, sitozolik fraksiyon olarak işaretlendi ve alikotlanarak analiz gününe kadar -80°C 'de saklandı. Pellet üzerine S tamponu eklendi, vorteklendi ve 500xg'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerinde aynı işlem tekrarlandı. Pellet üzerine S tamponu eklenerek 1000xg'de 15 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 200 μL N tamponu eklenerek resüspande edildi, 15 sn vortekslendi ve sonra 30 dk buzda bekletildi. Sonikatör ile 20 kHz frekansta 3 kez 10 sn homojenize edildi. Ardından 9000xg'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk santrifüj edildi.

Nondiyabetik+Taşıyıcı ve Diyabetik+Taşıyıcı gruplarına ait her bir sıçanın sağ ve sol MPG dokuları buz üzerine yerleştirilmiş tüp içerisinde birleştirildi ve üzerine 100 μL S tamponu ilave edildi. MPG, cerrahi makas yardımıyla parçalandı. Homojenat 30 dk buz içerisinde bekletildi ve ardından 15 sn vortekslendi. 800xg'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe alındı, sitozolik fraksiyon olarak işaretlendi ve alikotlanarak analiz gününe kadar -80°C 'de saklandı. Pellet üzerine S tamponu eklendi, vorteklendi ve 500xg'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerinde aynı işlem tekrarlandı. Pellet üzerine S tamponu eklenerek 1000xg'de 15 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 50 μL NT tamponu eklenerek resüspande edildi, 15 sn vortekslendi ve sonra 30 dk buzda bekletildi. Sonikatör ile 20 kHz frekansta 3

kez 10 sn homojenize edildi. Ardından 9000xg'de +4°C'de 30 dk santrifüj edildi. Süpernat yeni bir tüpe alındı, nükleer fraksiyon olarak işaretlendi ve küçük hacimlerde alikotlanarak analiz gününe kadar -80 °C'de saklandı.

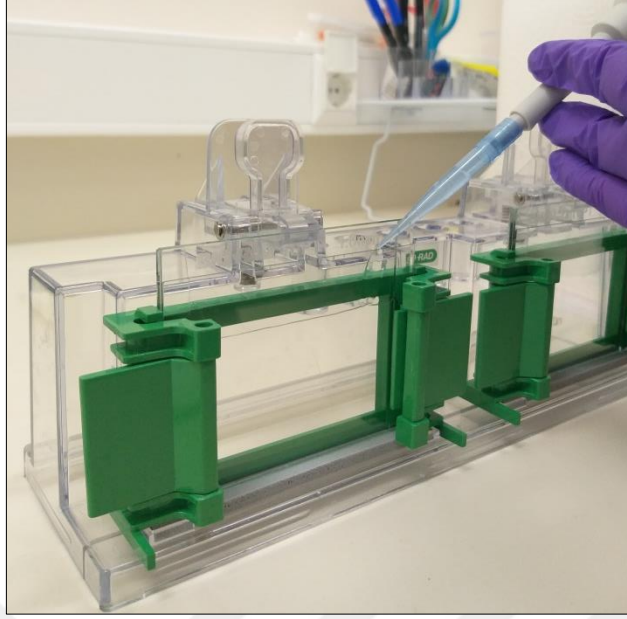
3.2.6. Total Protein Tayini

Doku homojenatlarının total protein konsantrasyonu, BCA protein konsantrasyonu ölçüm kiti (Thermo Scientific) kullanılarak firmanın önerdiği şekilde ölçüldü. Stok BSA (2 mg/mL) çözeltisinden hareketle 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL'lik BSA standart çözeltileri hazırlandı. Kitte bulunan Solüsyon A ve Solüsyon B 50:1 oranında karıştırılarak çalışma çözeltisi hazırlandı. BSA standartları ile birlikte protein konsantrasyonu belirlenmek istenen homojenatlardan 25 µL çift tekrar olacak şekilde mikrolaka kuyucuklarına eklendi. Örneklerin üzerine 200 µL çalışma çözeltisi ilave edildi. Mikrolaka kapatılarak hafifçe çalkalandı ve 37°C su banyosunda 30 dk inkübe edildi. Bu sırada yeşil renk olan çalışma solüsyonu protein varlığında zamanla mora dönmektedir. Bu renk değişimi absorbansı 562 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucuda ölçüldü ve BSA standartlarının absorbanslarından yararlanılarak konsantrasyon-absorbans grafiği çizildi ve grafik denklemi belirlendi. Örneklerin absorbansları grafik denklemine yerleştirildi ve her bir örnek için total protein miktarı mg/mL cinsinden hesaplandı.

3.2.7. Western Blot Yöntemi

3.2.7.1. Jellerin Hazırlanması

Jel dökme camları jel standına yerleştirildi ve jel içeriği *TGX Stain-Free FastCast %10 Acrylamide Kit* kullanılarak hazırlandı. Ayırma jelinin hazırlanması için kit içerisindeki *resolver A* ve *B* solüsyonlarında 3'er mL alınıp tüpte karıştırıldı. Bu karışıma 30 µL %10'luk APS çözeltisi ve 3 µL TEMED ilave edildi. Ayırma jeli karışımı jel dökme camları arasına üst kısımdan 2 cm kalana kadar döküldü. Yükleme jelinin hazırlanması için kit içerisinde bulunan *stacker A* ve *B* solüsyonlarından 1'er mL alınıp tüpte karıştırıldı. Bu karışıma 10 µL %10'luk APS çözeltisi ve 2 µL TEMED ilave edildi. Hazırlanan yükleme jeli kısa camın üzerine çıkacak şekilde döküldü (Resim 5). Ardından camlar arasına her bir kuyucuğu 50 µL hacimli 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi. Polimerizasyon işlemi için jeller 30 dk stantta bekletildi.



Resim 5. Jel dökme işleminin gösterimi

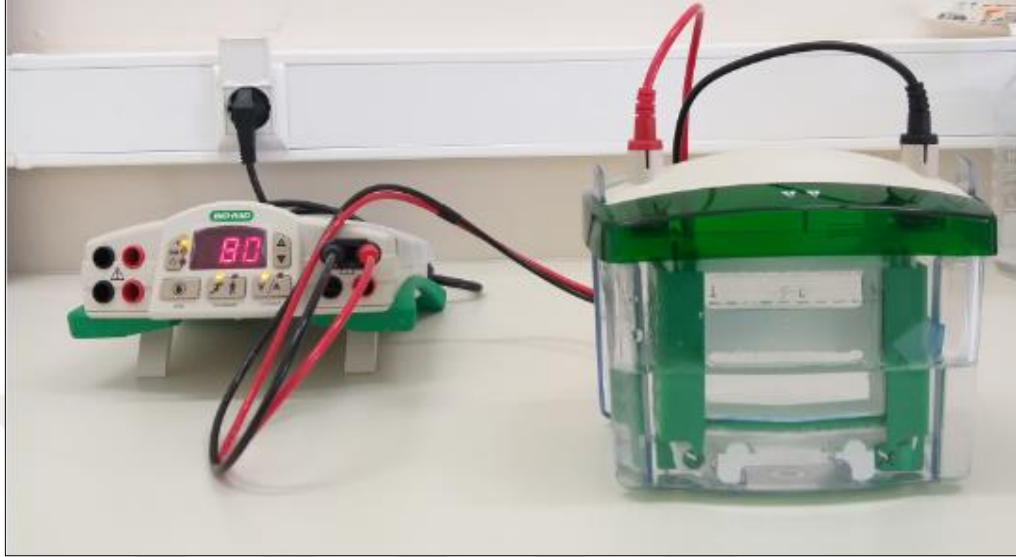
3.2.7.2. Örneklerin Hazırlanması

-80°C'den çıkarılan ve buz üzerinde muhafaza edilen penis ve MPG homojenatlarından jeldeki her bir kuyucuğa eşit miktarda 30 µg protein yükleyebilmek için gerekli hesaplamalar yapıldı. Hesaplanan hacimde mikrosantrifüj tüplerine alınan homojenatlar üzerine 5X yükleme tamponundan eklendi ve son hacim 30 µL olacak şekilde 1X'e deiyonize su ile seyreltildi. Örnekler vortekslendi ve ardından 2-3 sn santrifüjlendi. Ardından protein denatürasyonu için örnekler kaynamakta olan suyun üzerine konuldu ve 5 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda örnekler vortekslendi, 2-3 sn santrifüjlendi ve yüklemeye hazır hale getirildi.

3.2.7.3. Elektroforez

Hazırlanan jeller deiyonize suyla yıkandı ve yüklemeyi kolaylaştırmak için kuyucukların dipleri asetat kalemiyle işaretlendi. Ardından jeller elektroforez tankına yerleştirildi ve jeller arasına yürütme tamponu dökülerek sızdırma kontrolü yapıldı. Tank gerekli seviyeye kadar yürütme tamponu ile dolduruldu. Jellerin tarakları çıkarıldı ve kuyucukların üzerini örtecek şekilde yürütme tamponu ilave edildi. Her jelin ilk kuyucuğuna 3 µL molekül ağırlık markörü ve diğer kuyucuklara 30 µL'lik örnekler yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra tank güç kaynağına bağlandı ve 80 volta ayarlanarak elektroforez başlatıldı. Yükleme tamponu ile mavi renk alan örneklerin

elektroforez sırasında jeldeki sürüklenmeleri izlendi ve uygun noktada elektroforez sonlandırıldı. (Resim 6).

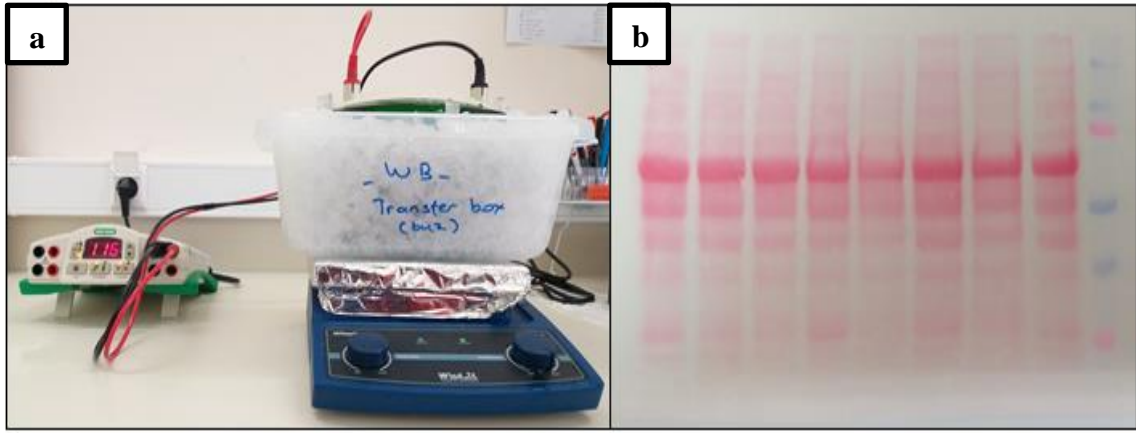


Resim 6. Elektroforez işleminin gösterimi

3.2.7.4. Jelden Membrana Transfer İşlemi

Jeldeki örneklerin transferi için poliviniliden florür (PVDF) membranlar kullanılarak ıslak transfer yöntemi uygulandı. PVDF membranlar uygun boyutta kesildi ve 5-10 dk metanol içerisinde orbital çalkalayıcıda bekletildi ve transfere hazır hale getirildi. Metanolden çıkarılan membranlar soğuk transfer tamponu içerisinde 15 dk 60 rpm devirde orbital çalkalayıcıda bekletilerek doygunluğa ulaşması sağlandı. Elektroforez sonrasında jeller tanktan çıkarıldı, deiyonize suyla yıkandı ve kısa cam altta kalacak şekilde temiz bir yere bırakıldı. İnce bir spatula yardımıyla camlar birbirinden dikkatlice ayrıldı. Jel üzerindeki fazlalık bölgeler temiz bir jilet yardımıyla kesildi ve jel soğuk transfer tamponuyla doldurulmuş bir kaba aktarıldı. İçinde soğuk transfer tamponu bulunan başka bir kaba transfer kaseti yerleştirildi. Kasetin siyah yüzeyine sırasıyla iki adet transfer tamponuyla ıslatılmış transfer süngeri ve bir adet whatmann kağıdı yerleştirildi. Bir adet ıslak whatmann kağıdı yardımıyla jel alınarak kaset üstündeki whatmann kağıdının üzerine yerleştirildi ve ardından PVDF membran hava kabarcığı kalmayacak şekilde jelin üzerine yerleştirildi. Son olarak membran üzerine transfer tamponuyla ıslatılmış iki adet whatmann kağıdı ve transfer süngeri konularak kaset içeriği tamamlandı. Kasetler, transfer tamponu

ile dolu tankın içerisine siyah yüzeyi anota, şeffaf yüzeyi katoda gelecek şekilde yerleştirildi. Buz aküsü ve balık konulan tank , manyetik karıştırıcı üzerindeki buz dolu bir kap içerisinde 80 voltta 2 saat transfer işlemine bırakıldı (Resim 7a). Transfer sonrasında, transfer işleminin doğruluğunun kontrolü için membranlar Ponceau S çözeltisiyle boyandı (Resim 7b). Membranda protein bantları görünür hale geldiğinde membranlar deiyonize suyla yıkanarak Ponceau S çözeltisi uzaklaştırıldı. Ardından membranlar metanolle 5-10 sn yıkandı ve oda sıcaklığında 15 dk kurumaya bırakıldı. Membranlar kuruduktan metanolle ıslatıldı ve 3 kere 10'ar dk TBS-T çözeltisiyle yıkandı.



Resim 7. Jelden membrana transfer işlemi (a) Islak transfer işlemi gösterimi, (b) Transfer işleminden sonra Ponceau S ile boyanan PVDF membran görüntüsü

3.2.7.5. Bloklama

Membranlar, TBS-T ile yıkama işleminin ardından spesifik olmayan bağlantı bölgelerini kapatmak için %0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisi içinde hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu içinde üstü kapalı olacak şekilde çalkalayıcıda 90 dk bloklama işlemine tabi tutuldu.

3.2.7.6. Antikorla İşaretleme

Primer antikorlar, %0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisi içinde hazırlanan %3'lük BSA içerisinde kullanım kılavuzlarında önerilen konsantrasyonlarda hazırlandı. Dilüsyon oranları parantez içerisinde belirtilmiştir. Membranlar, DKK1 (1:500), fibronectin (1:1000), kaspaz-3 (1:1000), Lamin B1 (1:5000), fosforile GSK3 β (1:1500), non-fosforile- (aktif)- β -katenin (1:2000), β -tübülin (1:3000) primer antikorları ile +4°C'de 20

rpm devirde orbital çalkalayıcıda gece boyunca inkübasyona bırakıldı. β -tübülün yükleme kontrolü olarak kullandı. Lamin B1 ise nükleer fraksiyonda yapılan çalışmalarda yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

Primer antikorla inkübasyondan sonra membranlar oda sıcaklığında 3 kez 10 dk TBS-T çözeltisi ile yıkandı. Yıkamanın ardından membranlar Anti-rabbit IgG HRP-linked sekonder antikor (1:5000) ile 20 rpm devirde orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikor çözeltisi %0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisi içinde hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu içerisinde hazırlandı.

3.2.7.7. Görüntüleme

Sekonder antikor inkübasyonu tamamlandıktan sonra membranlar 3 kez 10 dk TBS-T çözeltisi ile yıkandı. Yıkamanın ardından membran temiz bir pens yardımıyla bir kaba alındı ve ardından 0.8 mL Clarity Western ECL Substrate solüsyonu (ECL solüsyonlarının 1:1 oranındaki karışımı) ile muamele edildi. Membran üzerindeki protein bantları Bio-Rad ChemiDoc™ MP görüntüleme cihazıyla görüntüledi. İşlemin ardından membranlar 3 kez 10 dk TBS-T ile oda sıcaklığında 60 rpm devirde orbital çalkalayıcıda yıkandı. Yıkamanın ardından membranlar TBS-T ile ıslatıldı, streç filme sarılarak saklandı.

3.3. İstatistiksel Analiz

Deneylemlerden elde edilen sonuçlar 'ortalama \pm ortalamanın standart hatası' olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler GraphPad Prism (Sürüm 5.01; Graphpad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Vücut ağırlıkları, kan glukoz düzeyleri ve kan basıncı verileri tek yönlü ANOVA analizinin ardından post-hoc Bonferroni testi ile değerlendirildi. Western blot sonuçları görüntü analiz programı kullanarak (Image J, NIH, ABD) densitometrik olarak değerlendirildi ve ilgili proteinin bant yoğunluğu aynı membran üstündeki β -tübülün bant yoğunluğu ile oranlanıp Nondiyabetik+Taşıyıcı grubuna göre normalize edildi. Sitozolik ve nükleer fraksiyonlardan elde edilen western blot sonuçları ise sitozolik fraksiyonlar için β -tübülün ile nükleer fraksiyonlar için ise Lamin B1 ile oranlandı. Fonksiyonel verilerin (İKB, OAB) ve protein ekspresyonlarının değerlendirilmesinde gruplar arasındaki karşılaştırmalar için student t-testi kullanıldı. Deney gruplarındaki hayvan sayısı (0.8-0.85 güç ve 0.05 oranında tip 1 hata olasılığına göre) n=5-7/grup olarak belirlendi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak kabul edildi.

*Nondiyabetik+Taşıyıcı grubundan, #Diyabetik+Taşıyıcı grubundan istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir.



4. BULGULAR

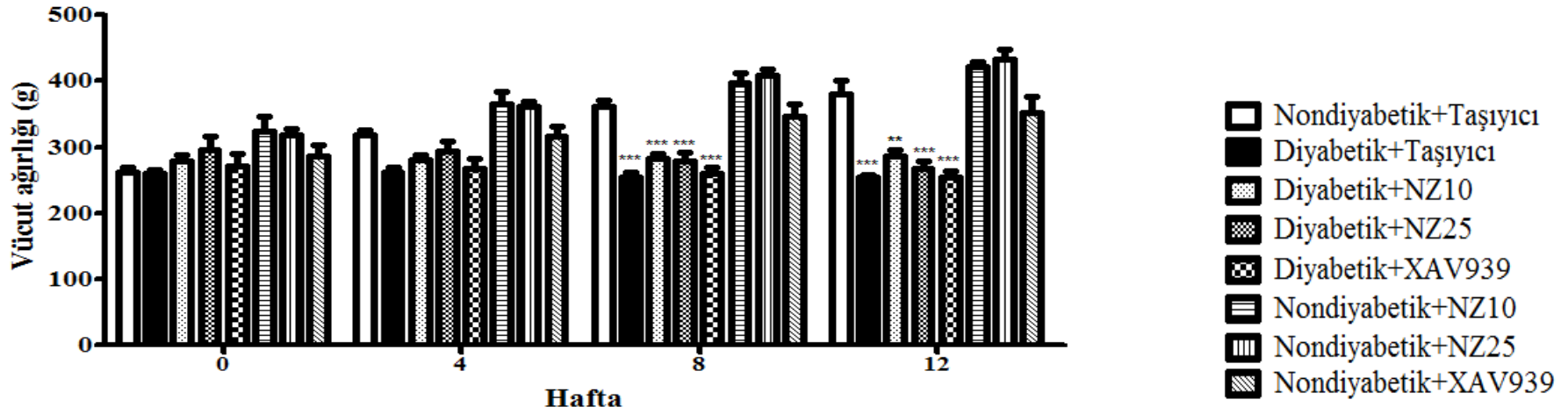
4.1. Vücut Ağırlıkları, Kan Glukoz Düzeyi ve Kan Basıncı Verileri

Sıçanlar deney gruplarına randomize olarak dağıtıldı ve deney gruplarının başlangıç (0. hafta) vücut ağırlıkları ortalamaları arasında fark bulunmadı (Tablo 2). Deney protokolü boyunca sıçanların vücut ağırlığı haftalık olarak kaydedildi ve deney gruplarının haftalara göre vücut ağırlıkları ortalamaları Şekil 16a'da verildi. Diyabetik sıçanların kilo alım hızları düşük olduğundan 12. haftanın sonunda tüm diyabetik sıçanların (tedavi edilen veya edilmeyen) vücut ağırlıkları ortalaması Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düşük bulundu. Sıçanların kan glukoz düzeyleri aylık olarak kuyruk venlerinden alınan kan örneklerinde glukometre cihazı ile tespit edildi. STZ uygulaması ile (1. hafta) kan glukoz düzeyinde anlamlı artış gözlemlendi (Şekil 16b). NZ ve XAV939 tedavilerinin bu parametreler üzerine etkisi olmadı (Şekil 16a ve Şekil 16b). Deney protokolünün ilk 4 haftası içerisinde diyabetik sıçanlarda yaklaşık %53 oranında ölüm gerçekleşti. Kayıp durumunda diyabetik gruplara yeni sıçanlar ilave edildi. Nondiyabetik gruplarda deney protokolü boyunca ölüm gözlemlenmedi.

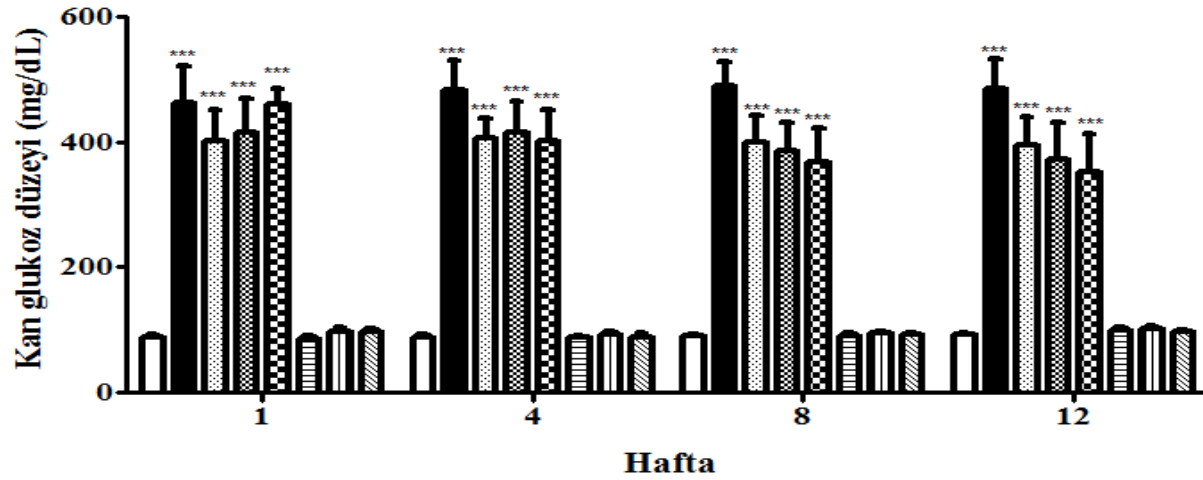
Tablo 2. Deney gruplarına ait başlangıç (0. hafta) vücut ağırlıkları ortalamaları (p>0.05)

Deney grupları	Başlangıç vücut ağırlığı (g)	Hayvan sayısı (n)
Nondiyabetik+Taşıyıcı	260.72±8.15	7
Diyabetik+Taşıyıcı	259.53±6.72	6
Diyabetik+NZ10	278.35±12.61	6
Diyabetik+NZ25	295.76±20.32	7
Diyabetik+XAV939	270.22±20.33	6
Nondiyabetik+NZ10	324.24±22.23	5
Nondiyabetik+NZ25	318.01±9.54	6
Nondiyabetik+XAV939	285.82±17.80	5

a



b



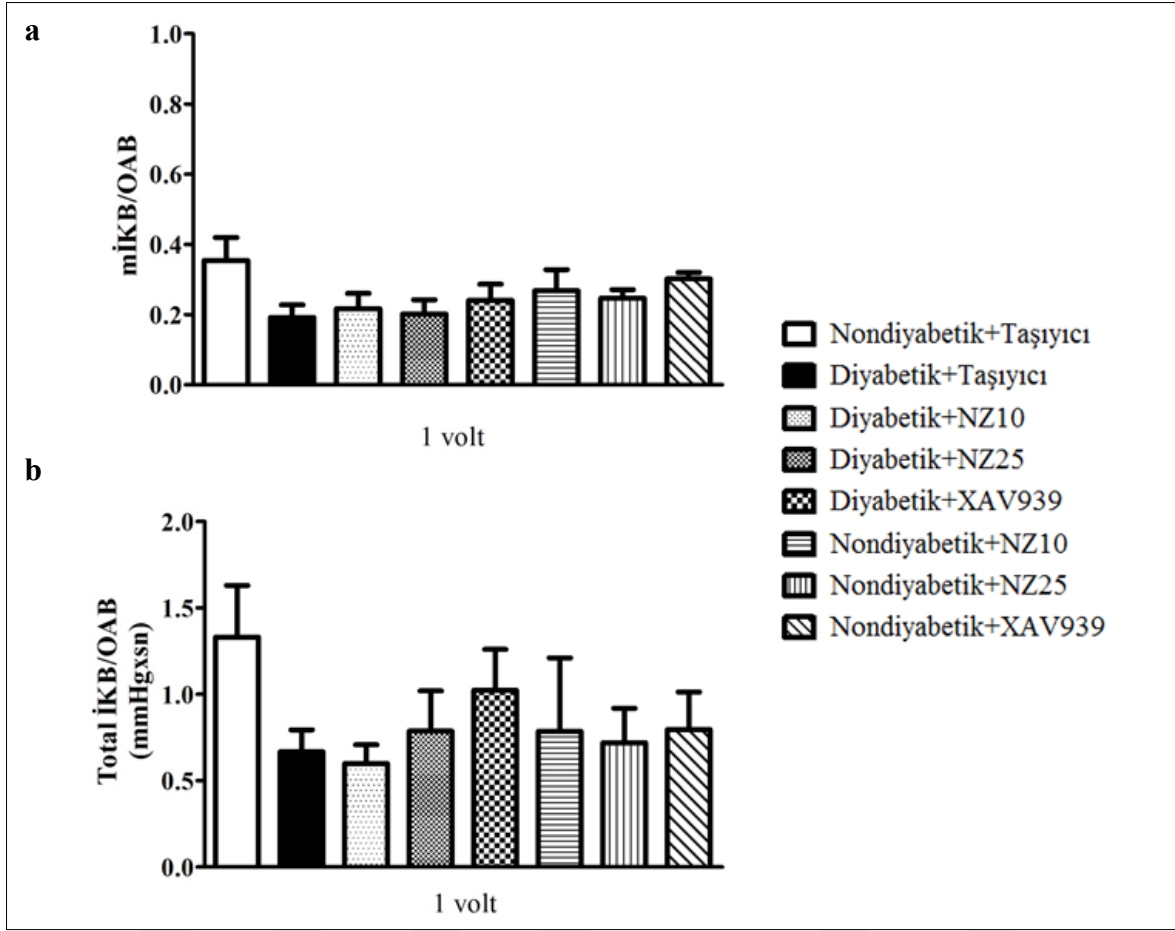
Şekil 16. Haftalara göre deney gruplarına ait (a) vücut ağırlığı ve (b) kan glukoz düzeyi ortalamaları. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir (n=5-7).

4.2. Erektıl Fonksiyon Sonuçları

Deney protokolüne göre 12. haftanın sonunda sıçanların erektıl fonksiyonu, kavernöz sinirin 1, 4 ve 8 voltluk elektrıksel stimülasyonu ile İKB lm ve bu lmlerden hesaplanan mİKB/OAB ve total İKB/OAB oranları ile değerlendirildi. Deney gruplarına ait OAB değerleri arasında fark bulunmadı (Tablo 3). Kavernöz sinirin 1 voltluk elektrıksel stimülasyonu ile elde edilen mİKB/OAB ve total İKB/OAB oranları gruplar arasında fark göstermedi (Şekil 17).

Tablo 3. Deney gruplarına ait OAB değerleri (p>0.05)

Deney grupları	OAB (mmHg)	Hayvan sayısı (n)
Nondiyabetik+Taşıyıcı	83.95±6.28	7
Diyabetik+Taşıyıcı	89.74±6.17	6
Diyabetik+NZ10	83.89±6.82	6
Diyabetik+NZ25	100.20±7.41	7
Diyabetik+XAV939	97.42±3.72	6
Nondiyabetik+NZ10	106.80±3.03	5
Nondiyabetik+NZ25	89.30±9.31	6
Nondiyabetik+XAV939	90.48±4.41	5



Şekil 17. Kavernoöz sinirin 1 voltluk elektriksel stimülasyonu ile elde edilen (a) mİKB/OAB ve (b) total İKB/OAB değerleri. $p>0.05$ (n=5-7).

Kavernoöz sinirin 1 voltluk stimülasyonu ile elde edilen mİKB/OAB ve total İKB/OAB oranlarının gruplar arası karşılaştırılması Tablo 4'te verildi.

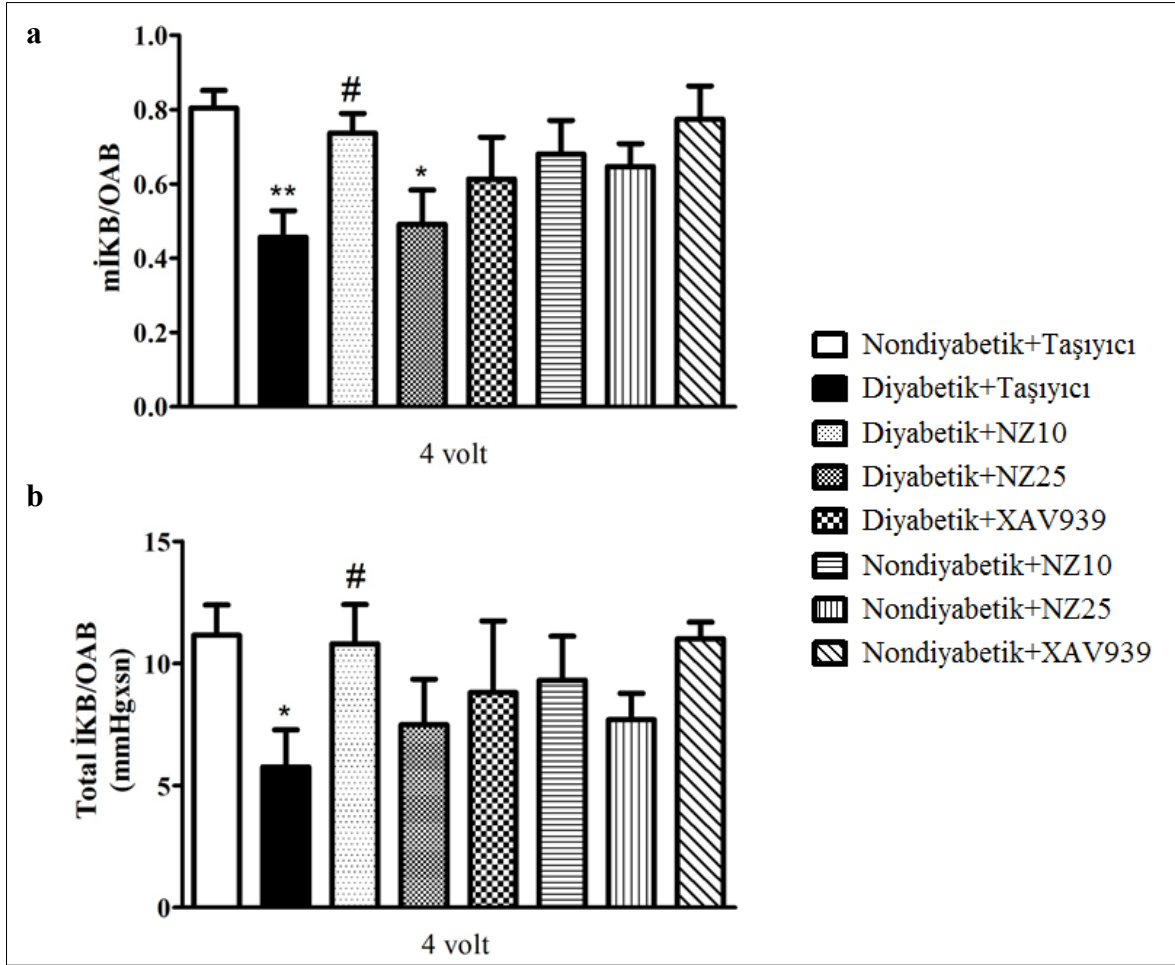
Tablo 4. 1 voltluk stimülasyona ait mİKB/OAB ve total İKB/OAB değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

mİKB/OAB	
Deney grupları	p değeri
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+Taşıyıcı	0.0615
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.1179
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.0696
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.1938

Tablo 4. (Devamı)

Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ10	0.3733
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ25	0.1747
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+XAV939	0.5251
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.6680
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.8635
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.4319
Total İKB/OAB	
Deney grupları	p değeri
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+Taşıyıcı	0.0805
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.0542
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.1766
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.4478
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ10	0.3028
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ25	0.1293
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+XAV939	0.2115
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.6931
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.6745
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.2153

4 ve 8 voltluk stimülasyonlardaki mİKB/OAB ve total İKB/OAB değerleri ise, Diyabetik+Taşıyıcı grubunda Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azaldı. Yüksek doz NZ (25 mg/kg) ve XAV939 tedavileri, diyabet nedeniyle azalan mİKB/OAB ve total İKB/OAB değerlerinde düzelmeye neden olmadı (Şekil 18 ve Şekil 19). Ancak, düşük doz NZ (10 mg/kg) ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda mİKB/OAB ve total İKB/OAB değerleri, Diyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttı (Şekil 18, Şekil 19 ve Şekil 20).



Şekil 18. Kavernöz sinirin 4 voltluk elektriksel stimülasyonu ile elde edilen (a) mİK B/OAB ve (b) total İKB/OAB değerleri. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında; # $p < 0.05$ Diyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir (n=5-7).

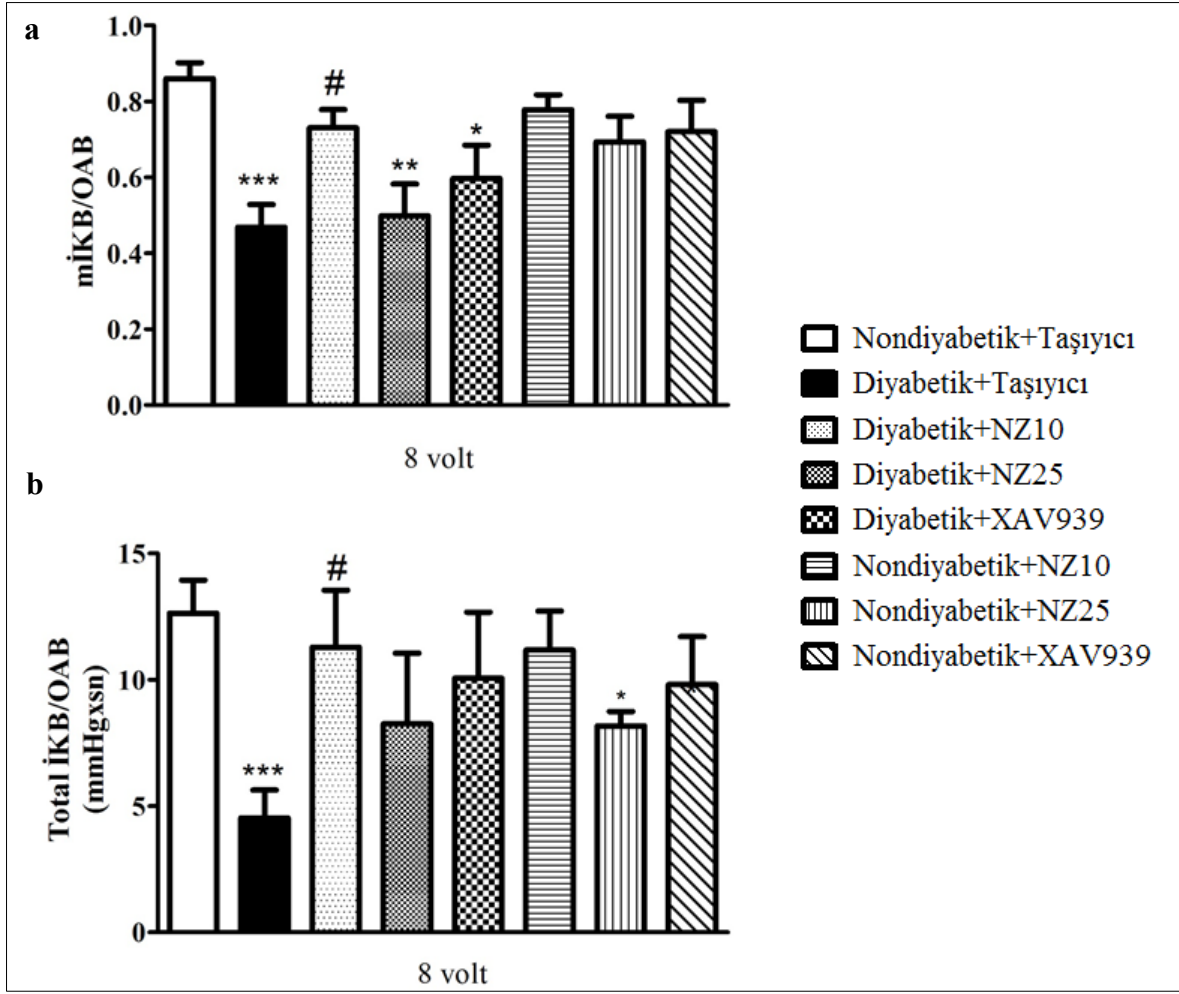
Kavernöz sinirin 4 voltluk stimülasyonu ile elde edilen mİK B/OAB ve total İKB/OAB değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması Tablo 5'te verildi.

Tablo 5. 4 voltluk stimülasyona ait mİK B/OAB ve total İKB/OAB değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

mİK B/OAB	
Deney grupları	p değeri
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+Taşıyıcı	0.0015
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.3613

Tablo 5. (Devamı)

Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.0108
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.1272
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ10	0.2182
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ25	0.0644
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+XAV939	0.7537
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.0101
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.7767
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.2666
Total İKB/OAB	
Deney grupları	p değeri
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+Taşıyıcı	0.0179
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.8629
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.1269
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.4524
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ10	0.4029
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ25	0.0630
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+XAV939	0.9286
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.0462
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.4977
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.3795



Şekil 19. Kavernoöz sinirin 8 voltluk elektriksel stimülasyonu ile elde edilen (a) mİKB/OAB ve (b) total İKB/OAB değerleri. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında; # $p < 0.05$ Diyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir (n=5-7).

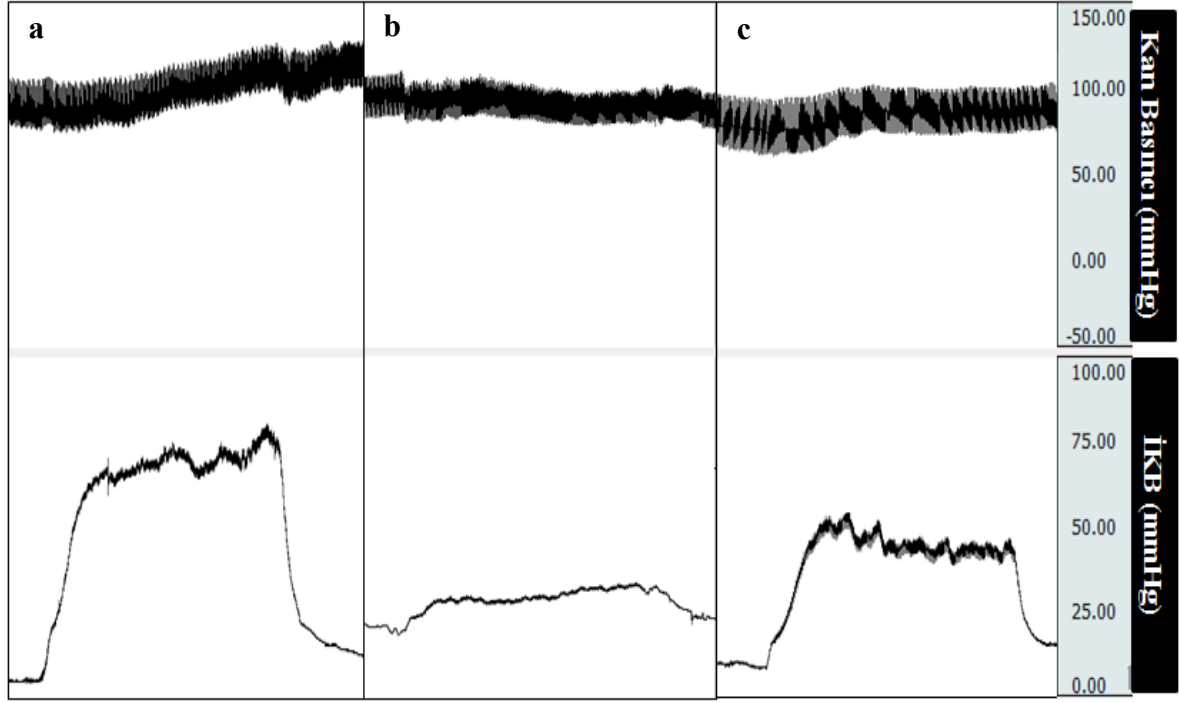
Kavernoöz sinirin 8 voltluk stimülasyonu ile elde edilen mİKB/OAB ve total İKB/OAB değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması Tablo 6'da verildi.

Tablo 6. 8 voltluk stimülasyona ait mİKB/OAB ve total İKB/OAB değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

mİKB/OAB	
Deney grupları	p değeri
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+Taşıyıcı	0.0002

Tablo 6. (Devamı)

Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.0671
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.0023
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.0163
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ10	0.2034
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ25	0.0543
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+XAV939	0.1316
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.0071
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.7822
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.2573
Total İKB/OAB	
Deney grupları	p değeri
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+Taşıyıcı	0.0007
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.6002
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.1807
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.3756
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ10	0.4865
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+NZ25	0.0212
Nondiyabetik+Taşıyıcı – Nondiyabetik+XAV939	0.2316
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ10	0.0234
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+NZ25	0.2676
Diyabetik+Taşıyıcı – Diyabetik+XAV939	0.0804



Şekil 20. (a) Nondiyabetik+Taşıyıcı, (b) Diyabetik+Taşıyıcı ve (c) Diyabetik+NZ10 gruplarına ait kavernöz sinirin 8 voltluk elektriksel stimülasyonu sırasında kaydedilen İKB ve kan basıncı veri kayıt örnekleri

4.3. Penil Dokuda Protein Ekspresyonu Sonuçları

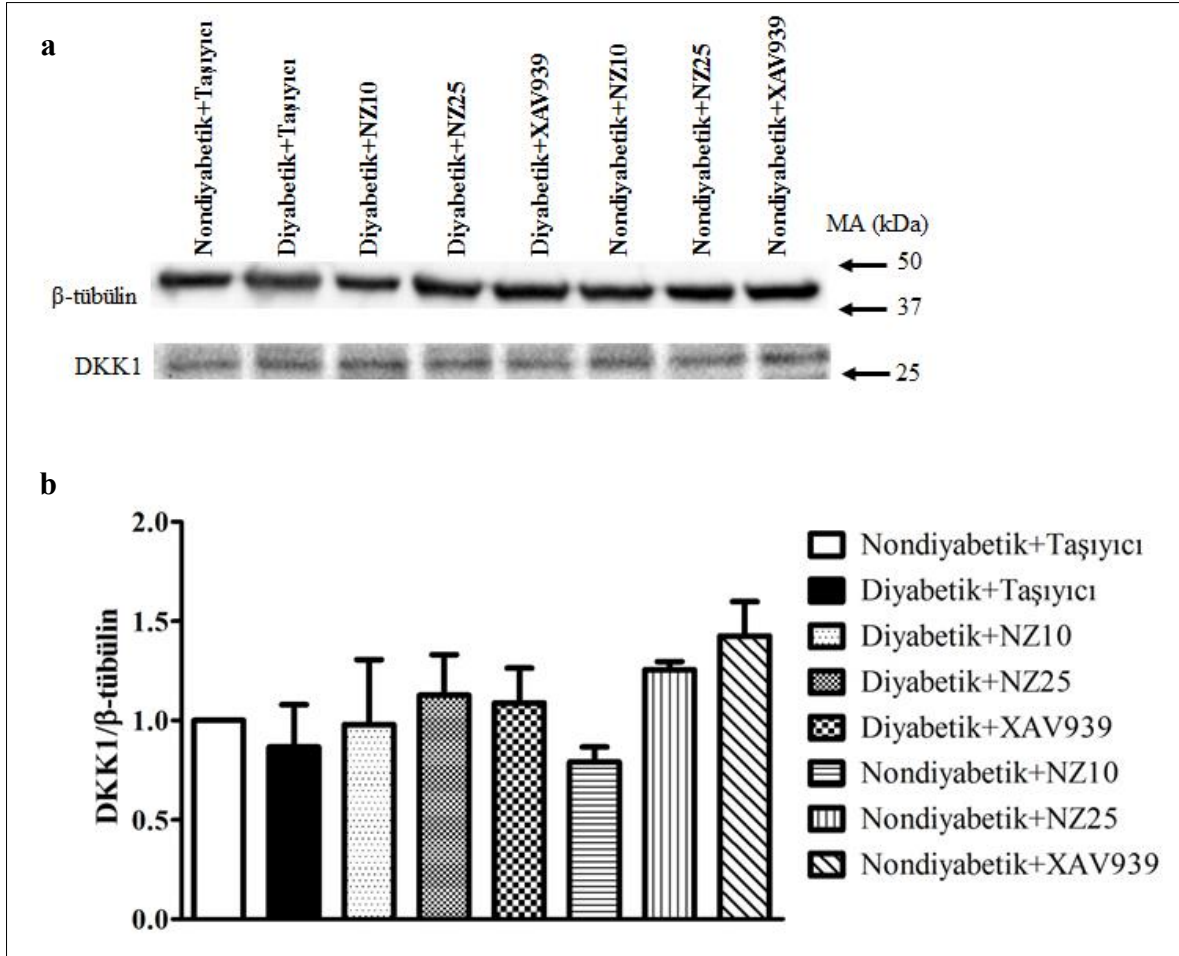
Fonksiyonel ölçümlerin ardından sıçanlardan toplanan penis dokularında Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki DKK1 (endojen Wnt yolağı ‘upstream’ antagonisti), GSK3 β ^{Ser9} (β -katenin yıkıcı kompleksinin kinaz enzimi), β -katenin (Wnt yolağı ‘downstream’ mediyatörü) ile fibronektin (fibröz protein) proteinlerinin ekspresyonu western blot yöntemi ile yarı kantitatif olarak analiz edildi ve karşılaştırıldı. Hazırlanan total doku homojenatlarında yapılan ön çalışmalarda, β -tübulin (sitzozolik protein) ve lamin B1 (nükleer protein) ekspresyonları değerlendirildi ve homojenatların sitozolik ve nükleer fraksiyonları içerdiği gösterildi (Şekil 21).



Şekil 21. Total penis homojenatlarında β -tübülün ve lamin B1 ekspresyonlarını gösteren temsili membran görüntüsü

4.3.1. Penil Dokuda DKK1 Protein Ekspresyonu

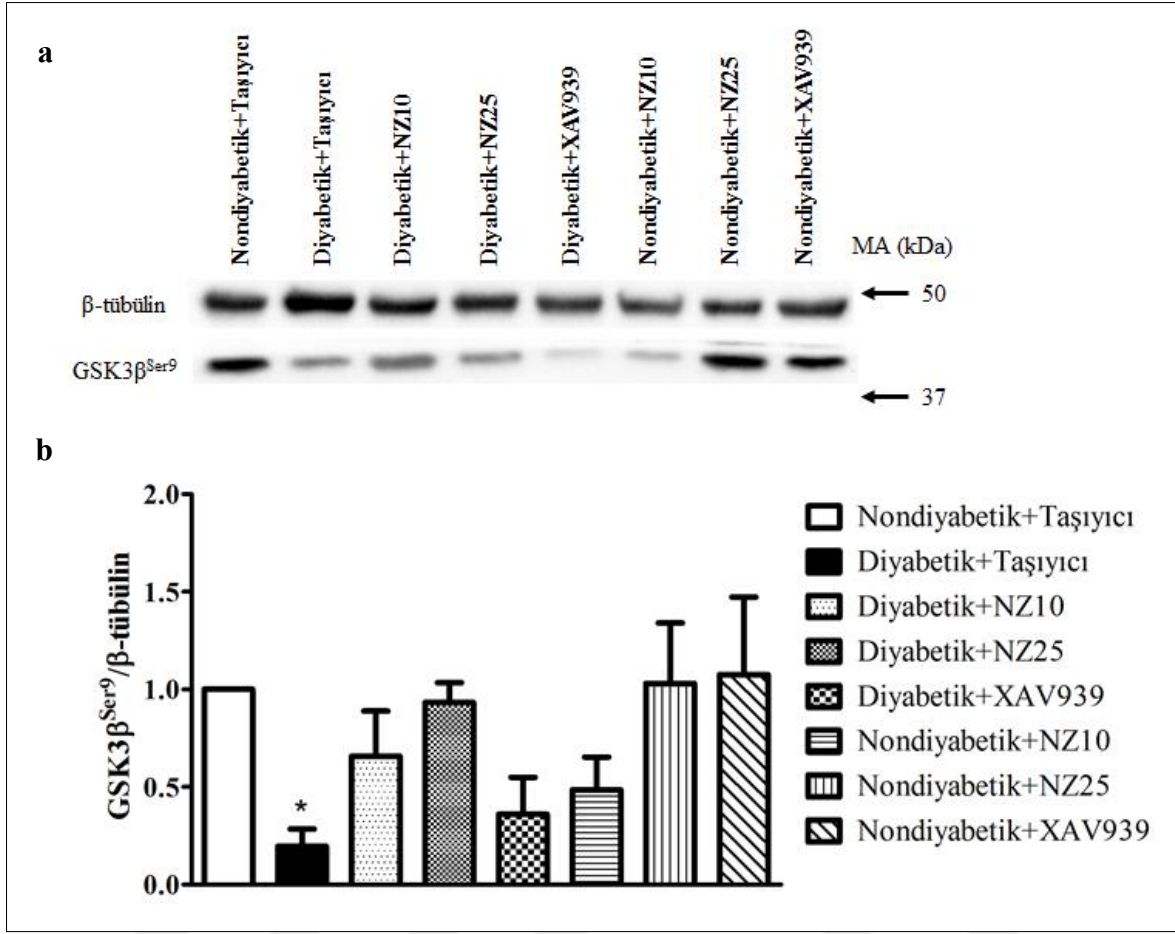
Penil doku homojenatlarında Wnt yolağı endojen inhibitörü olan DKK1 ekspresyonu araştırıldı. DKK1 ekspresyonu gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi (Şekil 22).



Şekil 22. Peniste DKK1 (29 kDa) ekspresyonu. **(a)** Temsili membran görüntüsü. **(b)** Densitometrik analiz sonuçları. $p > 0.05$ ($n=3$).

4.3.2. Penil Dokuda GSK3 β ^{Ser9} Protein Ekspresyonu

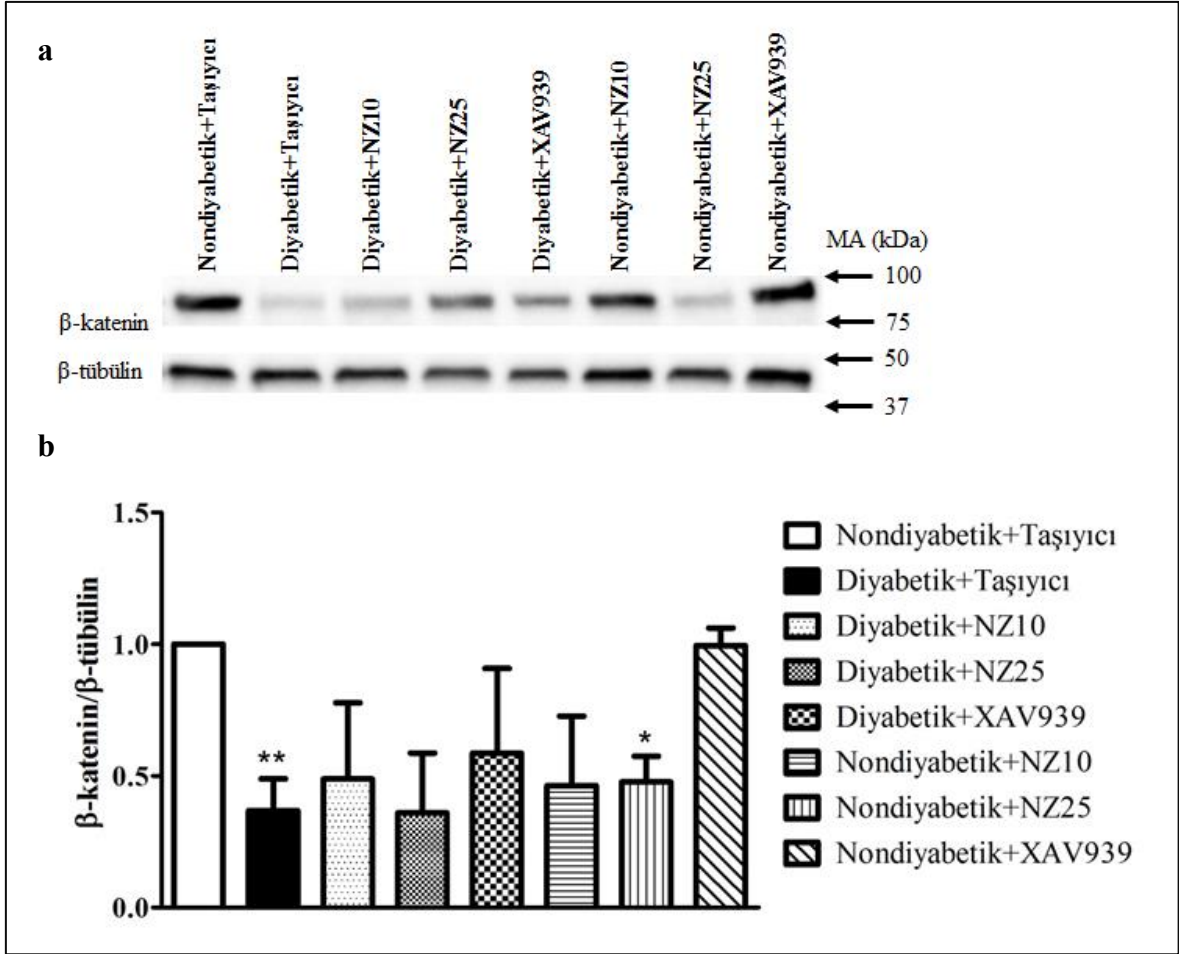
Penil doku homojenatlarında sitoplazmik β -katenin yıkıcı kompleksinin kinaz enzimi olan GSK3 β 'nin, 9. pozisyonundaki serin aminoasit rezidüsünden fosforillenmiş inaktif formunun ekspresyonu araştırıldı. Diyabetik+Taşıyıcı grubunda GSK3 β ^{Ser9} ekspresyonu Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azaldı. NZ ve XAV939 tedavilerinin bir etkisi gözlenmedi (Şekil 23).



Şekil 23. Peniste GSK3β^{Ser9} (inaktif GSK3β, 46 kDa) ekspresyonu. **(a)** Temsili membran görüntüsü. **(b)** Densitometrik analiz sonuçları. *p<0.05 Nondiabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir (n=3-4).

4.3.3. Penil Dokuda β-katenin Protein Ekspresyonu

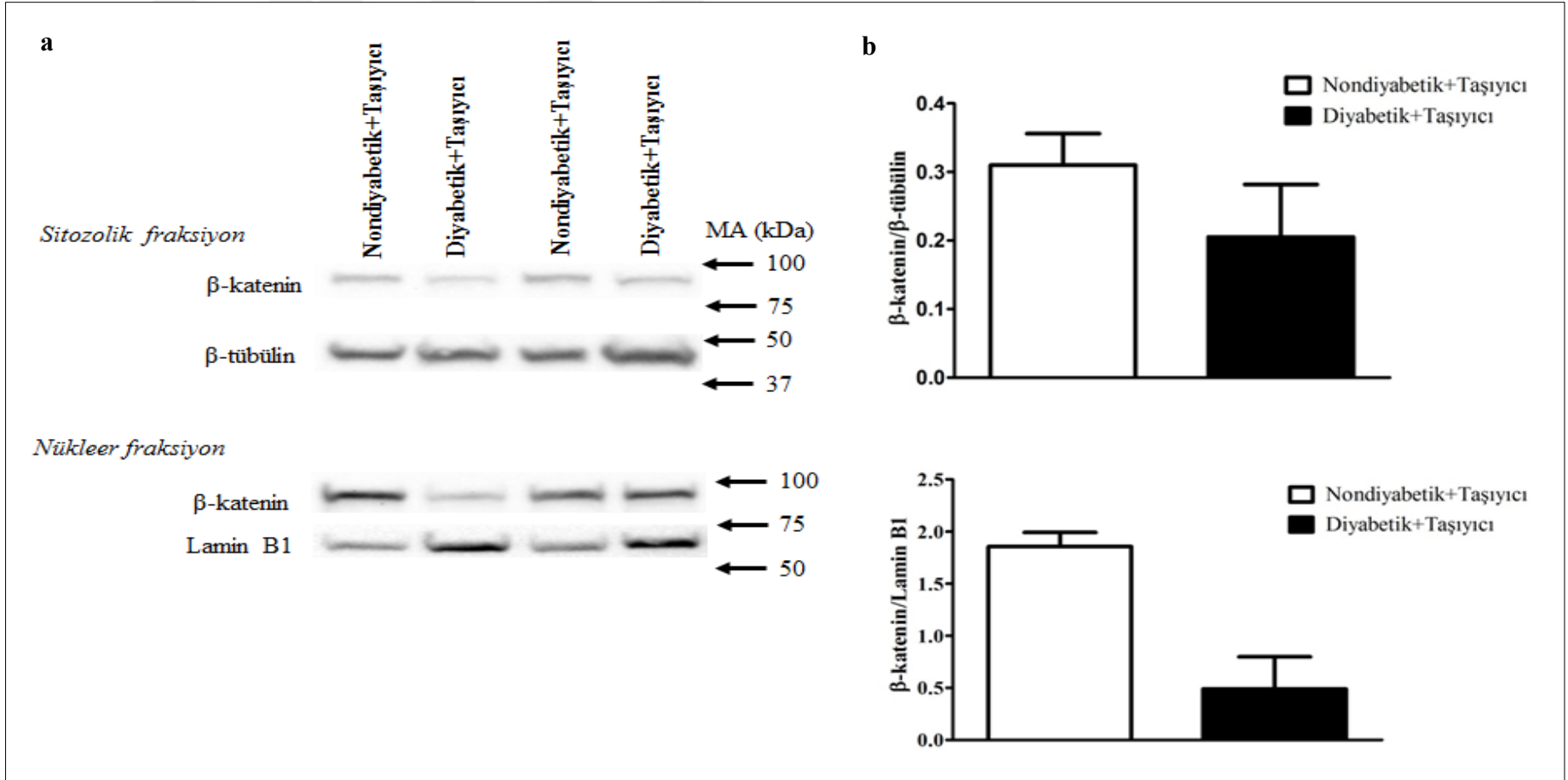
Penil doku homojenatlarında Wnt/β-katenin sinyal yolağının hedef proteini olan β-kateninin, defosforile haldeki aktif formunun ekspresyonu araştırıldı. Diyabetik+Taşıyıcı grubunda β-katenin ekspresyonu Nondiabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azaldı. NZ ve XAV939 tedavileri, diyabetik gruptaki azalma üzerine etki göstermedi. Nondiabetik+NZ25 grubunda β-katenin ekspresyonu, Nondiabetik+Taşıyıcı ile karşılaştırıldığında anlamlı düşük bulundu (Şekil 24).



Şekil 24. Peniste β-katenin (defosforile haldeki aktif form; 92 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüsü. (b) Densitometrik analiz sonuçları. **p<0.01, *p<0.05 Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir (n=3-4).

4.3.4. Sitozolik ve Nükleer Fraksiyonlarına Ayrılmış Penil Homojenatlarda β-katenin Protein Ekspresyonu

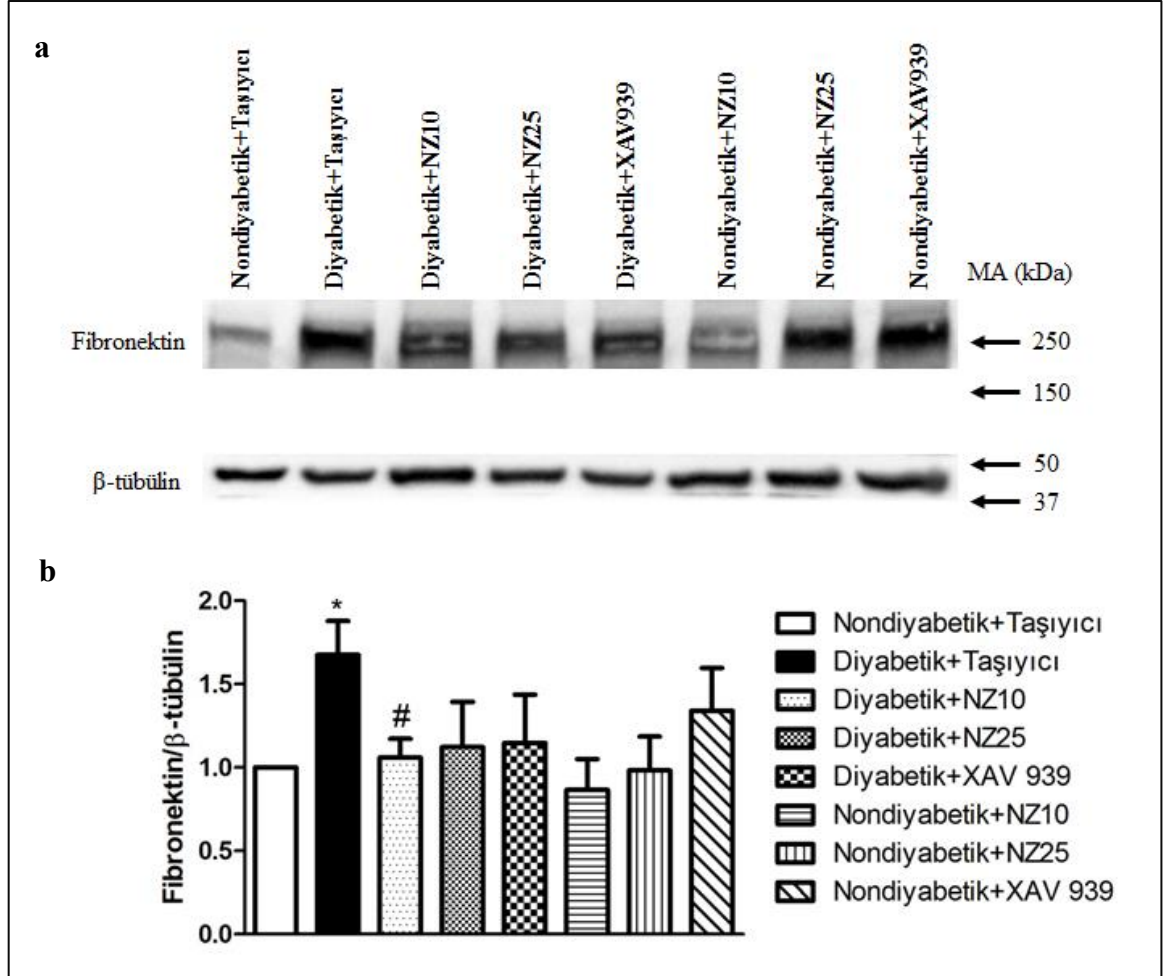
Wnt/β-kateninin yolağı aktivitesi sonucu sitoplazmada biriken defosforile haldeki aktif β-kateninin nükleusa geçer ve hedef genlerin transkripsiyonuna aracılık eder. Bu nedenle çalışmamızda penil homojenatların sitozolik ve nükleer fraksiyonlarındaki β-katenin ekspresyonu da değerlendirildi. Sınırlı sayıda homojenat ile yürütülen çalışmalarda, Diyabetik+Taşıyıcı grubuna ait sitozolik ve nükleer fraksiyonlardaki β-katenin ekspresyonunda Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında azalma eğilimi görüldü (Şekil 25).



Şekil 25. Penil homojenatların sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında β-katenin (defosforile aktif form; 92 kDa) ekspresyonu. **(a)** Temsili membran görüntüleri. **(b)** Densitometrik analiz sonuçları (n=2).

4.3.5. Penil Dokuda Fibronektin Protein Ekspresyonu

Penil doku homojenatlarında fibroz protein olan fibronektinin ekspresyonu araştırıldı. Diyabetik+Taşıyıcı grubunda penisteki fibronektin protein ekspresyonu, Nondiyabetik+Taşıyıcı gruba göre anlamlı arttı. Düşük doz NZ (10 mg/kg) tedavisi ise diyabete bağlı fibronektin artışını azalttı (Şekil 26).



Şekil 26. Peniste fibronektin (262 kDa) ekspresyonu. **(a)** Temsili membran görüntüsü. **(b)** Densitometrik analiz sonuçları. * $p < 0.05$ Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında; # $p < 0.05$ Diyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir (n=3-4).

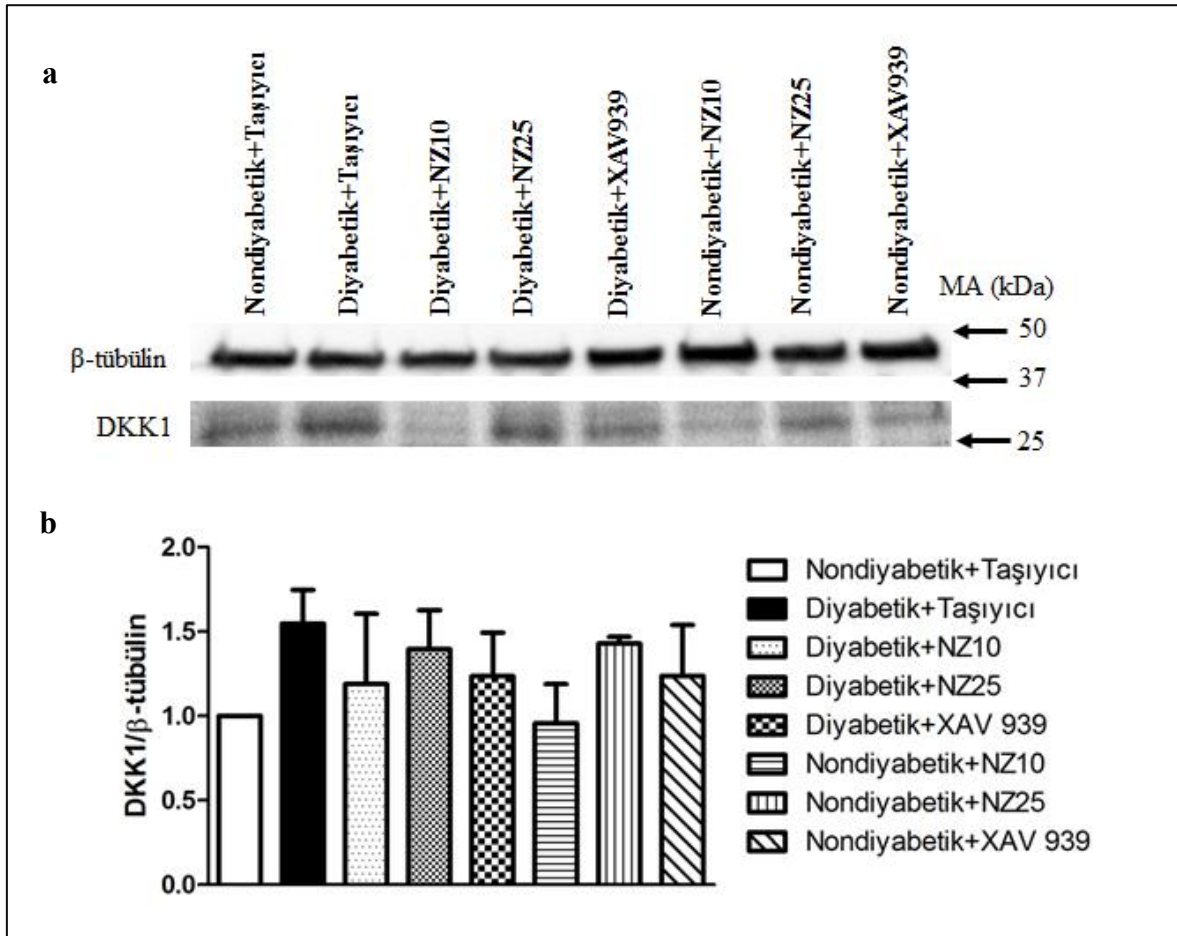
4.4. MPG'de Protein Ekspresyonu Sonuçları

Fonksiyonel ölçümlerin ardından sıçanlardan toplanan MPG dokularında Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki DKK1 (endojen Wnt yolağı 'upstream' antagonisti), $GSK3\beta^{Ser9}$

(β -katenin yıkıcı kompleksinin kinaz enzimi), β -katenin (Wnt yolağı ‘downstream’ mediyatörü) ile prokaspaz-3 (apoptoz belirteci) proteinlerinin ekspresyonu western blot yöntemi ile yarı kantitatif olarak analiz edildi ve karşılaştırıldı.

4.4.1. MPG’de DKK1 Protein Ekspresyonu

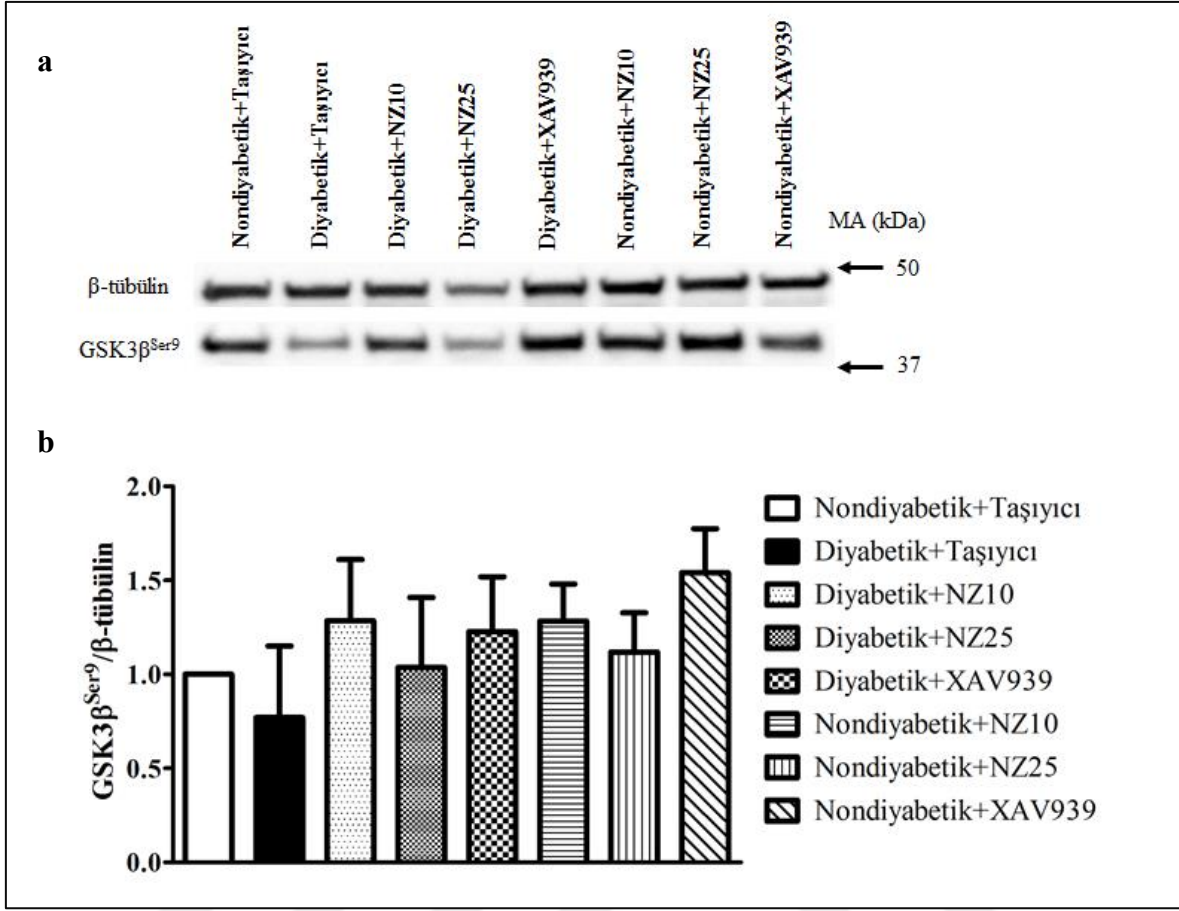
MPG homojenatlarında Wnt yolağı endojen inhibitörü olan DKK1 ekspresyonu araştırıldı. DKK1 ekspresyonu gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi (Şekil 27).



Şekil 27. MPG’de DKK1 (29 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüsü. (b) Densitometrik analiz sonuçları. $p>0.05$ (n=3).

4.4.2. MPG’de GSK3 β ^{Ser9} Protein Ekspresyonu

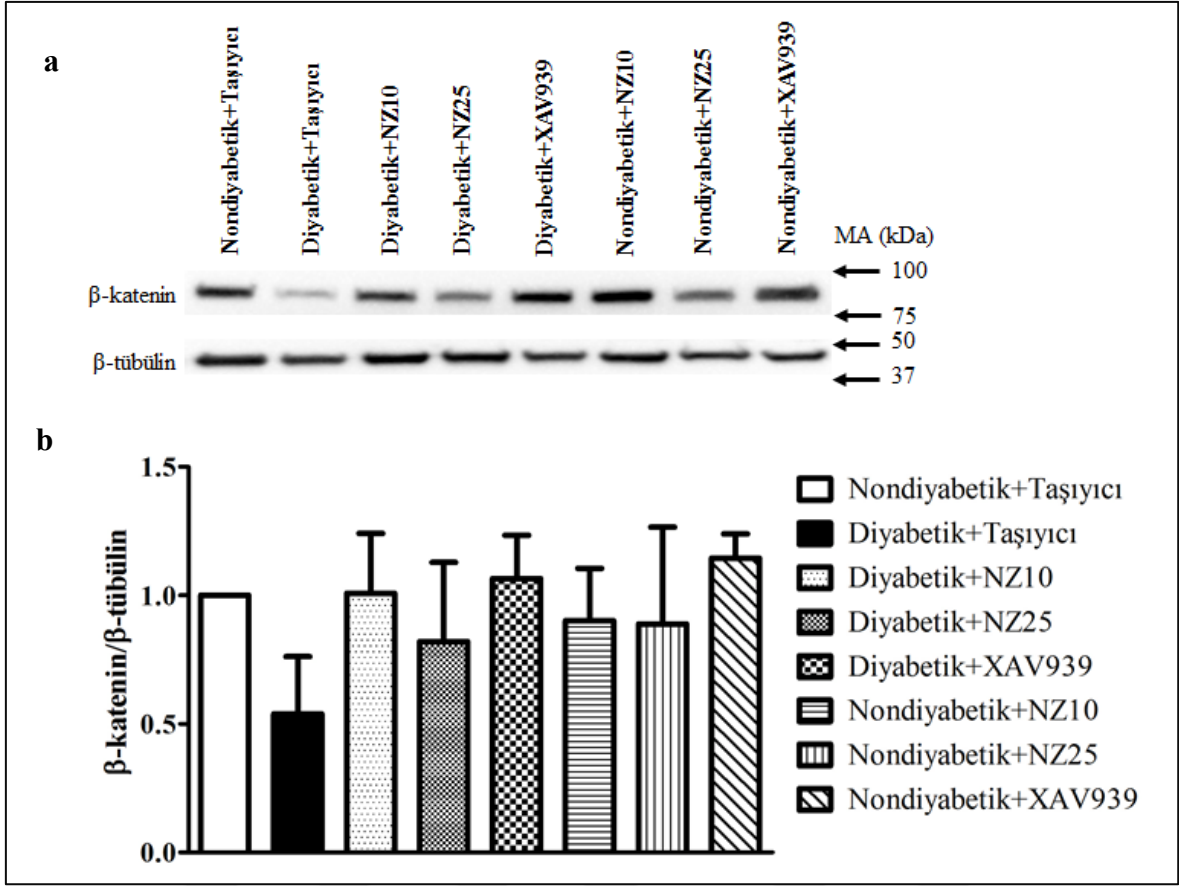
MPG homojenatlarında sitoplazmik β -katenin yıkıcı kompleksinin kinaz enzimi olan GSK3 β ’nin, 9. pozisyonundaki Ser rezidüsünden fosforillenmiş inaktif formunun ekspresyonu araştırıldı. Deney grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 28).



Şekil 28. MPG’de GSK3β^{Ser9} (inaktif GSK3β, 46 kDa) ekspresyonu. **(a)** Temsili membran görüntüsü. **(b)** Densitometrik analiz sonuçları. p>0.05 (n=3).

4.4.3. MPG’de β-katenin Protein Ekspresyonu

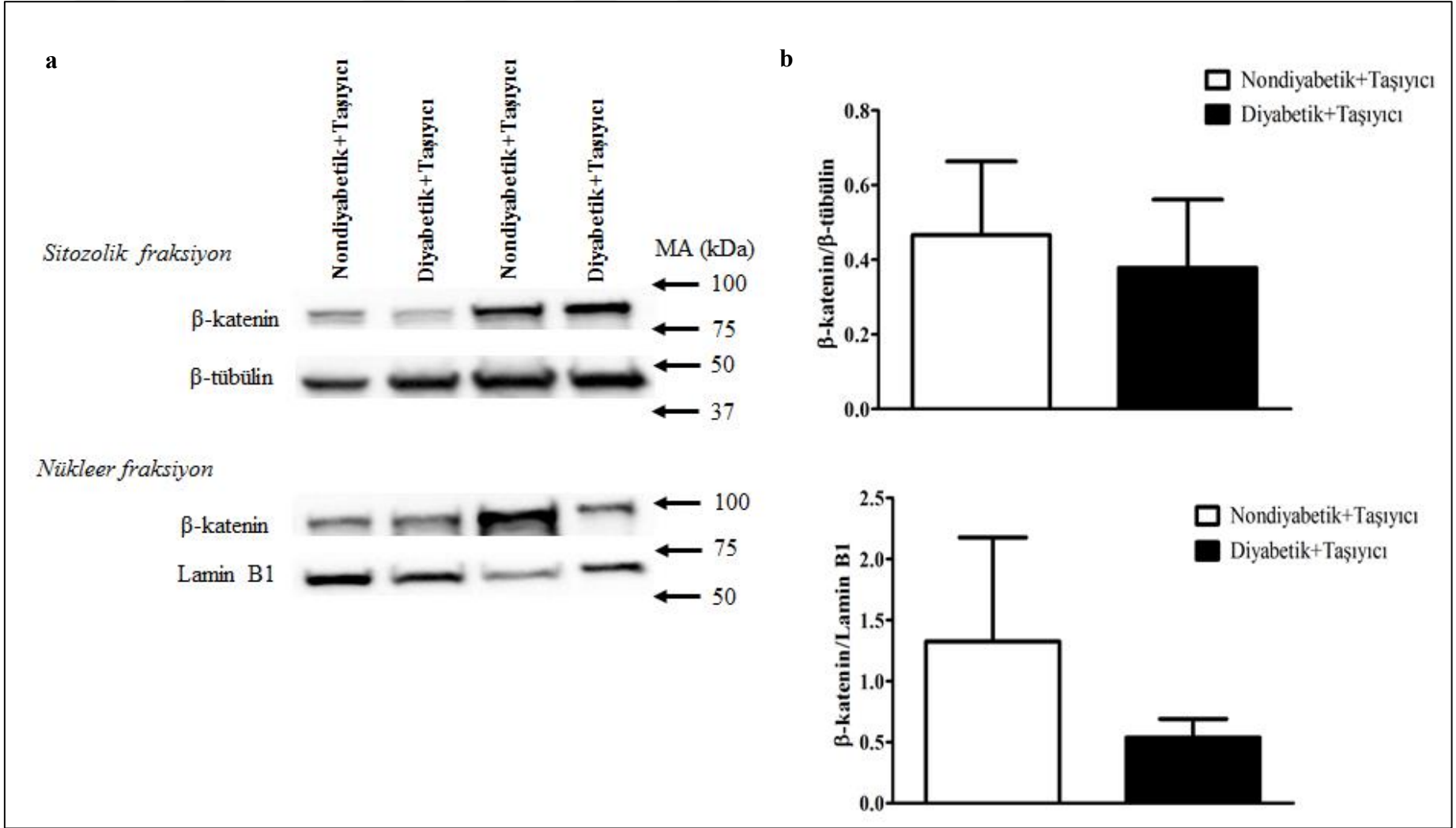
MPG homojenatlarında Wnt/β-katenin sinyal yolağının hedef proteini olan β-kateninin, defosforile haldeki aktif formunun ekspresyonu araştırıldı. Deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak Diyabetik+Taşıyıcı grubu Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında β-katenin ekspresyonunda azalma eğilimi gözlemlendi (Şekil 29).



Şekil 29. MPG'de β-katenin (defosforile aktif form; 92 kDa) ekspresyonu. **(a)** Temsili membran görüntüsü. **(b)** Densitometrik analiz sonuçları. $p > 0.05$ ($n=3-4$).

4.4.4. Sitozolik ve Nükleer Fraksiyonlarına Ayrılmış MPG Homojenatlarında β-katenin Protein Ekspresyonu

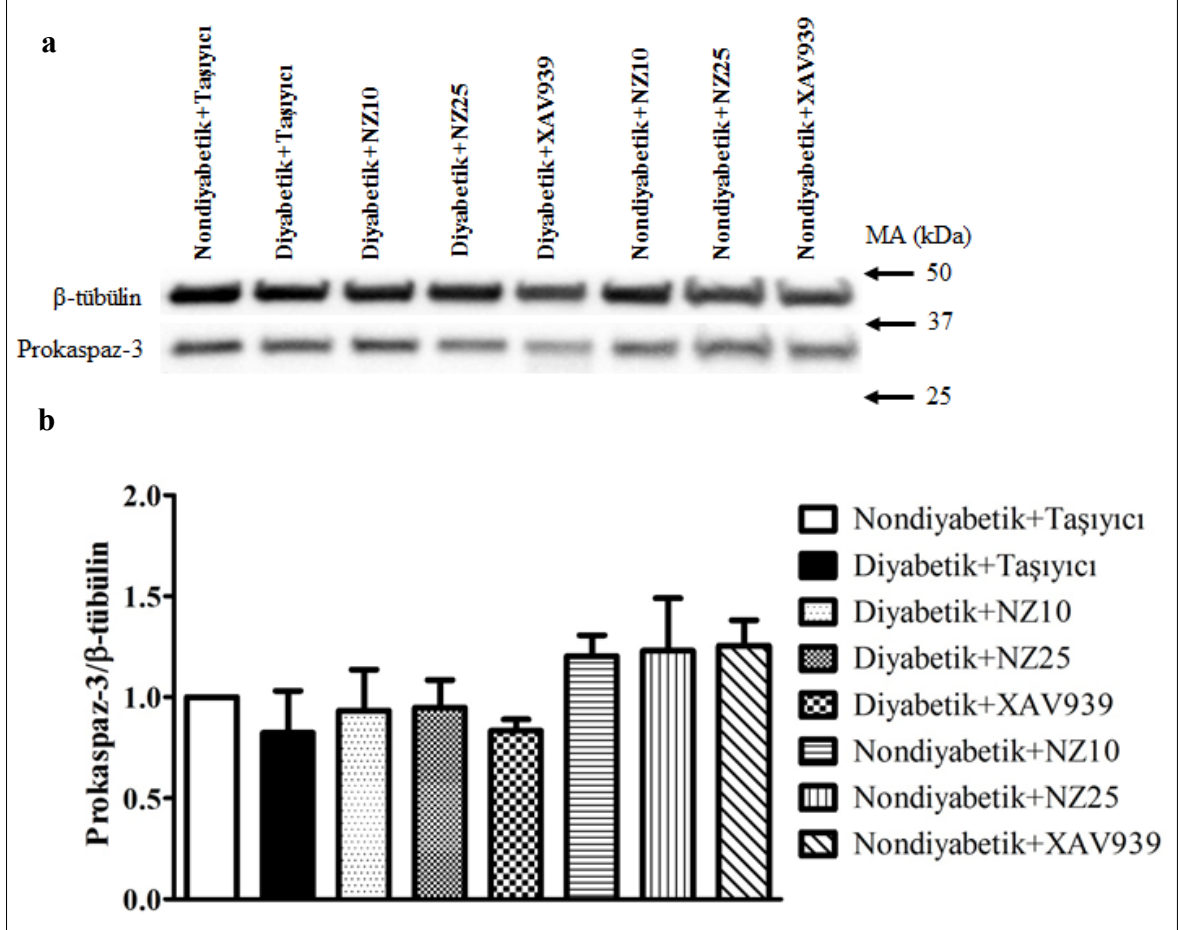
Wnt/β-kateninin yolağı aktivitesi sonucu sitoplazmada biriken defosforile haldeki aktif β-katenin nükleusa geçmekte ve Wnt bağımlı genlerin transkripsiyonuna aracılık etmektedir. Bu nedenle çalışmamızda MPG dokularındaki β-katenin ekspresyonun sitozolik ve nükleer fraksiyonlarındaki dağılımı da değerlendirildi. Sınırlı sayıda homojenat ile yürütülen çalışmalarda, Diyabetik+Taşıyıcı grubuna ait sitozolik ve nükleer fraksiyonlardaki β-katenin ekspresyonunda Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında azalma eğilimi görüldü. Ancak bu azalma eğilimi penil dokudaki kadar belirgin değildi (Şekil 30).



Şekil 30. MPG homojenatlarının sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında β -katenin (defosforile haldeki aktif form; 92 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüleri. (b) Densitometrik analiz sonuçları (n=2).

4.4.5. MPG'de Prokaspaz-3 Protein Ekspresyonu

MPG dokularında apoptoz belirteci olan prokaspaz-3 ekspresyonu araştırıldı. Deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 31).



Şekil 31. MPG'de prokaspaz-3 (35 kDa) ekspresyonu. (a) Temsili membran görüntüsü. (b) Densitometrik analiz sonuçları. $p > 0.05$ (n=3-4).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsülin üretimi ve/veya insülin etkisindeki bozukluk nedeniyle gelişen kronik hiperglisemi ile karakterize diyabet, dünya genelinde prevalansı giderek artan günümüzün en yaygın kronik metabolik hastalıklardan biridir. Hastanın yaşam kalitesini olumsuz etkileyen, morbidite ve mortaliteye neden olan ve sağlık harcamalarında ciddi artışa yol açan mikro ve makrovasküler komplikasyonlara yol açması, diyabeti önemli bir halk sağlığı problemi haline getirmektedir (1, 2). Erektile disfonksiyon (ED), diyabetik erkeklerde oldukça yaygın görülen ve yaşam kalitesini olumsuz etkileyen önemli komplikasyonlardan biridir. Diyabetik ED patogeneğinde nöropati ve endotelial hasara bağlı olarak gelişen NO etkinliğindeki azalmanın ve kavernoöz dokudaki fibrotik süreçlerin önemli rol oynadığı bilinmekle beraber bu süreçlerin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (3, 4). Günümüzde ED tedavisinde mevcut tedavi seçeneklerinin diyabetik ED’de etkinliğinin kısıtlı olması ve/veya yan etkileri, yeni tedavi alternatiflerinin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır (40, 70).

Çalışmamızda diyabetik sıçanlarda gelişen ED’de Wnt/ β -katenin sinyal yolağının rolü ve in vivo İKB ölçümü metodu ile klinikte antihelmintik olarak kullanılan ve bu sinyal yolağını inhibe ettiği gösterilmiş olan NZ ve bu yolağın selektif inhibitörü XAV939’un diyabetik ED’de terapötik etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda diyabet, tek doz STZ uygulaması ile indüklendi. Pankreas β hücrelerini harap ederek insülin sekresyonunu azaltan STZ, sıçanlarda deneysel tip 1 diyabet gelişimine neden olarak diyabet araştırmalarında yaygın kullanılan bir modeldir (110). STZ ve alloxan gibi kimyasal ajanla indüklenen diyabet modelleri, diğer transgenik hayvanlar ve genetik çalışmalarla elde edilen diyabetik hayvan modellerine göre basit, uygulaması kolay ve ekonomiktir. STZ, tekrarlanabilirliğinin daha yüksek ve daha az toksik olması nedeniyle alloxana tercih edilmektedir (126). Çalışmamızda Sezen ve arkadaşlarının kullandığı STZ ile indüklenen tip 1 diyabet modeli ve deney protokolü uygulandı (123). Protokole göre; STZ (75 mg/kg;i.p) uygulamasının ardından 4. gün sıçanların kuyruk venlerinden alınan kan örneklerinden kan glukoz düzeyleri tespit edildi. Diyabet olduğu saptanan sıçanlar (kan glukoz düzeyi ≥ 250 mg/dL) komplikasyonların gelişimi için 8 hafta bekletildi. 8. haftanın sonunda ise 4 hafta süre ile deney gruplarına göre taşıyıcı, NZ (10 ve 25 mg/kg) ve XAV939 (1 mg/kg) uygulaması yapıldı. 12. haftanın sonunda sıçanların erektil fonksiyonu, kavernoöz sinirin elektriksel stimülasyonu ile

gerçekleştirilen in vivo İKB ölçümü ile değerlendirildi. Deney protokolümüzün fonksiyonel verilerini oluşturan mİKB/OAB ve total İKB/OAB değerleri, kavernoöz sinirin 1 voltluk elektriksel stimülasyonu sonucu gruplar arasında bir fark göstermedi. Ancak 4 ve 8 voltluk uyarılarda bu iki oran Diyabetik+Taşıyıcı grubunda, Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldı. Bu durum deney modelimizde diyabetik sıçanlarda ED'nin başarılı bir şekilde indüklendiğini göstermektedir. Literatürde benzer şekilde çok sayıda çalışmada, sıçanlarda farklı deneysel diyabet modellerinde kavernoöz sinirin farklı parametrelerde elektriksel stimülasyonu ile İKB değerlerinde azalma ve ED oluşumu rapor edilmiştir (127-129). Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 30 mg/kg dozda i.p STZ uygulaması ve yüksek yağlı diyet ile indüklenen tip 2 diyabet modelinde, diyabetik sıçanlarda kavernoöz sinirin 5 voltluk elektriksel stimülasyonu ile elde edilen mİKB/OAB değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı gösterilmiştir (130). 40 mg/kg dozda i.p STZ uygulaması ile indüklenen tip 1 diyabet modelinde, kavernoöz sinirin 7.5 voltluk elektriksel stimülasyonu ile elde edilen mİKB/OAB değerlerinin diyabetik sıçanlarda anlamlı azaldığı bulunmuştur (131). Carneiro ve arkadaşları obez olmayan spontan tip 2 diyabet Goto-Kakizaki sıçanlarda, kavernoöz sinirin 0.2-20 Hz arası farklı frekanslarda 6 voltluk elektriksel stimülasyonu ile elde edilen mİKB/OAB değerlerini kontrol Wistar sıçanlarından anlamlı düşük bulmuştur (132). Çalışmamızda klinikte antihelmintik olarak kullanılan ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağını inhibe ettiği bilinen NZ'nin ve bu yolağın selektif inhibitörü XAV939'un in vivo İKB ölçümü ile sıçanlarda erektil fonksiyon üzerine etkileri araştırıldı. Literatürde NZ'nin Wnt/ β -katenin sinyali inhibitör etkinliği daha çok in vitro hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir. İn vivo deney modellerinde NZ'nin Wnt sinyali inhibitör etkinliğini gösteren çalışmalar kısıtlıdır. Osada ve arkadaşları tarafından insan kolorektal kanser hücresi implante edilmiş farelerde, 2-3 hafta boyunca günde 100 ve 200 mg/kg dozlarda oral gavaj ile uygulanan NZ tedavilerinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağını inhibe ederek tümör hacmini küçülttüğü gösterilmiştir (117). Morin ve arkadaşları, bleomisin ile indüklenen sistemik sklerozis modelinde, farelere 6 hafta süreyle haftada 5 gün 10 mg/kg dozda i.p uygulanan NZ tedavisinin akciğer ve deride fibroz gelişimini önlediğini ve bu etkinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibisyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (133). Aynı araştırmacı grubu, 5 hafta süreyle haftada 5 gün 10 mg/kg dozda i.p uygulanan NZ tedavisinin farelerde Graft versus host hastalığı modelindeki iyileştirici etkisinde NZ'nin Wnt/ β -katenin sinyali üzerindeki inhibitör etkisinin rol oynadığını göstermiştir (134) Bu çalışmalar göz önünde

bulundurularak çalışmamızda NZ dozları olarak 10 mg/kg ve daha yüksek bir doz olan 25 mg/kg seçilmiştir. NZ'nin oral yaralanımının düşük olması nedeniyle i.p uygulama tercih edildi. NZ'yi i.p uygulamaya elverişli taşıyıcı çözeltinin belirlenmesi için ön çalışmalar yapıldı. %1 DMSO, %5 Tween 80 ve fosfat tamponlu salinden oluşan çözelti taşıyıcı olarak belirlendi, geliştirilen bu çözelti ile NZ'nin i.p uygulamasına uygun yeni bir taşıyıcı literatüre kazandırılmış oldu. Deney gruplarına göre NZ, 10 ve 25 mg/kg dozlarda 4 hafta boyunca taşıyıcı içerisinde i.p olarak uygulandı. NZ tedavileri boyunca hayvanlarda ölüm veya herhangi makroskobik bir toksisite bulgusuna rastlanmadı. Sonuçlarımız göre, yüksek doz NZ (25 mg/kg) ve XAV939 (1 mg/kg) tedavileri diyabete bağlı mİKB/OAB ve total İKB/OAB değerlerindeki azalmalar üzerinde etki göstermedi. Ancak, düşük doz NZ (10 mg/kg) uygulaması ise mİKB/OAB ve total İKB/OAB değerlerindeki diyabete bağlı düşüşü azalttı. Fonksiyonel veriler 4 hafta süre ile 10 mg/kg dozda uygulanan NZ tedavisinin sıçanlarda diyabetik ED'de koruyucu etkisini göstermektedir. Selektif inhibitör olan XAV939 ile tedavinin etkili olmaması, 10 mg/kg dozda NZ tedavisi ile erektil fonksiyonda gözlemlenen iyileştirici etkinin Wnt/ β -katenin sinyali inhibisyonundan bağımsız olduğunu düşündürmektedir.

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı embriyonik gelişim ve yetişkin doku homeostazisinde hücre farklılaşması, proliferasyonu ve migrasyonu gibi temel biyolojik süreçlerin yürütülmesinde önemlidir (77). Bu sinyal yolağı glikoprotein yapılı sistince zengin Wnt proteinlerinin FZD ve koreseptör olan LRP-5/6 proteinine bağlanması ile aktive olur. Wnt-FZD-LRP5/6 kompleksi, sitoplazmada bulunan Dvl proteinin FZD'ye bağlanmasına ve böylece axin, GSK3 β , CKI ve APC'den oluşan yıkıcı kompleksin inhibisyonuna yol açar. Bu durumda yıkıcı kompleksin fosforilasyonundan ve ardından protozomal degradasyondan kurtulan defosforile haldeki aktif β -katenin sitoplazmada birikir, nükleusa girerek TCF/LEF1 transkripsiyon faktörüne bağlanır ve onu aktive eder. TCF/LEF1- β -katenin kompleksi, DNA'nın uygun bölgesine bağlanarak hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte rol alan Wnt hedef genlerinin transkripsiyonuna aracılık eder (78, 80). Son yıllarda yapılan çalışmalar, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivitesindeki bozuklukların kanser ve nörodejeneratif hastalıklar dışında diyabetik komplikasyonlara da aracılık ettiğini göstermiştir (94, 103, 107, 109).

Diyabetik ED gelişiminde ve düşük doz NZ tedavisinde görülen fonksiyonel düzelmede Wnt/ β -katenin sinyal yolağının rolünü ve mekanizmasını aydınlatmak amacıyla

MPG (DKK1, defosforile haldeki aktif β -katenin, GSKS β^{Ser9} ve prokaspaz-3) ve penis dokularında (DKK1, defosforile haldeki aktif β -katenin, GSKS β^{Ser9} ve fibronektin) protein ekspresyonları western blot yöntemi ile değerlendirildi.

Western blot sonuçlarımıza göre; MPG ve peniste endojen Wnt/ β -katenin yolağı inhibitörü olan ve bu yolak ilgili çalışmalarda yolağın negatif regülatörü olarak en çok araştırılan DKK1 proteini ekspresyonlarında gruplar arasında fark gözlenmedi. Literatürde diyabetik durumlarda serum DKK1 düzeyinin arttığını gösteren raporlar bulunmaktadır. Martin ve arkadaşları kardiyovasküler hastalığı bulunan tip 2 diyabetlilerde serum DKK1 seviyesini yüksek bulmuşlardır ve tip 2 diyabet hastalarında serum DKK1 seviyesindeki her 28 pg/mL'lik yükselmenin kardiyovasküler hastalık riskinde % 6.2'lik artışa yol açtığını bildirmişlerdir (135). Başka bir çalışmada, çocuk ve yetişkin tip 1 diyabet hastalarında serum DKK1 düzeyi yüksek bulunmuş ve DKK1'in hastalarda osteoblast aktivitesini azaltarak ve osteoklast aktivitesini artırarak tip 1 diyabete bağlı osteopeniye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (136). Shen ve arkadaşları, STZ ile tip 1 diyabet oluşturulmuş sıçanların hipokampusunda DKK1 ekspresyonunun arttığını ve ghrelin tedavisinin bu artışı önleyerek öğrenme ve belleği olumlu yönde etkilediğini göstermişlerdir (137).

GSK3 β , β -katenin yıkıcı kompleksinde yer alan bir Ser/treonin kinazdır. GSK3 β , Wnt/ β -katenin sinyali inaktif iken yıkıcı kompleksteki diğer bir kinaz olan CK1 ile β -kateninin fosforilasyonuna ve degradasyonuna aracılık eder. Ancak, yolak aktive olduğunda GSK3 β 9. pozisyonundaki Ser rezidüdünden fosforillenir (GSKS β^{Ser9}) ve inhibe olur, β -katenin fosforillenemez ve defosforile haldeki aktif β -katenin sitoplazmada birikir. Ardından nükleusa transloke olan β -katenin, Wnt hedef genlerinin transkripsiyonunu uyarır (90, 92). Birçok deneysel çalışmada Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivitesi, β -katenin ve GSK3 β protein ekspresyonlarının birlikte araştırılması ile değerlendirilmektedir. Dokuda ve/veya hücrede inaktif form olan GSKS β^{Ser9} ve β -katenin ekspresyonlarında azalma Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibisyonuna; GSKS β^{Ser9} ve β -katenin ekspresyonlarında artma ise Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonuna işaret etmektedir (138-140). Penis dokudaki western blot sonuçlarımıza göre; Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında Diyabetik+Taşıyıcı grubunda defosforile haldeki aktif β -katenin ve GSKS β^{Ser9} protein ekspresyon düzeyleri anlamlı azaldı. Ayrıca sınırlı sayıda penis dokusunun sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında yapılan western blot analizlerinde de aktif

β -katenin düzeyinin Diyabetik+Taşıyıcı grubunda azalma eğiliminde olduğu görüldü. Bu sonuçlar, diyabetik sıçanların penislerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivitesinin azaldığını göstermektedir. MPG dokularında yapılan analizlerde ise aktif β -katenin ve GSKS β^{Ser9} protein ekspresyonlarında Diyabetik+Taşıyıcı grubunda Nondiyabetik+Taşıyıcı grubuna göre azalma eğilimi görüldü; ancak gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde diyabetin Wnt/ β -katenin sinyal aktivitesi üzerindeki etkisinin dokuya göre değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Hsu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada; diyabetik sıçan böbreklerinde defosforile haldeki aktif β -katenin ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığını ve NO donörleri ile tedavinin Wnt/ β -katenin sinyalini artırarak apoptoz ve fibrozisi engellediğini göstermişlerdir (141). Ni ve arkadaşları da diyabetik sıçanların kemik dokusunda nükleer β -katenin düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığını, Wnt/ β -katenin sinyali hipoaktivitesinin osteogenez ve adipogenez arasındaki dengeyi olumsuz etkileyerek kemik kaybına neden olduğunu bildirmişlerdir (111). Zhonag ve arkadaşları sıçan diyabetik nöropati modelinde, diyabetik sıçanların spinal kordlarında Wnt10a ve β -katenin ekspresyonlarının arttığını göstermişlerdir (142). Benzer şekilde Resham ve arkadaşları da sıçan diyabetik periferik nöropati modelinde diyabetik sıçanların siyatik sinirlerinde, arka kök gangliyonlarında ve spinal kordlarında β -katenin ekspresyonunun arttığını tespit etmişlerdir (108). Sonuçlarımızda göre Nondiyabetik sıçanların yüksek doz NZ (25 mg/kg) ile tedavisi, Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında penil dokuda aktif β -katenin ekspresyonunda anlamlı azalmaya neden oldu, bu sonuç 25 mg/kg dozda NZ'nin Wnt/ β -katenin yolağını inhibe ettiğini göstermektedir. Wnt/ β -katenin yolağının selektif inhibitörü olan XAV939 hem penis hem de MPG dokularında aktif β -katenin düzeyinde azalmaya neden olmadı. Bunun nedeni çalışmamızda kullanılan XAV939 dozu (1 mg/kg) ile ilişkili olabilir. Literatürde XAV939'un çeşitli dozlarda in vivo Wnt/ β -katenin inhibisyonu yaptığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. 0.1, 5 ve 10 mg/kg gibi dozlarda çeşitli in vivo deney modellerinde XAV939'un Wnt/ β -katenin yolağı inhibisyonu oluşturduğu gösterilmiştir (143, 144, 145). Western blot sonuçlarımız, diyabetik sıçanların penislerinde Wnt/ β -katenin yolağının inhibe olduğunu ve yolak proteinlerinin diyabete bağlı ekspresyon değişikliklerinin peniste MPG'ye kıyasla daha belirgin olduğunu gösterdi. Elde edilen bu verilerden yola çıkılarak Wnt/ β -katenin yolağı inhibisyonunun diyabetik ED patofizyolojisinde nöronal süreçlerden çok düz kastaki olaylar ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Penil fibrozis diyabetik ED patogenezinde önemli yer alır (34). Wnt/ β -katenin sinyal yolağının fibrotik süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir. Hepatik fibrozis oluşumunda, hepatik uydu hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktive olduğu ve profibrotik proteinlerin ekspresyonuna aracılık ettiği bulunmuştur (146). Chen ve arkadaşları bleomisin ile indüklenen pulmoner fibrozis modelinde, bleomisin tedavisinin in vitro ve in vivo olarak Wnt/ β -katenin sinyalini aktive ettiğini göstermişlerdir. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının selektif inhibitörü XAV939, TGF- β 1 ve fibroblast büyüme faktörü-2 ekspresyonunu azaltarak bleomisin ile indüklenen pulmoner fibrozisi azaltmıştır (147). Diğer taraftan Wnt/ β -katenin yolağı aktivasyonun, glomerüler mezengial hücreleri yüksek konsantrasyon glukozla indüklenen fibrozisten koruduğu gösterilmiştir (105). Bir ekstrasellüler matriks proteini olan fibronektin kolajen, büyüme faktörleri ve hücre yüzeyi integrinlerine bağlanarak fonksiyonlarını meydana getirir. Tümör gelişimi, doku onarımı süreçlerinde önemli rolü olan fibronektin, deneysel çalışmalarda fibrozis belirteci olarak kullanılmaktadır (148, 149). Çalışmamızda western blot yöntemi ile penil dokuda fibronektin protein ekspresyon düzeyi değerlendirildi. Nondiyabetik+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında Diyabetik+Taşıyıcı grubunda penil fibronektin ekspresyon düzeyi, anlamlı olarak arttı. Sonuçlarımıza benzer şekilde STZ ile indüklenen diyabet modelinde diyabetik sıçan penislerinde fibronektin ekspresyonlarında artma gösterilmiştir (150). Düşük doz NZ (10 mg/kg) uygulaması ise diyabete bağlı fibronektin artışını anlamlı olarak azalttı. Bu sonuçlar, 10 mg/kg dozda NZ tedavisinin peniste diyabete bağlı fibrozisi azalttığını göstermektedir. Boyapally ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada farelerde bleomisin ile indüklenen pulmoner fibrozis modelinde, 10 mg/kg dozda NZ tedavisinin akciğer dokusunda TGF- β 1/smad yolağı ve fibronektin proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak fibrozisi engellediğini rapor etmişlerdir (151).

Diyabetik nöropatiye bağlı olarak gelişen apoptoz ve sonucunda nöronal NO etkinliğindeki azalma diyabetik ED'nin önemli mekanizmalarından biridir (30). Wnt/ β -katenin sinyal yolağının apoptoz ile ilişkisini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Diyabetik sıçanlarda kanonikal Wnt sinyal yolağı aktivasyonunun miyokardiyal hasara ve kardiyomiyosit apoptozuna aracılık ettiği gösterilmiştir. Podosit hücre kültürleriyle yapılan çalışmalarda hiperglisemik koşulların hücrelerde kanonikal Wnt yolağını aktive ederek apoptoza yol açtığı bulunmuştur. Wnt antagonisti DKK1 uygulaması ise podositlerde gözlemlenen apoptozu azaltmıştır (104). Diğer taraftan sıçanlarda spinal kord hasarı modelinde rapamisinin Wnt/ β -katenin yolağı aktivasyonu ile kaspaz-3 ekspresyonunu ve

apoptozu azalttığı gösterilmiştir (152). GSK-3 β antagonistleri olan LiCl ve SB216763, Wnt/ β -katenin yolağını aktive ederek dopaminerjik nöronlarda rotenon ile indüklenen apoptozu engellemiştir (153). Bir sistein proteaz olan kaspaz-3 apoptozda görev alan önemli proteinlerden biridir. Hücrede inaktiftir ve prokaspaz şeklinde bulunur. Kaspaz-3 aktivasyonu, prokaspaz-3'ün proteolitik olarak parçalanması ile gerçekleşir. Aktif kaspaz-3 ise DNA fragmantasyonu sonucu apoptoza neden olur (154, 155). Çalışmamızda diyabete bağlı nöronal apoptozu ve ilaç tedavilerinin nöronal apoptoz üzerine etkisini araştırmak için MPG dokularında prokaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri western blot yöntemi ile değerlendirildi. Apoptotik belirteçlerden biri olan prokaspaz-3 ekspresyonu gruplar arasında fark göstermedi.

Sonuç olarak bu çalışmada tip 1 diyabet oluşturulmuş sıçanlarda gelişen ED'de bir Wnt/ β -katenin yolağı inhibitörü NZ ile 10 mg/kg dozda uygulanan tedavinin koruyucu etkinliği ortaya konmuştur. Çalışma kapsamında diyabetik ED'de MPG ve penis dokularında Wnt/ β -katenin yolağı proteinlerinin ekspresyonları ilk kez değerlendirilmiştir. Moleküler çalışma verilerimize göre, diyabetik ED'de penil dokuda Wnt/ β -katenin yolağının inhibe olduğu görülürken, MPG de ise inhibisyona eğilim görülmeyle birlikte anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Fonksiyonel düzelme gösteren düşük doz NZ tedavisinin diyabette görülen fibroziste etkili olduğu bulunmuştur. Bu veriler ışığında, diyabetik ED'de Wnt/ β -katenin yolağı inhibisyonunun ağırlıklı olarak düz kaslarla ilişkili olduğu ve NZ'nin de Wnt/ β -katenin yolağı inhibisyonundan bağımsız olarak ve nispeten antifibrotik bir mekanizma ile fonksiyonel iyileşme sağladığı düşünülmektedir. NZ'nin etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar gereklidir. İleri çalışmalar ile klinikte kullanılan ucuz bir ilaç olan NZ'nin diyabetik ED tedavisinde maliyet etkin bir terapötik alternatif olma potansiyeli ayrıntılı değerlendirilmelidir.

6. KAYNAKLAR

1. Forouhi N, Wareham N (2014). Epidemiology of diabetes. *Medicine* 42 (12): 698-702.
2. Corriere M, Rooparinesingh N, Kalyani RR (2013). Epidemiology of diabetes and diabetes complications in the elderly: an emerging public health burden. *Curr Diab Rep* 13: 805-813.
3. Hatzimouratidis K, Hatzichristou D (2014). How to treat erectile dysfunction in men with diabetes: from pathophysiology to treatment. *Curr Diab Rep* 14: 545.
4. El-Sakka AI, Yassin AA (2010). Amelioration of penile fibrosis: myth or reality. *J Androl* 31: 324-335.
5. Duchartre Y, Kim YM, Kahn M (2016). The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 99: 141-149.
6. Chen Q, Ma J (2017). Canonical Wnt signaling in diabetic retinopathy. *Vision Res* 139: 47-58.
7. Guo Q, Zhong W, Duan A, Sun G, Cui W, Zhuang X, Liu L (2019). Protective or deleterious role of Wnt/beta-catenin signaling in diabetic nephropathy: An unresolved issue. *Pharmacol Res* 144: 151-157.
8. Liu P, Su J, Song X, Wang S. (2017). Activation of nuclear β -catenin/c-Myc axis promotes oxidative stress injury in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 493 (4): 1573-1580.
9. Hie M, Iitsuka N, Otsuka T, Tsukamoto I (2011). Insulin-dependent diabetes mellitus decreases osteoblastogenesis associated with the inhibition of Wnt signaling through increased expression of Sost and Dkk1 and inhibition of Akt activation. *Int J Mol Med* 28 (3): 455-462.
10. Padhy B, Gupta Y (2011). Drug repositioning: Re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. *J Postgrad Med* 57 (2): 153-160.
11. Ahmed K, Shaw HV, Koval A, Katanaev VL (2016). A Second WNT for old drugs: Drug repositioning against WNT-dependent cancers. *Cancers* 8 (7): 66.
12. Andersson K, Wagner G (1995). Physiology of penile erection. *Physiol Rev* 75 (1): 191-236.
13. Prieto D (2007). Physiological regulation of penile arteries and veins. *Int J Impot Res* 20 (1): 17-29.

14. Giuliano F, Rampin O (2004). Neural control of erection. *Physiol Behav* 83 (2): 189-201.
15. Suh C, Baheti H, Tirumani A, Rosenthal D, Kim S, Ramaiya H, Shinagare M (2015). Multimodality imaging of penile cancer: What radiologists need to know. *Abdom Imaging* 40 (2): 424-435.
16. Keegan KA, Penson DF (2013). Vasculogenic erectile dysfunction. *Vascular Medicine: A Companion to Braunwald's Heart Disease (Second Edition)*: 341-348.
17. Morelli A, Filippi S, Vignozzi L, Mancina R, Maggi M (2006). Physiology of Erectile Function: An Update on intracellular molecular processes. *EAU-EBU Update Series* 4 (3): 96-108.
18. Argiolas A, Melis M (2005). Central control of penile erection: Role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Prog Neurobiol* 76 (1): 1-21.
19. Williams S, Melman A. (2012). Novel therapeutic targets for erectile dysfunction. *Maturitas* 71 (1): 20-27.
20. Wessells H, Blevins J, Vanderah T (2005). Melanocortinergic control of penile erection. *Peptides* 26 (10): 1972-1977.
21. Miralles-Garcia JM, Garcia-Diez LC (2004). Specific aspects of erectile dysfunction in endocrinology. *Int J Impot Res* 16 (Suppl 2): S10-12.
22. Argiolas A, Melis M (1995). Neuromodulation of penile erection: An overview of the role of neurotransmitters and neuropeptides. *Prog Neurobiol* 47 (4-5): 235-255.
23. Argiolas A (2005). Male erectile dysfunction: Chemical pharmacology of penile erection. *Drug Discov Today Ther Strateg* 2 (1): 31-36.
24. Andersson K (2001). Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev* 53 (3): 417-450.
25. Wang H, Eto M, Steers WD, Somlyo AP, Somlyo AV (2002). RhoA-mediated Ca^{2+} sensitization in erectile function. *J Biol Chem* 277 (34): 30614-30621.
26. Liming JN, Burnett AL (2006). RhoA/Rho-kinase in erectile tissue: Mechanisms of disease and therapeutic insights. *Clin Sci* 110 (2): 153-165.
27. Burnett AL, Tillman SL, Chang TS, Epstein JI, Lowenstein CJ, Bredt DS, Snyder SH, Walsh PC (1993). Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol* 150 (1): 73-76.
28. Gonzalez-Cadavid NF, Ignarro LJ, Rajfer J (1999). Nitric oxide and the cyclic GMP system in the penis. *Mol Urol* 3 (2): 51-59.

29. Andersson KE (2003). Erectile physiological and pathophysiological pathways Involved in erectile dysfunction. *J Urol* 170 (2): S6-S14.
30. National Institutes of Health Consensus Development Panel on Impotence (1999). *JAMA* 270: 83-90.
31. Rösing D, Klebingat KJ, Berberich HJ, Bosinski HA., Loewit K, Beier KM (2009). Male sexual dysfunction: diagnosis and treatment from a sexological and interdisciplinary perspective. *Dtsch Arztebl Int* 106 (50): 821–828.
32. Ibrahim A, Ali M, Kiernan TJ, Stack AG (2018). Erectile dysfunction and ischaemic heart disease. *Eur Cardiol.* 13 (2): 98–103.
33. Shamloul R, Ghanem H (2013). Erectile dysfunction. *The Lancet* 381 (9861): 153-165.
34. Akkus E, Kadioglu A, Esen A, Doran S, Ergen A, Anafarta K, Hattat H. (2002). Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Turkey: A Population-Based Study. *Eur Urol* 41 (3): 298-304
35. Chao J, Hwang T (2013). Contemporary management of erectile dysfunction. *Urol Sci* 24 (2): 35-40.
36. Hu C, Jia W. (2019). Therapeutic medications against diabetes: What we have and what we expect. *Adv Drug Deliv Rev* 139: 3-15.
37. Kharroubi A, Darwish H (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes* 6 (6): 850-867.
38. IDF Diabetes Atlas Ninth Edition (2019). International Diabetes Federation.
39. Papatheodorou K, Banach M, Edmonds M, Papanas N, Papazoglou D (2015). Complications of diabetes. *J Diabetes Res* 2015: 5.
40. Thorve V, Kshirsagar A, Vyawahare N, Joshi V, Ingale K, Mohite R (2011). Diabetes-induced erectile dysfunction: Epidemiology, pathophysiology and management. *J Diabetes Complications* 25 (2): 129-136.
41. Luthra A, Misra A (2008). Erectile dysfunction in diabetic males: Plausible mechanisms and management strategies. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* 2 (1): 81-86.
42. Phé V, Rouprêt M (2012). Erectile dysfunction and diabetes: A review of the current evidence-based medicine and a synthesis of the main available therapies. *Diabetes Metab* 38 (1): 1-13.

43. Hatzimouratidis K, Hatzichristou D (2009). Erectile dysfunction and diabetes mellitus. *Insulin* 4 (2): 114-122.
44. Keene L, Davies P (1999). Drug-related erectile dysfunction. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 18 (1): 5-24.
45. Traish AM, Munarriz R, O'Connell L, Choi S, Kim SW, Kim NN, Huang Y, Goldstein I (2003). Effects of medical or surgical castration on erectile function in an animal model. *J Androl* 24 (3): 381-387.
46. Simopoulos DN, Gibbons SJ ; Malysz J, Szurszewski JH, Farrugia G, Ritman EL , Moreland RB, Nehra A (2001). Corporeal structural and vascular micro architecture with X-ray micro computerized tomography in normal and diabetic rabbits: histopathological correlation. *J Urol* 165 (5):1776-1782.
47. El-Sakka A (2011). Reversion of penile fibrosis: Current information and a new horizon. *Arab J Urol* 9 (1): 49-55.
48. El-Sakka A, Yassin A (2010). Amelioration of penile fibrosis: Myth or reality. *J Androl* 31 (4): 324-335.
49. Musicki B, Burnett AL (2006). Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 19 (2): 129-38.
50. Agarwal A, Nandipati K, Sharma R., Zippe C, Raina R (2006). Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. *J Androl* 27 (3): 335-347.
51. Gur S, Kadowitz P, Hellstrom W (2009). A critical appraisal of erectile function in animal models of diabetes mellitus. *Int J Androl* 32 (2): 93-114.
52. Yan L (2018). Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. *Animal Model Exp Med* 1 (1): 7-13.
53. Brownlee M (2005). The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes* 54 (6): 1615-16125.
54. Wautier JM, Schmidt A (2004). Protein glycation: A firm link to endothelial Cell dysfunction. *Circ Res* 95 (3): 233-238.
55. Thomas M (2011). Advanced glycation end products. *Diabetes and the Kidney* 170: 66-74.
56. Rhee S, Kim Y (2018). The role of advanced glycation end products in Diabetic vascular complications. *Diabetes Metab J* 42 (3): 188–195.

57. Sena C, Pereira A, Seiça R (2013). Endothelial dysfunction- A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta* 1832 (12): 2216-2231.
58. Kitada M, Zhang Z, Mima A, King G (2010). Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *J Diabetes Investig* 1 (3): 77-89.
59. Giacco F, Brownlee M (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107 (9): 1058-1070.
60. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 108 (9): 1341-1348.
61. Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli L, Sesti G, Lauro R (2002). Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* 106 (4): 466-472.
62. Johnson JM, Bivalacqua TJ, Lagoda GA, Burnett AL, Musicki B (2011). eNOS-uncoupling in age-related erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 23 (2): 43-438.
63. Gür S, Öztürk B, Karahan S (2000). Impaired endothelium-dependent and neurogenic relaxation of corpus cavernosum from diabetic rats: Improvement with L-arginine. *Urol Res* 28(1):14-19.
64. Ghasemi M, Sadeghipour H, Mani A, Tavakoli S, Hajrasouliha A, Ebrahimi F, Dehpour A (2006). Effect of anandamide on nonadrenergic noncholinergic-mediated relaxation of rat corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol* 544(1-3): 138-145.
65. Dewanjee S, Das S, Das AK, Bhattacharjee N, Dihingia A, Dua TK, Kalita J, Manna P (2018). Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets. *Eur J Pharmacol* 833: 472-523.
66. Cellek S, Foxwell N, Moncada S (2003). Two phases of nitroergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 52(9): 2353-2362.
67. Cellek S, Qu W, Schmidt A, Moncada M. (2004). Synergistic action of advanced glycation end products and endogenous nitric oxide leads to neuronal apoptosis in vitro: A new insight into selective nitroergic neuropathy in diabetes. *Diabetologia* 47(2): 331-339.
68. Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL (1999). Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis* 6:347-363.

69. Hannan JL, Matsui H, Sopko NA, Liu X, Weyne E, Albersen M, Watson JW, Hoke A, Burnett AL, Bivalacqua TJ (2016). Caspase-3 dependent nitregric neuronal apoptosis following cavernous nerve injury is mediated via RhoA and ROCK activation in major pelvic ganglion. *Sci Rep* 6(1): 29416.
70. Williams S, Melman A (2012). Novel therapeutic targets for erectile dysfunction. *Maturitas* 71(1): 20-27.
71. Francis S, Corbin J (2011). PDE5 inhibitors: Targeting erectile dysfunction in diabetics. *Curr Opin Pharmacol* 11(6): 683-688.
72. Andersson K (2018). PDE5 inhibitors – pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. *Br J Pharmacol* 175(13): 2554-2565.
73. Rezaee ME, Ward CE, Brandes ER, Munarriz RM, Gross MS (2019). A review of economic evaluations of erectile dysfunction therapies. *Sex Med Rev* doi: 10.1016/j.sxmr.2019.06.001.
74. Hafron J, Christ G (2004). Novel therapeutic strategies for the treatment of erectile dysfunction. *Drug Discov Today Ther Strateg* 1(2): 249-257.
75. Nusse R, Varmus H (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31(1): 99-109.
76. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, Moon R, Varmus H (1991). A new nomenclature for int-1 and related genes: The Wnt gene family. *Cell* 64(2): 231.
77. Herr P, Hausmann G, Basler K (2012). WNT secretion and signalling in human disease. *Trends Mol Med* 18: 483-493.
78. Macdonald B, Tamai K, He X (2009). Wnt/ β -catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17(1): 9-26.
79. Nusse R, Varmus H (1992). Wnt genes. *Cell* 69(7): 1073-1087.
80. Nusse R, Clevers H (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell* 169(6): 985-999.
81. Van AR, Nusse R (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136(19): 3205-3214.
82. Zimmerli D, Hausmann G, Cantù C, Basler K (2017). Pharmacological interventions in the Wnt pathway: Inhibition of Wnt secretion versus disrupting the protein–protein interfaces of nuclear factors. *Br J Pharmacol* 174(24): 4600-4610.

83. Libro R, Bramanti P, Mazzon E (2016). The role of the Wnt canonical signaling in neurodegenerative diseases. *Life Sci* 158: 78-88.
84. Huang H, Klein P (2004). The Frizzled family: Receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biology* 5(7): 234.
85. Wang, Y, Chang H, Rattner A, Nathans J (2016). Frizzled Receptors in Development and Disease. *Curr Top Dev Biol* 117: 113-39.
86. Schulte G (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol Rev* 62(4): 632-667.
87. Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ beta -catenin signaling: Arrows point the way. *Development* 131(8): 1663-1677.
88. Tran F, Zheng, J (2017). Modulating the wnt signaling pathway with small molecules. *Protein Sci* 26(4): 650-661.
89. Wang Z, Liu C, Huang S, Chen J (2019). Wnt Signaling in vascular eye diseases. *Prog Retin Eye Res* 70: 110-133.
90. Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A (2009). Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol* 156(6): 885–898.
91. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438(7069): 873-877.
92. Logan C, Nusse R (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
93. Huang Y, Liu L, Liu A (2018). Dickkopf-1: Current knowledge and related diseases. *Life Sci* 209: 249-254.
94. Verkaar F, Zaman G (2011). New avenues to target Wnt/ β -catenin signaling. *Drug Discov Today* 16(1-2): 35-41.
95. Gurney A, Axelrod F, Bond CJ, Cain J, Chartier C, Donigan L, Fischer M, Chaudhari A, Ji M, Kapoun AM, Lam A, Lazetic S, Ma S, Mitra S, Park IK, Pickell K, Sato A, Satyal S, Stroud M, Tran H, Yen WC, Lewicki J, Hoey T (2012). Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(29): 11717-11722.

96. Wu D, Pan W (2010). GSK3: A multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* 35(3): 161-168.
97. Ng LF, Kaur P, Bunnag N, Suresh J, Sung I, Tan Q, Gruber J, Tolwinski NS (2019). WNT signaling in disease. *Cells* 8(8), 826.
98. Jin T (2008). The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* 51(10): 1771-1780.
99. Schinner S, Ülgen F, Papewalis C, Schott M, Woelk A, Vidal-Puig A, Scherbaum W (2008). Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules. *Diabetologia* 51(1): 147-154.
100. Kim MH, Hong SH, Lee MK (2013). Insulin receptor-overexpressing β -cells ameliorate hyperglycemia in diabetic rats through Wnt signaling activation. *PLoS ONE* 8(7): e67802.
101. Yi F, Sun J, Lim G, Fantus I, Brubaker P, Jin T (2008). Cross Talk between the insulin and Wnt signaling pathways: Evidence from intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* 149(5): 2341-2351.
102. Liu X, Zhang B, McBride JD, Zhou K, Lee K, Zhou Y, Liu Z, Ma JX (2013). Antiangiogenic and antineuroinflammatory effects of kallistatin through interactions with the canonical Wnt pathway. *Diabetes* 62: 4228-4238.
103. Chen Y, Hu Y, Zhou T, Zhou KK, Mott R, Wu M, Boulton M, Lyons TJ, Gao G, Ma JX (2009). Activation of the Wnt pathway plays a pathogenic role in diabetic retinopathy in humans and animal models. *Am J Pathol* 175: 2676-2685.
104. Li Z, Xu J, Xu P, Liu S, Yang Z (2013). Wnt/beta-catenin signalling pathway mediates high glucose induced cell injury through activation of TRPC6 in podocytes. *Cell Prolif* 46: 76-85.
105. Dai C, Stolz D, Kiss L, Monga S, Holzman L, Liu Y (2009). Wnt/beta-catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 20(9): 1997-2008.
106. Lin CL, Wang JY, Huang YT, Kuo YH, Surendran K, Wang FS (2006). Wnt/beta-catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 17(10): 2812-2820.

107. Xi XH, Wang Y, Li J, Wang FW, Tian GH, Yin MS, Mu YL, Chong ZZ (2015). Activation of Wnt/beta-catenin/GSK3beta signaling during the development of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol* 24: 179-186.
108. Resham K, Sharma SS (2019). Pharmacologic inhibition of porcupine, disheveled, and β -catenin in Wnt signaling pathway ameliorates diabetic peripheral neuropathy in Rats. *J Pain* 20(11): 1338-1352.
109. Monroe D, Mcgee-Lawrence M, Oursler M, Westendorf J (2012). Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene* 492(1): 1-18.
110. Chen S, Liu D, He S, Yang L, Bao Q, Qin H, Liu H, Zhao Y, Zong Z (2018). Differential effects of type 1 diabetes mellitus and subsequent osteoblastic β -catenin activation on trabecular and cortical bone in a mouse model. *Exp Mol Med* 50(12): 158.
111. Ni LH, Tang RN, Yuan C, Song KY, Wang LT, Wang XC, Zhang YX, Zhang XL, Zhu DD, Liu BC (2019). FK506 prevented bone loss in streptozotocin-induced diabetic rats via enhancing osteogenesis and inhibiting adipogenesis. *Ann Transl Med* 7(12): 265.
112. Chen W, Mook RA Jr, Premont RT, Wang J (2018). Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. *Cell Signal* 41: 89-96.
113. Gatica E, Natera JM, Pajares A, Gambetta C, Sancho MI, Massad WA, García NA (2017). Cyclodextrine-nanoencapsulation of niclosamide: Water solubility and meaningful enhancement of visible-light—Mediated sensitized photodegradation of the drug. *J Photochem Photobiol A Chem* 348: 295-304.
114. Li Y, Li PK, Roberts MJ, Arend RC, Samant RS, Buchsbaum DJ (2014). Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug. *Cancer Lett* 349(1): 8-14.
115. Barbosa EJ, Löbenberg R, de Araujo GLB, Bou-Chacra NA (2019). Niclosamide repositioning for treating cancer: Challenges and nano-based drug delivery opportunities. *Eur J Pharm Biopharm* 141: 58-69.
116. Lindenberg M, Kopp S, Dressman J (2004). Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Biopharm* 58(2): 265-278.
117. Osada T, Chen M, Yang XY, Spasojevic I, Vandeußen JB, Hsu D, Clary BM, Clay TM, Chen W, Morse MA, Lyerly HK (2011). Antihelminth compound niclosamide

- downregulates Wnt signaling and elicits antitumor responses in tumors with activating APC mutations. *Cancer Research* 71(12): 4172-4182.
118. Hamilton G, Rath B (2018). Repurposing of anthelmintics as anticancer drugs. *Oncomedicine* 3: 1-8.
 119. Lu W, Lin C, Roberts M, Waud W, Piazza G, Li Y, Mei L (2011). Niclosamide suppresses cancer cell growth by inducing Wnt co-receptor LRP6 degradation and inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. *PLoS ONE* 6(12): E29290.
 120. Chen M, Wang J, Lu J, Bond MC, Ren XR, Lyerly HK, Barak LS, Chen W (2009). The anti-helminthic niclosamide inhibits Wnt/Frizzled1 signaling. *Biochemistry* 48(43): 10267-10274.
 121. Monin MB, Krause P, Stelling R, Bocuk D, Niebert S, Klemm F, Pukrop T, Koenig S (2016). The anthelmintic niclosamide inhibits colorectal cancer cell lines via modulation of the canonical and noncanonical Wnt signaling pathway. *J Surg Res* 203(1): 193-205.
 122. Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461(7264): 614-20.
 123. Sezen FS, Lagoda G, Musicki B, Burnett AL (2014). Hydroxyl fasudil, an inhibitor of Rho signaling, improves erectile function in diabetic rats: a role for neuronal ROCK. *J Sex Med* 11(9): 2164-2171.
 124. Gajbhiye SV, Jadhav KS, Marathe PA, Pawar DB (2015). Animal models of erectile dysfunction. *Indian J Urol* 31(1): 15–21.
 125. Piao S, Kim IG, Lee JY, Hong SH, Kim SW, Hwang TK, Oh SH, Lee JH, Ra JC, Lee JY (2012). Therapeutic effect of adipose-derived stem cells and BDNF-immobilized PLGA membrane in a rat model of cavernous nerve injury. *J Sex Med* 9(8): 1968-1979.
 126. King A (2012). The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* 66(3): 877-894.

127. Garcia MM, Fandel TM, Lin G, Shindel AW, Banie L, Lin CS, Lue TF (2010). Treatment of erectile dysfunction in the obese type 2 diabetic ZDF rat with adipose tissue-derived stem cells. *J Sex Med* 7: 89–98.
128. Chen S, Zhu J, Wang M, Huang Y, Qiu Z, Li J, Chen X, Chen H, Xu M, Liu J, She M, Li H, Yang X, Wang Y, Cai X (2019). Comparison of the therapeutic effects of adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells on erectile dysfunction in diabetic rats. *Int J Mol Med* 44(3): 1006-1014.
129. Hu LL, Zhang KQ, Tian T, Zhang H, Fu Q (2018). Probuocol improves erectile function via a activation of Nrf2 and coordinates the HO-1 / DDAH / PPAR- γ / eNOS pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 507(1-4): 9-14.
130. Chen GT, Yang BB, Chen JH, Zhang Z, Zhu LL, Jiang HS, Yu W, Chen Y, Dai YT (2018). Pancreatic kininogenase improves erectile function in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats with erectile dysfunction. *Asian J Androl* 20(5): 448-453.
131. Chen S, Zhu J, Wang M, Huang Y, Qiu Z, Li J, Chen X, Chen H, Xu M, Liu J, She M, Li H, Yang X, Wang Y, Cai X (2019). Comparison of the therapeutic effects of adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells on erectile dysfunction in diabetic rats. *Int J Mol Med* 44(3): 1006-1014.
132. Carneiro FS, Giachini FR, Carneiro ZN, Lima VV, Ergul A, Webb RC, Tostes RC (2010). Erectile dysfunction in young non-obese type II diabetic Goto-Kakizaki rats is associated with decreased eNOS phosphorylation at Ser1177. *J Sex Med* 7(11): 3620-3634.
133. Morin F, Kavian N, Nicco C, Cerles O, Chéreau C, Batteux F (2016). Niclosamide Prevents Systemic Sclerosis in a Reactive Oxygen Species-Induced Mouse Model. *J Immunol* 197(8): 3018-3028.
134. Morin F, Kavian N, Nicco C, Cerles O, Chéreau C, Batteux F (2016). Improvement of Sclerodermatous Graft-Versus-Host Disease in Mice by Niclosamide. *J Invest Dermatol* 136(11): 2158-2167.
135. Garcia-Martín A, Reyes-García R, García-Fontana B, Morales-Santana S, Coto-Montes A, Muñoz-Garach M, Rozas-Moreno P, Muñoz-Torres M (2014). Relationship of Dickkopf1 (DKK1) with cardiovascular disease and bone metabolism in Caucasian type 2 diabetes mellitus. *PLoS ONE* 9(11): E111703.

136. Tsentidis C, Gourgiotis D, Kossiva L, Marmarinos A, Doulgeraki A, Karavanaki K (2017). Increased levels of Dickkopf-1 are indicative of Wnt/ β -catenin downregulation and lower osteoblast signaling in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus, contributing to lower bone mineral density. *Osteoporos Int* 28(3): 945-953.
137. Shen ZX, Xiao Q, Zhao YX, Zhao KX (2016). Effects of ghrelin on hippocampal DKK-1 expression and cognitive function in rats with diabetes mellitus. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 36(4): 500-505.
138. Liu X, Chen D, Wu Z, Li J, Li J, Zhao H, Liu T (2016). Ghrelin inhibits high glucose-induced 16HBE cells apoptosis by regulating Wnt/ β -catenin pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 477(4): 902-907.
139. Yan P, Tang H, Chen X, Ji S, Jin W, Zhang J, Shen J, Deng H, Zhao X, Shen Q, Huang H (2018). Tamoxifen attenuates dialysate-induced peritoneal fibrosis by inhibiting GSK-3 β / β -catenin axis activation. *Biosci Rep* 20;38(6): BSR20180240.
140. Cuevas CA, Tapia-Rojas C, Cespedes C, Inestrosa NC, Vio CP (2016). (2015). β -catenin-dependent signaling pathway contributes to renal fibrosis in hypertensive rats. *BioMed Research International* 2015: 13.
141. Hsu YC, Lee PH, Lei CC, Ho C, Shih YH, Lin CL (2015). Nitric oxide donors rescue diabetic nephropathy through oxidative-stress-and nitrosative-stress-mediated Wnt signaling pathways. *J Diabetes Investig* 6(1): 24-34.
142. Zhong JM, Lu YC, Zhang J (2018). Dexmedetomidine reduces diabetic neuropathy pain in rats through the Wnt 10a/ β -catenin signaling pathway. *Biomed Res Int* 2018: 9043628.
143. Wang C, Zhu H, Sun Z, Xiang Z, Ge Y, Ni C, Luo Z, Qian W, Han X (2014). Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling promotes epithelial differentiation of mesenchymal stem cells and repairs bleomycin-induced lung injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 307(3): 234-244.
144. Shetti D, Zhang B, Fan C, Mo C, Lee BH, Wei K (2019). Low dose of paclitaxel combined with XAV939 Attenuates metastasis, angiogenesis and growth in breast cancer by suppressing Wnt signaling. *Cells* 8(8): 892.
145. Yang W, Mu XM, Li XQ (2015). XAV939 Inhibits Vascular Remodeling by Reducing Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation in Hypertensive Rats. *J Biomater Tissue Eng* 5(12): 967-973.

146. Miao CG, Yang YY, He X, Huang C, Huang Y, Zhang L, Lv XW, Jin Y, Li J (2013). Wnt signaling in liver fibrosis: progress, challenges and potential directions. *Biochimie* 95: 2326-2335.
147. Chen X, Shi C, Meng X, Zhang K, Li X, Wang C, Xiang Z, Hu K, Han X (2016). Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuating the expression of TGF-beta1 and FGF-2. *Exp Mol Pathol* 101: 22-30.
148. Zollinger AJ, Smith ML (2017). Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol* 60-61: 27-37.
149. Wang K, Seo BR, Fischbach C, Gourdon D (2016). Fibronectin mechanobiology regulates tumorigenesis. *Cell Mol Bioeng* 9: 1-11.
150. Zhang LW, Piao S, Choi MJ, Shin HY, Jin HR, Kim WJ, Song SU, Han JY, Park SH, Mamura M, Kim SJ, Ryu JK, Suh JK (2008). Role of increased penile expression of transforming growth factor-beta1 and activation of the Smad signaling pathway in erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Sex Med* 5(10): 2318-29.
151. Boyapally R, Pulivendala G, Bale S, Godugu C (2019). Niclosamide alleviates pulmonary fibrosis in vitro and in vivo by attenuation of epithelial-to-mesenchymal transition, matrix proteins & Wnt/ β -catenin signaling: A drug repurposing study. *Life Sci* 220: 8-20.
152. Gao K, Wang YS, Yuan YJ, Wan ZH, Yao TC, Li HH, Tang PF, Mei XF (2015). Neuroprotective effect of rapamycin on spinal cord injury via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Neural Regen Res* 10(6): 951-957.
153. Zhang L, Cen L, Qu S, Wei L, Mo M, Feng J, Sun C, Xiao Y, Luo Q, Li S, Yang X, Xu P (2016). Enhancing Beta-Catenin Activity via GSK3beta Inhibition Protects PC12 Cells against Rotenone Toxicity through Nurr1 Induction. *PLoS One* 11(4):e0152931.
154. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 269(49): 30761-30764.
155. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday N, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu V,

Miller DK (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376(6535): 37-43.





EKLER

EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

Sayı : 53488718 -15
Konu: Onay Belgesi

04/01/2017

Sayın, Prof. Dr. F. Sena SEZEN
Eczacılık Meslek Bilimleri ABD, Öğretim Üyesi

"Wnt/ β -Katenin Sinyal Yolu İnhibitörü Nikluzamid'in Diyabetik Çretil Disfonksiyonda Koruyucu Etkisinin Araştırılması" başlık ve 2016/59 protokol numaralı tez çalışma önerisi Kurulumuzca incelenmiş olup; bilimsel ve etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Ahmet AYAR
Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ETİK KURUL DOSYA NO:	2016 / 59
	ÇALIŞMANIN ADI	"Wnt/β-Katenin Sinyal Yolu İnhibitörü Nikkoxamid'in Diyabetik Erkektil Disfonksiyonda Koruyucu Etkisinin Araştırılması"
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. F. Sena SEZEN
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Eczacılık Meslek Bilimleri
	TEZ SAHİBÜDDİĞER ARAŞTIRICILAR ÜNVANI/ADI/SOYADI	Arş.Gör.Seçkin ENGİN, Arş.Gör.Elif Nur BARUT, Arş.Gör.Dr. Yeşim Kaya YAŞAR, Arş.Gör.Serhat SEVGİ
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ:	<input checked="" type="checkbox"/> TIZ <input type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:1	Tarih: 03/01/2017
	KTÜ Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Öğretim Üyesi Prof.Dr.F.Sena SEZEN'in sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Hayvan Deneyleri araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırılması gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı Ek Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Clasitesi	Bilgi (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ahmet AYAR Başkan	Fizyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet ALVER Başkan Yard.	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.AH CANSU Üye	Pediyatri	KTÜ Tıp Fakültesi Pediyatri ABD	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Engin YENİLMEZ Üye	Histoloji ve Embryoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embryoloji ABD	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Zerrin PULATHAN	Kalp ve Damar Cerrahisi	KTÜ Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi ABD	K	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Celal ÇANDIRLI Üye	Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi	KTÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Rezvan ALIYAZICIOĞLU Üye	Temel Eczacılık Bilimleri Biyokimya	KTÜ Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri ABD	K	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Nadir BAŞÇINAR Üye	Balgırcılık Toksikoloji	KTÜ Sıhhiye Deneysel Bilimler Fakültesi Balgırcılık Toksikoloji	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serdar TÜRKYILMAZ Üye	Genel Cerrahi	KTÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Y. Doç.Dr.Emel ÇAKIR Üye	Tıbbi Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD	K	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Veteriner Hekim Sait AL Üye	Veteriner	KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Nurcan AYDIN Üye	Nöroloji	Fatih Devlet Hastanesi Nöroloji Hastanesi	K	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Ecz.Nurcan EYÜPOĞLU Üye	Farmakoloji		K	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	

* Araştırma ile ilgili; ** Toplantıda Bulunma

8. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : ENGİN, Seçkin

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 19.05.1990, ZONGULDAK

E-Posta : seckinengin@ktu.edu.tr

Yazışma adresi : KTÜ Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı
61080 TRABZON

Tel : 0462 377 88 50

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	: KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2013
Lise	: Oktay-Olcay Yurtbay Anadolu Lisesi	2008

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
Araştırma Görevlisi	KTÜ Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	2013-halen
ERASMUS Staj Hareketliliği	Cajal Enstitüsü,İspanya	2015

YABANCI DİL

İngilizce: YDS (77.50) / YÖKDİL (86.25)

ARAŞTIRMA ALANLARI

Düz kas farmakolojisi, Ürogenital sistem farmakolojisi, Erektile disfonksiyon, Diyabetik nöropati ve diyabetin komplikasyonları

ESERLER

SCI, SCI-Expanded, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde basılan ve kabul edilen makaleler

1. Duman M, Kaya Yaşar Y, Barut EN, **Engin S** (2019). Trimebutine maleate relaxes the isolated rat thoracic aorta: The role of nitric oxide and L-type calcium channels Clin Exp Pharmacol Physiol 46:322-328.
2. **Engin S**, Barut EN, Barut B, Duman M, Kaya C, Kerimoğlu G, Özel A (2019). Uroprotective effect of pantoprazole against cyclophosphamide-induced cystitis in mice. Support Care Cancer 27:4273-4281.
3. Barut EN, **Engin S**, Barut B, Kaya C, Kerimoğlu G, Özel A, Kadioglu M (2019). Uroprotective effect of ambroxol in cyclophosphamide-induced cystitis in mice. Int Urol Nephrol 51:803-810.
4. Barut E.N, Barut B, **Engin S**, Yıldırım S, Yaşar A, Türkiş S, Özel A, Sezen FS (2017). Antioxidant capacity, anti-acetylcholinesterase activity and inhibitory effect on lipid peroxidation in mice brain homogenate of Achillea millefolium. Turk J Biochem 4:493-502.

ESCI indeksine giren ve diğer dergilerde basılan ve kabul edilen makaleler

1. Barut B, Barut EN, **Engin S**, Özel A, Sezen F (2019). Investigation of antioxidant, alpha-glucosidase inhibitory, anti-inflammatory and DNA protective properties of Vaccinium arctostaphylos L. Turk J Pharm Sci 2:175-183.
2. **Engin S**, Kılıç M, Gazioğlu EN, Kadioglu Duman M (2013). Effect of Trimebutine Maleate on Acetylcholine, Potassium chloride and Adenosine triphosphate Induced Contractions of Rat Detrusor Smooth Muscle. Fabad J Pharm Sci 38:65-71.

SCI, SCI-Expanded, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde kabul edilen özet makaleler

1. Barut EN, Barut B, **Engin S**, Özel A, Sezen FS (2016). In vitro antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of Achillea millefolium. FEBS JOURNAL, 268-269.

Diğer yayınlar

1. **Engin S**, Aydın NN, Köksal I (2018). Cetirizine-associated bradycardia: A case report". Dermatologica Sin 36:111-112.

Hakemli ulusal ve uluslararası kongre/sempozyum bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Sözlü Bildiri

1. Kaya Yaşar Y, **Engin S**, Barut EN, Sevgi S, Eroğlu G, Sezen FS (2019). Evaluation of potential drug-drug interactions in hospitalized patients at a tertiary care hospital: a pilot study. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development (DRD 2019), 1-3 Temmuz 2019, 107-109, Malatya.
2. **Engin S**, Barut EN, Kaya Yaşar Y, Sevgi S, Sezen FS (2017). Kronik hastalıklara ve ilaç kullanımına bağlı erektil disfonksiyon. 3. Klinik Eczacılık ve Farmasötik Bakım Kongresi, 9-12 Şubat 2017, 47-47, Antalya.

Uluslararası Poster Bildiri

1. **Engin S**, Barut EN, Kaya Yaşar Y, Duman M, Sezen FS (2019). Effects of piracetam on the development of morphine-induced antinociceptive tolerance and dependence in mice. FENS Regional Meeting, 10-13 Temmuz 2019, 623-623, Belgrad.
2. Barut EN, **Engin S**, Kaya Yaşar Y, Sezen FS (2019). Therapeutic effect of riluzole on cavernous nerve injury-induced erectile dysfunction. FENS Regional Meeting, 10-13 Temmuz 2019, 670-670, Belgrad
3. **Engin S**, Barut EN, Eroğlu G, Yariş E, Sezen FS (2018). Evaluation of potential drug-drug interactions among prescriptions of outpatients from Trabzon, Turkey. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 26-29 Haziran 2018, 200-200, Ankara.
4. Barut EN, **Engin S**, Sezen FS (2017). Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis: An Overview of Recent Animal Studies Investigating Mechanism of Action. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, 735-735, İstanbul.
5. Barut EN, **Engin S**, Yariş E, Sezen FS (2017). Trabzon İli Aile Sağlığı Merkezlerine Başvuran Geriatrik Hasta Grubuna Ait Reçetelerin Olası İlaç-İlaç Etkileşimleri Açısından Değerlendirilmesi. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies,, 26-29 Nisan 2017, 450-450, İstanbul.

6. Barut EN, **Engin S**, Barut B, Özel A, Sezen FS (2017). Antioxidant, anti-inflammatory and DNA-damage protection activities of Vaccinium arctostaphylos fruit extracts", International Biochemistry Congress-28.Ulusal Biyokimya Kongresi 19-23 Eylül 2017, 32-32, Erzurum.
7. Barut EN, **Engin S**, Demirtaş H, Renda G, Sezen FS (2017). Investigation of the Effects of Alchemilla barbatiflora Methanol Extract on Isolated Rat Detrusor Muscle. 3rd International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development -DRD 2017, 5-7 Ekim 2017, 150-150, Erzurum.
8. **Engin S**, Barut EN, Kaya Yaşar Y, Doğan İS, Sezen FS (2017). Evaluation of Analgesic and Anti-inflammatory Activities of a Novel Arylalkyl Azole Compound in Mice. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD2017), 5-7 Ekim 2017, 10-10, Erzurum.
9. Barut EN, **Engin S**, Barut B, Abudayyak M, Duman M, Özel A (2016). Ambroxol improves cyclophosphamide-induced oxidative damage and contractility in mice urinary bladder. 7th European Congress of Pharmacology, 26-30 Haziran 2016, Poster Bildirisi, 349-349, İstanbul.
10. **Engin S**, Kılıç M, Gazioğlu EN, Duman M (2015). Effect of Trimebutine Maleate on Acetylcholine, KCl and ATP-Induced Contractions of Detrusor Smooth Muscle. International Gazi Pharma Symposium, 12-15 Kasım 2015, 145-145, Antalya.
11. **Engin S**, Sağlam M, Gazioğlu EN, Duman M (2015). Effects of Trimebutine Maleate on Isolated Rat Detrusor Muscle Contractility. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 9-12 Haziran 2015, 193-194, Ankara.
12. Gazioğlu EN, Sağlam M, **Engin S**, Duman M (2015). Effects of Trimebutine Maleate on Vascular Smooth Muscle of The Isolated Rat Thoracic Aorta. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 9-12 Haziran 2015, 186-187, Ankara.

Ulusal Poster Bildiri

1. **Engin S**, Kaya Yaşar Y, Barut EN, Sezen FS (2019). Niklozamid Tedavisinin Diyabetik Sıçan Torasik Aortasında Endotel Aracılı Gevşeme Yanıtı Üzerine Etkisi, 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7 Kasım 2019, Kuşadası.

2. **Engin S**, Kaya Yaşar Y, Barut EN, Sezen FS (2019). Trimetazidin'in İzole Fare Mesane Detrusör Düz Kas Kontraktilitesine Etkisi, 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7 Kasım 2019, Kuşadası.
3. Eroğlu G, Sevgi S, **Engin S**, Barut EN, Kaya Yaşar Y, Yariş E, et al. (2018). Aile Sağlığı Merkezlerine Yapılan Farmasötik Bakım Rotasyonlarının Eczacılık Eğitimine Kazandırdıkları: KTÜ Eczacılık Fakültesi Deneyimi. II. Ulusal Eczacılık Eğitimi ve Akreditasyon Kongresi, 10-11 Mayıs 2018, 26-26, Eskişehir.
4. Eroğlu G, Sevgi S, **Engin S**, Barut EN, Kaya Yaşar Y, Yariş E, et al. (2018). Klinik Servislerde Yapılan Farmasötik Bakım Uygulamalarının Değerlendirilmesi: Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deneyimi. II. Ulusal Eczacılık Eğitimi ve Akreditasyon Kongresi, 10-11 Mayıs 2018, 25-25, Eskişehir.
5. Kaya Yaşar Y, Barut EN, **Engin S**, Duman M, Sezen FS (2017). İzole Sıçan Torasik Aortasında Konsantrasyon-Bağımlı Trimebutin Maleat Gevşemesinin Mekanizmasının İncelenmesi. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 17-20 Ekim 2017, 113-113, Trabzon.
6. **Engin S**, Barut EN, Kerimoğlu G, Duman M, Sezen FS (2017). Farelerde Siklofosfamid ile Oluşturulan Hemorajik Sistit Modelinde Pantoprazol'ün Koruyucu Etkisi. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 17-20 Ekim 2017, 121-121, Trabzon.
7. **Engin S**, Barut EN, Yariş E, Sezen FS (2017). Trabzon İl Merkezinde Ayaktan Tedavi Gören Hasta Reçetelerinin Olası İlaç-İlaç Etkileşimleri Açısından Değerlendirilmesi. 3. Klinik Eczacılık ve Farmasötik Bakım Kongresi, 9-12 Şubat 2017, 81-81, Antalya.
8. Sevgi S, Gazioğlu EN, **Engin S**, Yariş E, Sezen FS (2015). Eczacılık Fakültesi Lisans Eğitiminde Farmasötik Bakım Dersi Uygulaması: Aile Sağlığı Merkezlerinde Klinik Rotasyon. 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 7-10 Eylül 2015, 271-271, Ankara.

ÖDÜLLER / TEŞVİKLER / BURSLAR

1. TÜBİTAK 1001 Projesi (217S434), Bursiyer, Temmuz 2018-halen
2. 2211-A Yurt içi Genel Doktora Bursu, TÜBİTAK BİDEB, 2014-2018
3. Cajal Enstitüsü, İspanya Erasmus Staj Hareketliliği, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Temmuz-Eylül 2015.