



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAVERNÖZ SİNİR HASARIYLA  
İNDÜKLENEN EREKTİL DİSFONKSİYONDA  
RİLUZOLÜN NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

Elif Nur BARUT

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Feride Sena SEZEN

TRABZON-2019





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAVERNÖZ SİNİR HASARIYLA  
İNDÜKLENEN EREKTİL DİSFONKSİYONDA  
RİLUZOLÜN NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

Elif Nur BARUT

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Feride Sena SEZEN

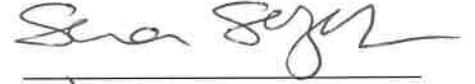
TRABZON-2019

## ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Elif Nur Barut'un hazırladığı "Kavernöz sinir hasarıyla indüklenen erektil disfonksiyonda riluzolün nöroprotektif etkisinin incelenmesi" başlıklı çalışma Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/12/2019

Prof. Dr. Feride Sena SEZEN  
(Danışman)



Prof. Dr. Rasin ÖZYAVUZ



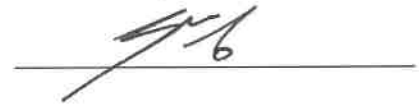
Prof. Dr. Ersin YARIŞ



Prof. Dr. Günay YETİK ANACAK



Prof. Dr. Süleyman Sırrı BİLGE



---

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 aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

18.12.2019  
*Elif Nur BARUT*

## ***İthaf***

*Doktora tezimi, hayatım boyunca en karanlık anlarımda bana ışık olan canım aileme ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Doktoraya başladığım ilk günden itibaren bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan, yol gösteren ve çözüm önerileri sunan, akademik bakış açısını ve bilim insanlığını örnek aldığım, hiçbir zaman merhametini ve desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Feride Sena SEZEN'e,

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve birikimlerinden yararlandığım tez izleme komitesindeki değerli hocalarım Prof. Dr. Rasin ÖZYAVUZ ve Prof. Dr. Ersin YARIŞ'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, bilimsel araştırmalarımız için huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan başta anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU olmak üzere değerli Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Karşılaştığım her problemde bana yol gösteren, manevi desteklerini hep hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Mine DUMAN, Doç Dr. Arzu ÖZEL ve Dr. Öğr. Üyesi Yeşim KAYA YAŞAR'a,

Moleküler ve analitik çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde tüm laboratuvar imkanlarıyla destek olan Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER ve Arş. Gör. Sercan YILDIRIM'a,

Bu uzun akademik serüvene beraber başladığım, her türlü zorluğu birbirimize olan desteğimizle göğüslediğimiz, varlıkları sebebiyle her zaman kendimi şanslı hissettiğim yol arkadaşlarım Arş. Gör. Seçkin ENGİN ve Ecz. Merve KILIÇ'a,

Bugünlere ulaşabilmemin en büyük mimarları olan, beni sonsuz sevgileriyle büyüten, hayata hazırlayan ve evlatları olmaktan her zaman gurur duyduğum canım aileme,

Akademik hayatımın zorlu sürecinde karşıma çıkarak bu yolu benimle beraber yürüterek güzelleştiren, sonsuz sabrı ve anlayışıyla yanımda olan, desteğini her zaman kalbimde hissettiğim sevgili eşim Burak BARUT'a,

Tez çalışmamı TDK-2018-7672 kodlu projeyle destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Elif Nur BARUT

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>İÇ KAPAK SAYFASI</b>	
<b>KABUL ve ONAY</b>	
<b>BEYAN</b>	
<b>İthaf</b>	
<b>TEŞEKKÜR</b>	
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>x</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ</b>	<b>xii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvi</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Erektıl Fonksiyon	4
2.1.1. Penisin Anatomik Yapısı	4
2.1.2. Penisin Kan Dolaşımı	6
2.1.3. Penisin İnervasyonu	6
2.1.4. Fizyolojisi	9
2.2. ED	10
2.2.1. Tanımı ve Epidemiyolojisi	10
2.2.2. Risk Faktörleri	11
2.2.3. Sınıflandırılması	12
2.2.4. Tedavisi	14
2.3. Periferik Nöropati	16
2.3.1. Tanımı	16
2.3.2. Patofizyolojisi	17
2.3.3. Travmatik Nöropatiler	17
2.3.4. Periferik Nöropati ve PKC Yolağı İlişkisi	19
2.3.5. Periferik Nöropati ve GT İlişkisi	20



2.3.6. Periferik Nöropati ve Ürogenital Sistem İlişkisi	21
2.4. ED’de Deneysel Hayvan Modelleri	22
2.4.1. Diyabet Modelleri	23
2.4.2. Yaşlanma Modelleri	24
2.4.3. Hiperkolestrolemi Modelleri	24
2.4.4. Hipertansiyon Modelleri	24
2.4.5. KS Hasarı	25
2.4.6. Diğer Modeller	26
2.5. Riluzol	26
2.5.1. Kimyasal Yapısı ve Endikasyonları	26
2.5.2. Farmakokinetik Özellikleri	27
2.5.3. Etki Mekanizması	27
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>29</b>
3.1. Gereç	29
3.1.1. Kimyasallar	29
3.1.2. Antikorlar	30
3.1.3. Cihazlar	31
3.1.4. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	32
3.1.4.1. Stok Çözelti ve Tamponlar	32
3.1.4.2. Çalışma Çözeltileri ve Tamponları	34
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Riluzol Çözeltisinin Hazırlanması	35
3.2.2. Rilutek® 50 mg Film Tabletten Riluzol Geri Kazanım Analizi	36
3.2.3. Deney Hayvanları	36
3.2.4. Deney Grupları ve Deneysel Protokol	36
3.2.5. BKSH Modelinin Oluşturulması	37
3.2.6. OAB Ölçümü	39
3.2.7. İKB Ölçümü	41
3.2.8. Doku Homojenatlarının Hazırlanması	43
3.2.9. Total Protein Tayini	43
3.2.10. Western Blotlama	44
3.2.10.1. Jelin Hazırlanması	44
3.2.10.2. Doku Örneklerinin Yüklenmesi ve Yürütülmesi	44

3.2.10.3. Transfer İşlemi	45
3.2.10.4. Membranın Bloklanması	47
3.2.10.5. Primer Antikorla İnkübasyon	47
3.2.10.6. Sekonder Antikorla İnkübasyon	48
3.2.10.7. “Stripping” İşlemi	49
3.2.10.8. Görüntüleme	49
3.3. İstatistiksel Analiz	50
<b>4. BULGULAR</b>	<b>51</b>
4.1. Rilutek® 50 mg Film Tabletten Riluzol Geri Kazanımı	51
4.2. <i>In vivo</i> Erektıl Fonksiyonun Değerlendirilmesi	52
4.2.1. BKSH’yi Takiben Gelişen ED’de 1 Günlük Riluzol Tedavisinin Etkisi	52
4.2.2. BKSH’yi Takiben Gelişen ED’de 7 Günlük Riluzol Tedavisinin Etkisi	53
4.2.3. BKSH’yi Takiben Gelişen ED’de 15 Günlük Riluzol Tedavisinin Etkisi	55
4.2.4. Spontan Ereksiyon (SE) Oluşumuna Riluzolün Etkisi	58
4.3. Western Blot Sonuçları	60
4.3.1. Penis Dokusunda BKSH’yi Takiben Riluzol Tedavisinin PKC $\beta$ II ve p-PKC $\beta$ II Ekspresyonu Üzerine Etkisi	60
4.3.2. MPG dokusunda BKSH’yi Takiben Riluzol Tedavisinin p-PKC $\beta$ II Ekspresyonu Üzerine Etkisi	62
4.3.3. MPG Dokusunda BKSH’yi Takiben Riluzol Tedavisinin EAAT-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi	63
4.3.4. MPG Dokusunda BKSH’yi Takiben Riluzol Tedavisinin EAAT-2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi	64
4.3.5. MPG Dokusunda BKSH’yi Takiben Riluzol Tedavisinin GAP-43 Ekspresyonu Üzerine Etkisi	65
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>67</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>76</b>
<b>EKLER</b>	<b>99</b>
EK 1. Etik Kurul Onayı	100
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>102</b>

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo No</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b>	ED sınıflandırılması	13
<b>Tablo 2.</b>	Kullanılan kimyasallar, marka ve kodları	29
<b>Tablo 3.</b>	Kullanılan antikorlar, marka ve kodları	30
<b>Tablo 4.</b>	Kullanılan cihazlar ve markaları	31
<b>Tablo 5.</b>	TNTE lizis tamponu hazırlamak için gerekli stok çözeltiler, konsantrasyonları ve hacimleri	34
<b>Tablo 6.</b>	Deney grupları	37
<b>Tablo 7.</b>	Primer antikor seyreltme oranları, çözeltileri, inkübasyon sıcaklığı ve süreleri	48
<b>Tablo 8.</b>	Sekonder antikor seyreltme oranları, çözeltileri, inkübasyon sıcaklığı ve süreleri	48
<b>Tablo 9.</b>	Tedavi gruplarına göre SE sayıları ve yüzdeleri	59

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa	
Şekil 1.	Sıçan MPG inervasyonu	8
Şekil 2.	Riluzolün kimyasal yapısı	26
Şekil 3.	Islak transfer kaset içeriği	46
Şekil 4.	Rilutek® 50 mg film tabletten riluzol geri kazanım analizi	51
Şekil 5.	1 günlük BKSH ve riluzol tedavisini takiben erektil fonksiyon göstergesi mİKB/OAB oranlarının değerlendirilmesi	52
Şekil 6.	1 günlük BKSH ve riluzol tedavisini takiben erektil fonksiyon göstergesi total İKB/OAB oranlarının değerlendirilmesi	53
Şekil 7.	7 günlük BKSH ve riluzol tedavisini takiben erektil fonksiyon göstergesi mİKB/OAB oranlarının değerlendirilmesi	54
Şekil 8.	7 günlük BKSH ve riluzol tedavisini takiben erektil fonksiyon göstergesi total İKB/OAB oranlarının değerlendirilmesi.	55
Şekil 9.	15 günlük BKSH ve riluzol tedavisini takiben erektil fonksiyon göstergesi mİKB/OAB oranlarının değerlendirilmesi	57
Şekil 10.	15 günlük BKSH ve riluzol tedavisini takiben erektil fonksiyonun göstergesi total İKB/OAB oranlarının değerlendirilmesi	58
Şekil 11.	7 ve 15 günlük riluzol tedavisini takiben görülen SE'nin değerlendirilmesi	60
Şekil 12.	7 ve 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisininin penis PKC $\beta$ II ekspresyon düzeyine etkisi	61
Şekil 13.	7 ve 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisininin penis p-PKC $\beta$ II ekspresyon düzeyine etkisi	62
Şekil 14.	7 ve 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisininin MPG p-PKC $\beta$ II ekspresyon düzeyine etkisi	63
Şekil 15.	7 ve 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisininin MPG EAAT-1 ekspresyon düzeyine etkisi.	64
Şekil 16.	7 ve 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisininin MPG EAAT-2 ekspresyon düzeyine etkisi.	65
Şekil 17.	7 ve 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisininin MPG GAP-43 ekspresyon düzeyine etkisi.	66

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim No</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Resim 1.</b>	İnsan penis dokusunun enine kesiti	4
<b>Resim 2.</b>	Sıçan penis dokusunun enine kesitinin histolojik görüntüsü	5
<b>Resim 3.</b>	Penisin inervasyonu	7
<b>Resim 4.</b>	BKSH modelinin oluşturulması	38
<b>Resim 5.</b>	Karotid arter izolasyonu	39
<b>Resim 6.</b>	Karotid arter kateterizasyonu	40
<b>Resim 7.</b>	İntrakavernöz kanül yerleştirilmesi	41
<b>Resim 8.</b>	İKB ölçümü	42
<b>Resim 9.</b>	Protein elektroforezi görüntüsü	45
<b>Resim 10.</b>	Transfer işlemi	47
<b>Resim 11.</b>	ChemiDoc <sup>TM</sup> MP görüntüleme cihazı	49

## KISALTIMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

### Kısaltmalar

<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>ACh</b>	Asetilkolin
<b>ALS</b>	Amiyotrofik lateral sklerozis
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propiyonik asit
<b>APS</b>	Amonyum persülfat
<b>BCA</b>	Bikinkoninik asit
<b>BDNF</b>	Beyin kaynaklı büyüme faktörü
<b>BKSH</b>	Bilateral kavernöz sinir hasarı
<b>BPH</b>	Benign prostat hiperplazisi
<b>BSA</b>	Bovin serum albumin
<b>cAMP</b>	Siklik adenzin monofosfat
<b>cGMP</b>	Siklik guanozin monofosfat
<b>CGRP</b>	Kalsitonin gen ilişkili peptid
<b>cPLA<sub>2</sub></b>	Sitozolik fosfolipaz A2
<b>CYP</b>	Sitokrom
<b>DAG</b>	Diaçilgliserol
<b>dk</b>	Dakika
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EAAT</b>	Eksitator aminoasid taşıyıcısı
<b>ED</b>	Eretil disfonksiyon
<b>EDTA</b>	Etilendiamin tetra asetik asit
<b>eNOS</b>	Endotelyal nitrik oksit sentaz
<b>GAP-43</b>	Büyüme ilişkili protein-43
<b>GT</b>	Glutamat taşıyıcısı
<b>i.p.</b>	İntraperitoneal
<b>İKB</b>	İntrakavernöz basınç
<b>iNOS</b>	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>İP<sub>3</sub></b>	İnositol trifosfat
<b>kDa</b>	Kilodalton

<b>KS</b>	Kavernöz sinir
<b>KTÜ</b>	Karadeniz Teknik Üniversitesi
<b>MAPK</b>	Mitojenle aktive olan protein kinaz
<b>MEK</b>	Mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz
<b>MHZK</b>	Miyozin hafif zincir kinaz
<b>mİKB</b>	Maksimum intrakavernöz basınç
<b>MPG</b>	Majör pelvik gangliyon
<b>MPOA</b>	Medial preoptik alan
<b>NA</b>	Noradrenalin
<b>NANK</b>	Nonadrenerjik-nonkolinerjik
<b>NGF</b>	Sinir büyüme faktörü
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartat
<b>nNOS</b>	Nöronal nitrik oksit sentaz
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>NT-4</b>	Nörotrofin-4
<b>OAB</b>	Ortalama arteriyel basınç
<b>PDE</b>	Fosfodiesteraz
<b>PGE</b>	Prostaglandin E
<b>PE-50</b>	Polietilen 50
<b>PKC <math>\beta</math> II</b>	Protein kinaz C beta II
<b>p-PKC <math>\beta</math> II</b>	Fosfo-protein kinaz C beta II
<b>PKG</b>	Protein kinaz G
<b>PLC</b>	Fosfolipaz C
<b>PMSF</b>	Fenil metil sülfonil florid
<b>PVDF</b>	Polivinilidin florür
<b>PVN</b>	Paraventriküler nükleus
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>ser</b>	Serin
<b>SF</b>	Serum fizyolojik
<b>sGC</b>	Çözünebilir guanilat siklaz
<b>SHR</b>	Spontan hipertansif sıçan

<b>sn</b>	Saniye
<b>STZ</b>	Streptozotosin
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiaminden
<b>TGS</b>	Tris-Glisin-SDS
<b>Thr</b>	Treonin
<b>VIP</b>	Vazoaktif intestinal polipeptid
<b>YBSK</b>	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

### **Simgeler**

<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\gamma</math></b>	Gama
<b><math>\delta</math></b>	Delta
<b><math>\zeta</math></b>	Zeta
<b><math>\epsilon</math></b>	Epsilon
<b><math>\mu</math></b>	Mikro
<b><math>\eta</math></b>	Eta

### **Formüller**

<b><math>\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7</math></b>	Sodyum pirofosfat dibazik
<b><math>\text{Na}_3\text{VO}_4</math></b>	Sodyum orthovanadat
<b><math>\text{NaCl}</math></b>	Sodyum klorür
<b><math>\text{NaF}</math></b>	Sodyum florür
<b><math>\text{HCl}</math></b>	Hidroklorik asit



## ÖZET

### **Kavernöz Sinir Hasarıyla İndüklenen Eretil Disfonksiyonda Riluzolün Nöroprotektif Etkisinin İncelenmesi**

Periferik nöropati; metabolik hastalıklar, travmalar ve ilaçlar gibi birçok farklı nedenle periferik nöronlarda ve destek hücrelerinde meydana gelen ciddi bir disfonksiyondur. Radikal prostatektomi, periferik nöropati kaynaklı olduğu kabul edilen, ameliyat sonrası komplikasyonların sık görüldüğü cerrahi bir işlemdir. Cerrahi işlem sırasında öngörülmeven nöronal hasardan kaynaklanan erektile disfonksiyon (ED) mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış önemli bir komplikasyondur. Bu çalışmada amiyotrofik lateral sklerozis (ALS)'nin tedavisinde kullanılan ilk ilaç olan riluzolün, ilaç yeniden amaçlandırma/yeniden konumlandırılması kapsamında sıçan bilateral kavernöz sinir hasarı modeli (BKSH) sonucu gelişen ED'ye etkisi ve bu etkiye aracılık ettiğini düşündüğümüz PKC  $\beta$  ve glutamat taşıyıcılarıyla (GT) ilişkisi incelendi.

Yetişkin Sprague-Dawley erkek sıçanlara (275-400 g) sham operasyonu veya BKSH hasarı sonrası 1, 7 ve 15 günlük riluzol (8 mg/kg/gün; i.p.) veya taşıyıcı tedavisi uygulandı (n=5-7/grup). *In vivo* erektile fonksiyon maksimum intrakavernöz basınç (mİKB)/ortalama arteriyel basıncı (OAB) ve total İKB/OAB oranları olarak değerlendirildi. Belirlenen yolaklara ilişkin protein ekspresyonlarındaki değişiklikler western blot tekniğiyle incelendi. BKSH sonrası 7 ve 15. günde mİKB/OAB ve total İKB/OAB oranları anlamlı olarak azalırken 1 gün sonrasında herhangi bir değişiklik saptanmadı. BKSH sonrası 7 günlük riluzol tedavisi erektile fonksiyondaki azalmayı önleyemezken 15 günlük riluzol tedavisi erektile fonksiyondaki azalmayı önledi. 7 ve 15 günlük riluzol tedavisi alan sıçanların önemli bir kısmında spontan İKB artışı gözlemlendi. BKSH sonrası peniste p-PKC  $\beta$  II ekspresyonu azalırken 15 günlük riluzol tedavisi azalmayı önledi. BKSH sonrası majör pelvik gangliyonda (MPG) GT ekspresyonları azalırken 15 günlük riluzol tedavisi eksitator aminoasit taşıyıcısı-2 (EAAT-2) ekspresyonunda gözlenen azalmayı önledi. Sonuç olarak, riluzol tedavisinin beklenmedik şekilde spontan ereksiyonlara neden olduğu ve uzun dönem riluzol tedavisinin sinir hasarı sonucu gelişen erektile fonksiyondaki azalmayı önlediği görüldü. Riluzolün bu terapötik etkisinden fosfo-PKC  $\beta$  II ve GT'lerden EAAT-2 ekspresyonunda meydana getirdiği değişikliklerin sorumlu olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Glutamat taşıyıcısı, İtrakavernöz basınç, Majör pelvik gangliyon, Protein kinaz C beta, Sıçan

## ABSTRACT

### **Investigation of Riluzole Neuroprotective Effect on Erectile Dysfunction Following Cavernous Nerve Injury**

Peripheral neuropathy is a serious dysfunction of peripheral neurons and supporting cells caused by various factors such as metabolic diseases, trauma and drugs. Erectile dysfunction (ED) is the impairment of erectile capacity which is a highly prevalent complication after radical prostatectomy and the underlying mechanisms remain incompletely defined. In this study, we aimed to evaluate the potential use of riluzole which is the first clinically approved drug used for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), in the context of drug repurposing/repositioning by investigating the effects of riluzole in a rat model of bilateral cavernous nerve injury (BCNI) and to clarify the potential role of PKC- $\beta$  and glutamate transporters (GT) pathways.

Male Sprague-Dawley rats (275-400 g) underwent BCNI or sham injury. Rats were then divided into vehicle or riluzole (8mg/kg/day, i.p.) treatment groups for 1, 7 or 15 days (n=5-7/group). *In vivo* erectile function was evaluated using maximum intracavernous pressure (mICP)/mean arterial pressure (MAP) and total ICP/MAP ratios. Protein expression levels were examined by western blot technique. mICP/MAP and total ICP/MAP were lower in BCNI groups compared with sham groups at 7 and 15 days without a change at 1 day post-injury. Riluzole treatment for 15 days prevented the decrease in erectile function compared with vehicle treatment following BCNI although erectile function was not different with 7-days riluzole treatment. Spontaneous ICP increases were observed in most of rats receiving riluzole treatment for 7 or 15 days. phospho-PKC  $\beta$  II expression was significantly reduced after 7 and 15 days post-injury in the penis that was prevented by 15-days of riluzole treatment. While GT protein expression decreased in major pelvic ganglion (MPG) post-injury, 15-days riluzole treatment prevented the decrease in EAAT-2 expression. In conclusion, long-term riluzole treatment has been shown to prevent a decrease in erectile function and unexpectedly 7 and 15-days riluzole treatment caused spontaneous erections. Changes in protein expressions of EAAT-2 and phospho-PKC  $\beta$  II appear to be responsible for the therapeutic effects of riluzole.

**Keywords:** Glutamate transporter, Intracavernous pressure, Major pelvic ganglia, Protein kinase C beta, Rat

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Metabolik hastalıklar, toksinler, enfeksiyonlar, ilaçlar ve özellikle travmalar başta olmak üzere birçok çeşitli nedenle periferik sinir sistemi nöronları ve destek hücrelerinde gelişen disfonksiyon olarak tanımlanan periferik nöropati, radikal prostatektomi sonrası gözlenen komplikasyonların da ana nedenini oluşturmaktadır. Prostat kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) erkek yetişkin bireyler arasında en sık rastlanan kanser tipidir (1, 2). Tüm dünyada her yıl yaklaşık 900.000 kişi prostat kanseri tanısı almaktadır ve tanı alan hastaların önemli bir kısmı radikal prostatektomi operasyonu geçirmektedir (3). Bu operasyon sırasında; mesane, prostat, penis ve diğer alt üriner sistemi inerve eden sinirlerin zarar görmesini engelleyici, sinirlerin korunduğu tekniklerin geliştirilmesine rağmen günümüzde hala radikal prostatektomi geçiren bireylerde %14-90 arasında ED geliştiği gözlenmiştir (4). Radikal prostatektomi ile indüklenen başta ED olmak üzere üriner inkontinas ve benzeri ürogenital komplikasyonların etkin tedavi edilememesi hastaların yaşam kalitelerini önemli oranda azaltan klinik problemlerdir.

Eretil fonksiyon santral ve periferik nöronal mekanizmaların stimülasyonu ile korpus kavernozum düz kasının kasılma ve gevşemesinin kontrol edildiği kompleks nörovasküler bir olaydır (5). Penis dokusu otonomik (sempatik-parasempatik) ve somatik (duyusal-motor) nöronlarla inerve edilir. Spinal kord ve periferik gangliyondan çıkan sempatik ve parasempatik sinir lifleri KS'leri oluşturarak korporal düz kas dokusuna yayılır. Korpus kavernozum ve korpus spongiosum erektil cevabın safhalarındaki nörovasküler olaylardan sorumludurlar. Bu nedenle beyin, spinal kord ve bu inervasyonu etkileyen herhangi bir hastalık ve/veya travma bu kompleks yapıyı ve nörovasküler fonksiyonu etkileyerek ED'ye neden olacaktır (6). Özellikle KS'lere yakın komşulukta bulunan pelvik organlara yapılacak bir cerrahi müdahale, bası, çekme hareketi veya koagülasyona bağlı gelişecek olan nöropraksi; sinir lifi dejenerasyonuna, nokturnal erektil fonksiyon kaybına neden olarak ED ve inkontinans gelişimi ile sonuçlanabilmektedir (7).

Radikal prostatektomi sonucu gelişen ED'nin esas olarak dokuların inervasyonunu sağlayan sinirlerin hasarı/dejenerasyonu kaynaklı olduğu düşünülse de altında yatan komplike bir patofizyolojik durum ve halen aydınlatılmamış birçok mekanizma olduğu tartışılmaktadır (8). İnervasyonu sağlayan pelvik sinir lifleri hasarlanmaya bağlı olarak dejenerasyona uğrarken, penis dokusunda bu süreçte azalan inervasyon ve tam olarak

bilinmeyen faktörlere bağı vasküler yetersizlikler korporal düz kas dokusunun müküleri özelliklerini kaybetmesine, inflamatuvar ve fibrotik değişikliklere yol açmaktadır (7, 8).

Organ ve dokuları inerve eden periferik sinirlerin travmatik veya endokrin hastalıklar nedeniyle hasar görmesi, gerek sinirlerde gerekse dokularda geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz yapısal ve fonksiyonel bozukluklara yol açmaktadır. Mevcut tedavi şekilleri bu değişiklikleri önleme veya düzeltmede yeterli etkinlikte değildir ve bu nedenle periferik nöropati patofizyolojisinde rol oynayan yeni mekanizmaların anlaşılması, nörorejeneratif/nöroprotektif etkiyi hedefleyen yeni muhtemel terapötik ajanların bulunması ve geliştirilmesi önemlidir.

Riluzol (2-amino-6-(triflorometoksi) benzotiazol), ilk olarak antikonvulsan, anksiyolitik ve anestezik özellikleriyle keşfedilmesine rağmen günümüzde nörodejeneratif bir hastalık olan ALS' nin tedavisinde kullanılan etkisi kanıtlanmış ilk ilaç olup, 1996 yılında ALS tedavisi için FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır (9, 10). Riluzolün ALS hastalığındaki etkinliğinin nöron koruyucu etkisine bağı olduğu düşünülmektedir (11). Riluzolün nöron koruyucu etkisinin mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte çeşitli hücresele hedefler ve yollar önerilmiştir. Farklı çalışmalarda riluzolün hacme-duyarlı klorür kanallarını (12), voltaj-bağımlı kalsiyum kanallarını (13), N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör aracılı kanalları inhibe ettiği ileri sürülmüştür (14). Bir başka çalışmada ise riluzolün sitozolik fosfolipaz A2 (cPLA2)'yi inhibe ederek araşidonik asit oluşumunu azalttığı ve bu şekilde antioksidatif etki gösterdiği ifade edilmiştir (15). Bu etkilerinin yanında riluzolün nöronal ölümün önemli mekanizmalarından biri olan glutamerjik eksitotoksisteyi GT'leri aktive ederek önlediği, bu etkinin de nöroprotektif mekanizmalarından biri olduğu diğer çalışmalarda öne sürülmüştür (16, 17). Ayrıca riluzolün oksidatif nöronal hasar oluşumunda rol oynayan PKC  $\beta$  inhibitörü etkinliği de bilinmekte ve bu konudaki araştırmalar devam etmektedir (18). Özellikle periferik sinir hasarı ve diyabet sonucu periferik nöropati gelişimini takiben PKC- $\beta$  II alt tipinin aktive olduğu ve riluzol tedavisinin bu alt tipi inhibe ederek nöroprotektif etki gösterdiği saptanmıştır (19–21).

Sonuç olarak mevcut durumda riluzol, klinikte ALS gibi nörodejeneratif temelli bir hastalığın tedavisinde ispatlanmış terapötik etkinliği ve tolere edilebilir yan etkileri sebebiyle güvenle kullanılmakta olan bir ajandır. Güvenli doz aralıklarının ve farmakokinetik profilinin ayrıntılı olarak belirlenmiş olması farklı endikasyonlarla

kullanılabilmesinin önünü açmaktadır. Günümüzde, bu şekilde klinik kullanımı olan ilaçların yeni klinik endikasyonlar için araştırılması olarak tanımlanan yeniden amaçlandırma/ yeniden konumlandırma, (*drug repurposing and repositioning*) ilaç araştırma ve geliştirilmesinde güncel ve önemli bir yaklaşımdır. Bu sebeple, bu çalışma kapsamında nörodejenerasyonun temel etken olarak karşımıza çıktığı radikal prostatektomi sonucu gelişen ED modeli olarak kullanılan sıçan BKSH modelinde riluzolün etkinliği ve bu etkide PKC  $\beta$  II ve GT'lerin rolü incelenmiştir.

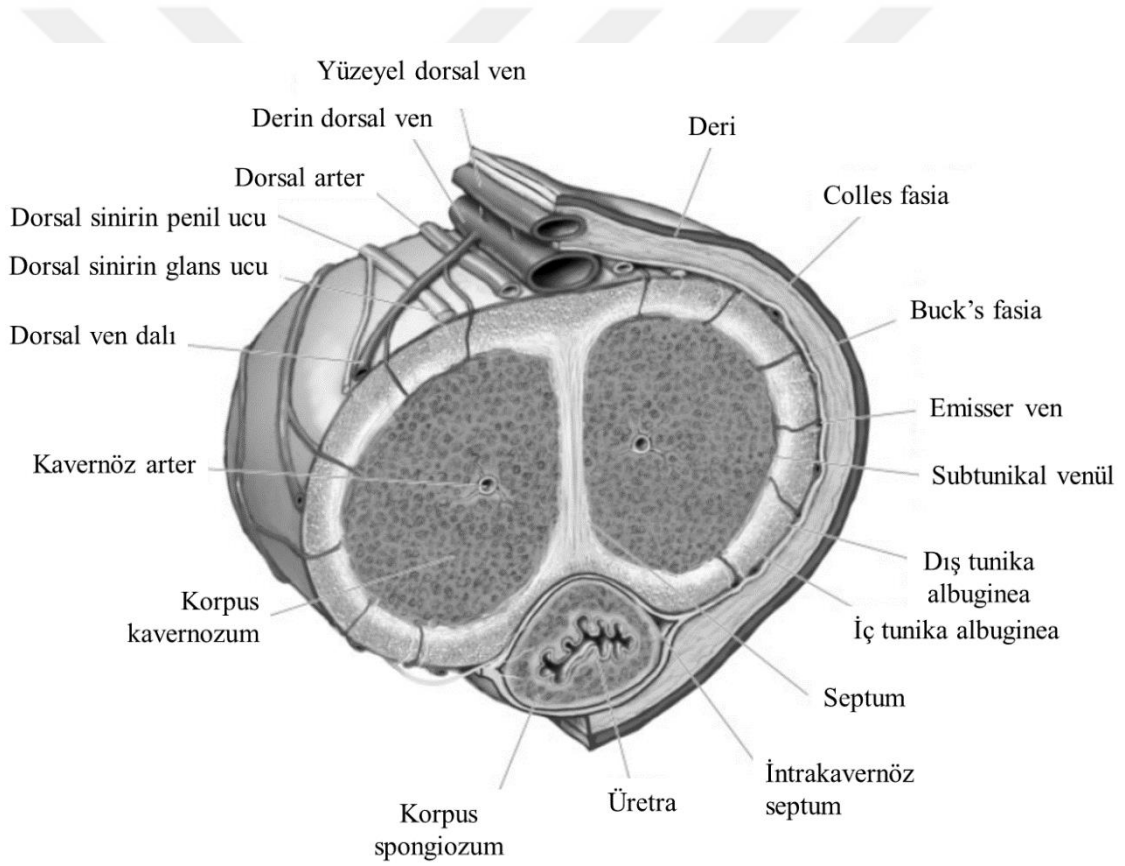


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erektıl Fonksiyon

#### 2.1.1. Penisin Anatomik Yapısı

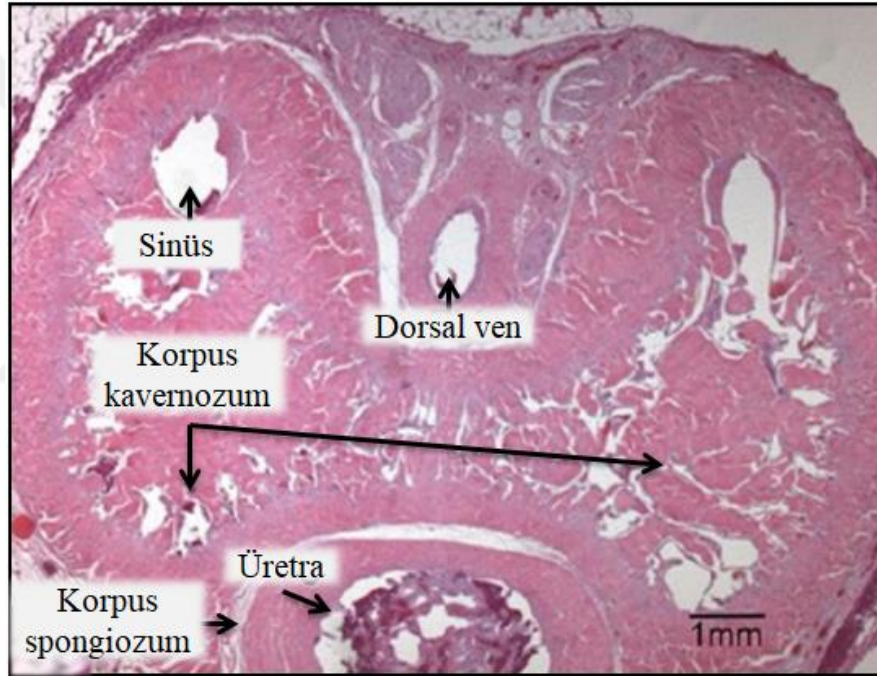
İnsanda penis; bölünmüş iki adet korpus kavernozum ve ventral kısımda yerleşmiş korpus spongiozum yapısından oluşmaktadır. Korpus spongiozum üretrayı içine alır ve distalde glans penisle birleşir. Korpus kavernozum ve spongiozum tunika albuginea adı verilen fibröz bir kılıfla çevrilidir. İki korpus kavernozum arasında bir arada çalışmalarına engel olmayacak şekilde iki yapıyı kısmen ayıran septal bir tabaka bulunmaktadır (Resim 1) (22–24).



**Resim 1.** İnsan penis dokusunun enine kesiti (Dwyer'den, 24)

Tunika albuginea tabakasının dışında korpora dokularını saran iki ayrı fibröz tabaka, Buck's ve Colles fasiaları bulunmaktadır. Bu fibröz tabakaları ise penis derisi çevrelemektedir (23).

Korpus kavernozum tunika albugineayla çevrili arteriyel sinuzoidlerden ve düz kastan oluşan iki süngerimsi yapı olarak tanımlanmaktadır. Korpus kavernozumunu saran tunika albuginea tabakası yaklaşık 2-3 mm kalınlığında olup çoğunlukla kollajen liflerden oluşmaktadır. Korpus spongiozumun yapısı da histolojik olarak korpus kavernozumuna benzer olup daha büyük sinuzoidal yapılar içermektedir. Ancak korpus kavernozumdan farklı olarak korpus spongiozumu saran tunika albuginea tabakası daha incedir ve kollajen lifler yerine daha çok elastik lifler içerir (25). Glans penis, penisin distal bölümünü oluşturur ve korpus spongiozum tabakasının devamı şeklindedir. Albuginea tabakası bulundurmaz ve oldukça ince bir deri tabakasıyla çevrilidir (22).



**Resim 2.** Sıçan penis dokusunun enine kesitinin histolojik görüntüsü (Seyam'dan, 26)

Ürogenital sistem üzerine yapılan deneysel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen rodentler insanlardan farklı olarak penisin distalinde başlayan ve glans peniste fibröz kıkırdak dokusuna dönüşen os penis adı verilen kemik dokusuna sahiptir. Rodentlerde tüm penis dokusu prepisyum dokusuyla kaplıdır. Ayrıca insanda görüldüğü gibi iki korpus kavernozum yapısı arasında bir septum bulunmamaktadır. İnsana benzer şekilde penis proksimalinde korpus kavernozum ve üretrayı saran korpus spongiozum vasküler erektil yapıları bulunmaktadır (Resim 2) (26, 27).

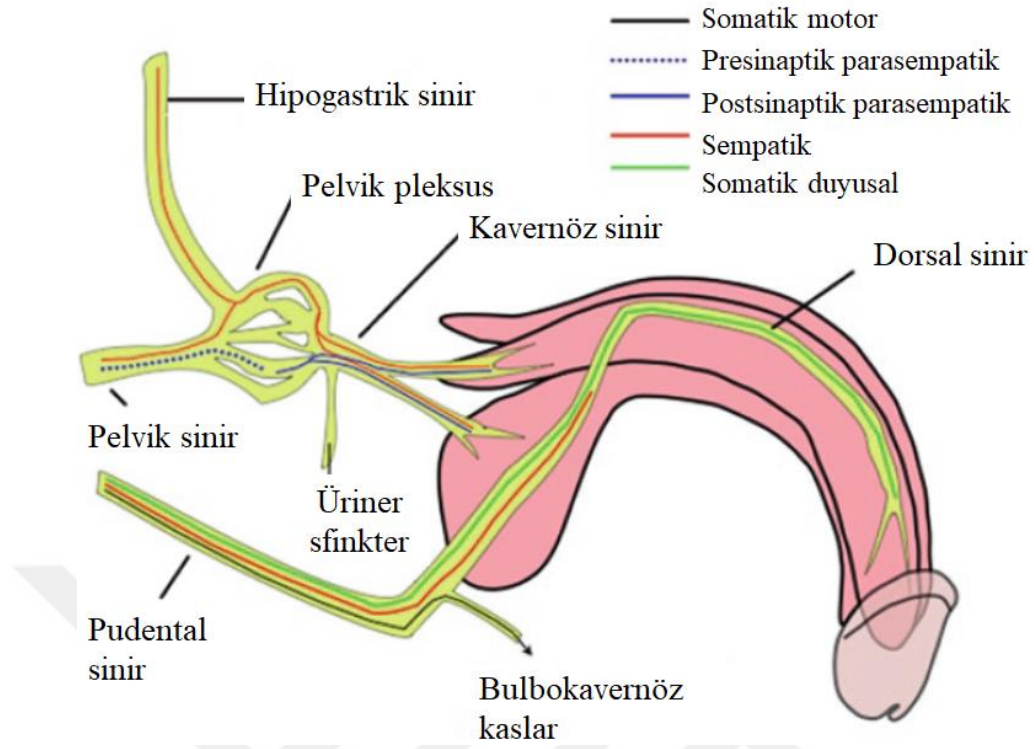
### **2.1.2. Penisin Kan Dolaşımı**

Penis internal iliak arterin bir dalı olan internal pudental arter aracılığıyla beslenmektedir. İnternal pudental artere ek olarak eksternal iliak, vezikal ve femoral arter dallarının da penil dokunun beslenmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir (22, 28). Penil arter temel olarak kavernöz, dorsal, üretral ve bulbar arterler olmak üzere 4 ana daldan oluşmaktadır. Her bir kavernöz arter kavernozaal tunika tabakasını geçerek penil kururaya girer ve korpus kavernozaumda birçok dal vererek erektil kan akımının düzenlenmesine katkıda bulunur. Dorsal arter ise ereksiyon sırasında glans penisin kanlanmasıdan sorumludur (23). Korporal dokulardan çıkan kavernöz venler ise birleşerek emisser veni oluşturarak tunika tabakasını aşır penisin proksimal kısmında kavernöz vene direne olup internal pudental vene boşalır (29).

### **2.1.3. Penisin İnervasyonu**

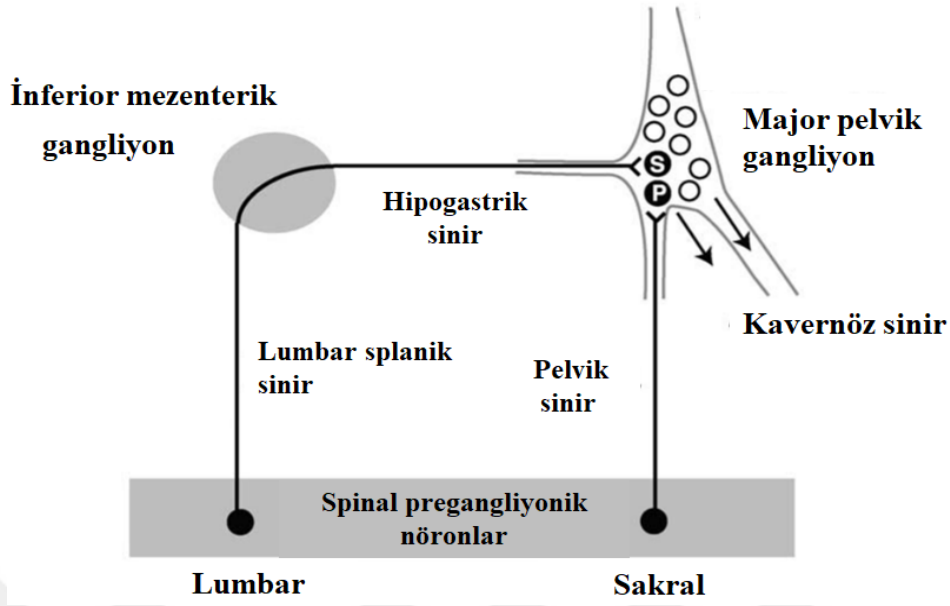
Penis karmaşık nörovasküler olayların eşlik ettiği; parasempatik, sempatik ve somatik efferentlerden inervasyon alan bir dokudur. Penis dokusunun periferik inervasyonu vasküler olaylara aracılık eden nöronal ve lokal faktörlerin kontrolünde gerçekleşmektedir (30, 31). İnsanlarda spinal kordun sakral (S2-S4) kısmından çıkan lifler pelvik sinir aracılığıyla pelvik pleksusa ulaşır. Pelvik pleksusta sinaps yaptıktan sonra postgangliyonik parasempatik lifler KS'yi oluşturur (32). Pelvik pleksustan orjin alan ve sempatik-parasempatik lifler içeren KS prostat kapsülünde prostatın dorsolateralinden ilerler. KS'ler daha sonra iki ayrı sinir lifi grubuna ayrılarak pelvisten çıkarlar. Bunlardan biri üretral sfinktere ilerleyerek üriner fonksiyonlardan sorumlu olur; diğeri ise dorsal sinirle de bağlantılar kurarak penise ilerleyip erektil fonksiyona katkıda bulunur (33). Temel olarak tümesans ve detümesanstan oluşan erektil yanıtta KS'ler sorumludur (Resim 3) (34).





**Resim 3.** Penisin inervasyonu (Auffenber'den, 23)

Sıçan ve farelerde ise ürogenital organların uyarılmasından sempatik ve parasempatik postgangliyonik inervasyona aracılık eden prostat bezinin dorsolateralinde yerleşim gösteren majör pelvik gangliyon (MPG) sorumludur. MPG hipogastrik sinir aracılığıyla sempatik uyarı da alan parasempatik bir gangliyon olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1) (35, 36). Otonomik sempatik ve parasempatik nöronlardan oluşan ve rodentlerde bilateral yerleşim gösteren MPG alt üriner sistem, barsaklar ve ürogenital organların inervasyonuna aracılık etmektedir (37). Pelvik organlara ait patofizyolojik olayların mekanizmalarının incelenmesinde rodentlerin tercih edilmesinin nedenini de tüm bu organların inervasyonundan tek bir yapının, MPG'nin, sorumlu olmasıdır (38).



**Şekil 1.** Sıçan MPG inervasyonu. S: sempatik; P: parasempatik (Keast'ten, 36)

Eretil fonksiyon periferik mekanizmaların haricinde santral mekanizmalarla da kontrol edilmektedir. Sorumlu temel serebral yapılar medial preoptik alan (MPOA) ve hipotalamustaki paraventriküler nükleustur (PVN). Santral kontrolünden sorumlu ana nörotransmitter ise dopamindir. Dopamin, MPOA ve PVN'deki oksitosinerjik nöronları uyararak ereksiyona neden olmaktadır (31).

Eretil fonksiyondan sorumlu korpus kavernozumunu oluşturan düz kas ve vasküler endotelin fonksiyonu adrenerjik, kolinerjik ve nonadrenerjik-nonkolinerjik (NANK) nöronların kontrolünde düzenlenmektedir. Ereksiyon temel olarak vazokonstriksiyona neden olan sempatik tonusla inhibe olurken dopaminle aktive olan oksitosinerjik nöronlar aracılığıyla uyarılan parasempatik tonusla indüklenmektedir. Bu stimülasyondan da temel olarak asetilkolin (ACh) ve nitrik oksit (NO) sorumlu olduğu bilinmektedir (31).

Penil düz kasında sempatik sistem aktivasyonu ile salınan noradrenalin (NA) adrenerjik reseptörlere bağlanarak korpus kavernozumun kontraksiyonuna neden olur. Yapılan çalışmalar penil dokuda  $\alpha$  adrenerjik reseptörlerin  $\beta$  reseptörlere göre 10 kat daha fazla bulunduğunu ve kontraktil etkiden özellikle  $\alpha_1$  alt tipinin sorumlu olduğunu göstermiştir (39). NA yanı sıra endotelin, nöropeptid Y, prostanoidler ( $PGF_{2\alpha}$ ) ve tromboksan A<sub>2</sub>'nin de vasküler endotelden ve nöronlardan salınarak detümesansa aracılık ettiği gösterilmiştir (40).

Arka hipofizden salgılanarak kan dolaşımına salıverilen oksitosinin de penil ereksiyonun oluşmasına aracılık eden bir hormon olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar insanlarda seksüel stimülasyon sonucu plazma oksitosin düzeyinin arttığını göstermiştir. Oksitosinle indüklenen penil ereksiyona ise  $Ca^{++}$  aracılık etmektedir (41).

Penil düz kas gevşemesi ve ereksiyonun gerçekleşmesinden majör sorumlu nörotransmitter NO'dur. NO harici ACh de bu etkiye aracılık ettiği bilinmektedir. ACh'nin de korpus kavernozum vasküler endotelinden NO salıverdirterek vazodilatör etki oluşturduğu saptanmıştır (40). NO parasempatik sinir uçlarından ve düz kas endotelinden L-argininden NO sentaz (NOS) aracılığıyla sentezlenir. NOS'un nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenbilir (iNOS) olmak üzere üç farklı izoformu bulunmaktadır ve üç izoform da penil dokuda ekspres olmaktadır. Ancak temel olarak penil NO üretiminden nNOS ve eNOS'un sorumlu olduğu bilinmektedir (42). nNOS kaynaklı NO'nun ereksiyonun başlamasından eNOS kaynaklı NO'nun ise ereksiyon sırasındaki penil rijiditenin sürdürülmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (40). NO ve ACh dışında parasempatik sinir uçlarından ve endotelden salınan vazoaaktif intestinal polipeptid (VIP), kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) ve prostaglandin E'ler ( $PGE_1$ ,  $PGE_2$ ) de korpus kavernozum gevşemesine neden olmaktadır (43).

#### **2.1.4. Fizyolojisi**

Ereksiyonun hemodinamik düzenlenmesi sırasında seksüel stimülasyon sonucu KS terminallerinden salınan nörotransmitterler korporal düz kasta gevşemeye sebep olarak tümensans olaylar kaskadını başlatır. İlk olarak arter ve arteriyollerin dilatasyonu ile kan akımı artar, bunun sonucu kanla dolarak genişleyen sinüzoidler sebebiyle subtunikal venüllere bası oluşur ve kan akımı kesilir. Tunika albuginea ve periferik sinüzoidler arasında kalan subtunikal venüler pleksusun sıkışmasıyla venöz drenaj azalır. Tunika gerilme kapasitesine ulaştığında ereksiyon fazı gerçekleşir ve intrakavernöz basınç (İKB) maksimuma ulaşır (6). Seksüel aktivite boyunca penis rijiditesini sürdürür. Seksüel stimülasyon sona erdiğinde antieretil nöronal sinyaller aracılığıyla penil arterlerin kontraksiyonunu takiben düz kas kontraksiyonu gerçekleşir ve arteriyel kan akımı azalır. Arteriyel kan akımının azalmasından sonra venüller üzerindeki bası kalkar ve venöz drenajın artmasıyla penis rijit tonusunu kaybederek detümesans fazına geçer (44).

Eretil fonksiyonun moleküler mekanizmaları incelendiğinde sempatik sistemin aktivasyonu sonucu salınan nörotransmitterler G-protein kenetli reseptörlerine bağlanarak

inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>) ve diaçilgliserol (DAG) ikincil ulaklarının aracılığıyla iyon kanallarının açılmasına veya intraselüler depolardan Ca<sup>++</sup> salıverilmesi sonucu intraselüler Ca<sup>++</sup>'un artmasına neden olur. Artan Ca<sup>++</sup> kalmoduline bağlanarak miyozin hafif zincir kinazı (MHZK) aktive eder. MHZK aktivasyonu sonucu fosforillenen miyozin hafif zincirleri düz kas kasılmasına neden olur (6, 34). Penil düz kas kasılmasına Ca<sup>++</sup> yanı sıra RhoA/Rho kinaz yolağının aktivasyonu da aracılık etmektedir. Çeşitli faktörler sonucu G-protein kenetli reseptörlerin uyarılmasıyla RhoA aktive olur. Aktive olan RhoA'nın Rho kinazı aktivasyonu sonucu düz kasta miyozin fosfataz inhibe olur. Bu inhibisyon düz kas miyofilamentlerinin defosforile olmasını engelleyerek kontraktıl tonusun sürdürülmesine aracılık eder (45, 46). Literatürde tavşan korpus kavernozum dokusunda RhoA ekspresyonunun diğer vasküler düz kas dokularına kıyasla 17 kat daha fazla olduğu ifade edilerek ereksiyon fizyolojisindeki önemi gösterilmiştir (23).

Eretil cevabın düzenlenmesinde intraselüler Ca<sup>++</sup> düzeyindeki azalma korporal düz kasın gevşemesine neden olur. Bu etkiden NANK nöron terminallerinden ve endotel tabakasından salınan NO'nun çözünebilir guanilat siklazı (sGC) aktive etmesi sorumludur. Aktive olan sGC ikincil ulak siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretimine neden olarak protein kinaz G (PKG)'yi aktive eder. Aktifleşen PKG çeşitli intraselüler proteinleri fosforile ederek Ca<sup>++</sup> influksunu inhibe ederken K<sup>+</sup> kanallarının açılmasına ve hiperpolarizasyona neden olur. Sonuçta MHZK inaktive olarak düz kas gevşemesi gerçekleşir (47). cGMP gibi bir ikincil ulak olan siklik adenozin monofosfat (cAMP) da birtakım protein kinaz ve iyon kanallarını aktive ederek hiperpolarizasyona ve Ca<sup>++</sup> kanallarının inhibisyonuna neden olarak düz kas gevşemesine aracılık eder (41).

Düz kas kontraksiyonu ve gevşemesi arasındaki dengenin sağlanmasında cGMP ve cAMP'yi hidroliz ederek dengenin kontraksiyona kaymasını sağlayan fosfodiesteraz enzim (PDE) ailesi önemli role sahiptir (23). PDE ailesinin 11 farklı alt tipi bulunmaktadır. PDE 6 haricindeki bütün alt tiplerin korpus kavernozumda eksprese edildiği bilinmektedir. PDE 5 alt tipi temel olarak cGMP'nin hidrolizinden sorumluyken PDE 2, 3 ve 4 cAMP'nin etkilerinin sonlanmasından sorumludur (48).

## **2.2. ED**

### **2.2.1. Tanımı ve Epidemiyolojisi**

ED bireyleri ve partnerlerini psikososyal açıdan etkileyen ve klinik komorbiditelerle ilişkilendirilen yüksek prevalansa sahip önemli bir halk sağlığı

problemidir. Ulusal Sağlık Enstitüsü ED'yi; erkek bireyde seksüel stimülasyon sonucu yeterli ereksiyonun sağlanamaması ve sürdürülememesi olarak tanımlamaktadır (49). ABD'de yapılan araştırmalara göre 40-70 yaş aralığında bulunan yaklaşık 18 milyon bireyin ED ile karşı karşıya olduğunu ve her yıl bu sayıya %0.26'lık bir insidansla yeni vakaların eklendiğini göstermekte olup 2025 yılında dünya çapında ED'den etkilenen birey sayısının 322 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir (41). Ülkemizde Akkuş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre ise 40 yaş üstü bireylerde ED görülme prevalansının %69.2 olduğu saptanmıştır (50).

## 2.2.2. Risk Faktörleri

Birçok epidemiyolojik çalışmada ED ilişkili komorbiditeler de incelenmiş ve kardiyovasküler hastalıklar, pelvik travmalar, nörolojik hastalık/hasarlar ve yaşlanmanın en sık gözlenen risk faktörleri olduğu saptanmıştır. Özellikle diyabet, hipertansiyon, ateroskleroz, hiperlipidemi ve birtakım vasküler hastalıklar gibi kronik hastalıklar ED gelişimini tetiklemektedir (51). Bu kronik hastalıklar vasküler yapıya zarar vererek aterosklerotik plak oluşumuna ve vasküler endotel tabakası bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Sonuç olarak ereksiyon sırasındaki kan akımı, NOS aktivitesinin azalması sonucu endotel tabakadan sentezlenen NO miktarı azalırken kontraktile etkili tromboksan ve prostaglandinlerin miktarı artarak korporal düz kasın gevşemesi engellenmiş olur. Böylelikle sağlıklı ereksiyon sağlanamaz. Yapılan çalışmalar kronik hastalıkların neden olduğu vasküler remodelling sonucu hipoksiyle indüklenen fibrotik süreçlerin aktive olduğunu ve penil vasküler yapının bozularak ED gelişimine yol açtığını göstermiştir (52).

Kardiyovasküler hastalıkların neden olduğu RhoA/Rho kinaz yolağının aşırı aktivasyonu ED'nin bir diğer mekanizması olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar hipertansif sıçanların korporal düz kaslarında RhoA/Rho kinaz ekspresyonunun arttığını göstermiştir (53, 54). Ayrıca hipertansiyon ve hiperlipidemisi olan hastalarda endotelin-1 seviyelerinin de arttığı saptanmıştır (53, 55, 56).

Diyabet; vasküler ve korpus kavernozum düz kasını, nöropatiyi tetiklediği için KS'leri etkileyen ve neden olduğu endotel disfonksiyonu sonucu ED gelişimine sıklıkla neden olan kronik bir hastalıktır (34, 57). Massachusetts Erkek Yaşlanma Çalışması, diyabeti olan erkeklerin %75'inin yaşam boyu ED gelişme riski olduğunu bildirmiştir (53). Diyabetik periferik nöropatinin kolinerjik ve NANK sinir liflerini etkilediği bilinmektedir.

Bu nedenle nNOS ve eNOS aktivitesini inhibe ederek NO düzeyini azaltmakta ve ED gelişimine neden olmaktadır (34, 57, 58).

Kronik vasküler hastalıklar dışında alt üriner sistem komplikasyonları, mesane obstrüksiyonu ve benign prostat hiperplazisi (BPH) gibi patolojilerin de ED ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (51). Yapılan çalışmalar özellikle ilerleyen yaş ve metabolik sendromla beraber alt üriner sistem semptomları ve ED gözlenmesi arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir (59, 60). Özellikle BPH'si olan orta ve ağır derecede alt üriner sistem semptomları gözlenen bireylerde %50'yi aşkın oranda ED geliştiği gözlenmiştir (60).

Patolojik durumlara ek olarak ED için bir diğer risk faktörü de ilaçlardır. Özellikle diüretikler ve  $\beta$ -blokörler başta olmak üzere birtakım antihipertansif ilaç grupları, hormon preparatları, proteaz inhibitörleri, sitotoksik ajanlar, H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri ED ile ilişkilendirilmektedir (61–67). Seksüel aktivitenin santral kontrolünden sorumlu serotonerjik, noradrenerjik ve dopaminerjik yolları etkileyen antipsikotikler ve antidepresanların da ED gelişimine sıklıkla neden olduğu bilinmektedir (63). Tüm bu faktörlere ek olarak bireylerin hareketsiz bir yaşam tarzı sürmeleri, obezite, alkol ve tütün ürünleri kullanımı da ED'yi tetiklemektedir (68).

Kardiyovasküler hastalıklar ve ED artan yaş, sigara kullanımı, obezite ve diyabet gibi ortak risk faktörleri barındırmaları sebebiyle aralarında ilişki olduğu düşünülen ve araştırılan patolojiler olarak karşımıza çıkmaktadır. Her iki durumda da altta endotelial disfonksiyon, inflamasyon ve düşük testosteron düzeyleri gibi mekanizmaların yattığı bilinmektedir (69). Ancak birtakım çalışmalar tüm ortak risk faktörleri ve mekanizmalara rağmen ED'nin kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olduğunu tanımlamıştır (70–75). Farklı çalışmalar kardiyovasküler semptomların ortaya çıkmasından 2-5 yıl önce ED semptomlarının görüldüğünü ifade etmektedir (76–79). ED'si olan 40 yaş altı bireylerde aterosklerotik kardiyovasküler hastalık görülme riskinin normal bireylere oranla 7 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Günümüzde ED gelişiminin kardiyovasküler hastalıkların erken dönem bulgusu olarak değerlendirilmesi gerektiği ifade edilmektedir (80).

### **2.2.3. Sınıflandırılması**

1960'lı yıllarda ED'nin yalnızca psikojenik temelli olduğu düşünülürken 20. yy'ın sonlarına doğru ereksiyonun çeşitli mekanizmalarının aydınlatılmasıyla ED'nin psikojenik

temelli olmasının dışında vasküler, endokrin, hücrenel ve nöronal birçok nedenin olabileceği anlaşılmıştır. ED'nin sınıflandırılmasında birçok farklı sınıflandırma bulunmasına karşın Uluslararası İmpotans Araştırma Topluluğu ED'yi temel olarak organik ve psikojenik ED olmak üzere iki ana sınıfa ayırmaktadır (Tablo 1) (81).

**Tablo 1.** ED'nin sınıflandırılması

---

<b>1. Organik</b>
<b>a. Vaskülojenik</b>
<b>I. Arteriyel</b>
<b>II. Kavernoza</b>
<b>III. Arteriyel+Kavernoza</b>
<b>b. Nörojenik</b>
<b>c. Anatomik</b>
<b>d. Endokrinolojik</b>
<b>2. Psikojenik</b>
<b>a. Genel</b>
<b>b. Durumsal</b>

---

Organik ED, travmanın neden olduğu durumlar haricinde hafif başlayıp ilerleyici nitelikte seyreden seksüel fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanmaktadır (51). Organik ED'yi kendi içinde vaskülojenik, nörojenik, anatomik ve endokrinolojik olarak alt gruplara ayırmak mümkündür. Vaskülojenik ED'de penil ereksiyonun sağlanmasından sorumlu hipogastrik-kavernöz-helisin arter dallarındaki herhangi bir tıkanma veya veno-oklüzif disfonksiyon gelişimi kan akışını bozar ve sinuzoidlere yeterli kan dolamadığından penil rijidite sağlanamaz. Anatomik ve endokrinolojik ED insidansları daha düşük olan alt tipler olup bireysel anatomik farklılıklardan ve hipogonadizmin eşlik ettiği durumlardan kaynaklanmaktadır. Seksüel fonksiyondan sorumlu testosteron seviyesindeki azalmalar libido kaybına ve ED'ye neden olmaktadır (6). ED vakalarının %10-19'unun nörojenik kaynaklı olduğu bilinmektedir. Ereksiyonun nörovasküler bir olay olması ve beyin, spinal kord, kavernoza-pudental sinirleri etkileyecek herhangi bir travma veya disfonksiyonun ED'yi indüklemesi bu insidansı arttırmaktadır. Alzheimer, Parkinson, inme ve epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıklar da ED ile yakından ilişkilidir. Dopaminerjik nöron kaybıyla

karakterize Parkinsonda ereksiyonun santral regülasyonundan sorumlu MPOA'da bulunan dopaminerjik nöronların kaybı ED gelişimini tetiklemektedir (22). Epileptik nöbetlerin de prolaktin seviyesini artırıp, testosteron seviyesini azaltarak ED'ye yol açtığı gözlenmiştir (82).

ED'nin nedenleri incelendiğinde erkek bireyler arasında en sık gözlenen kanser tiplerinden biri olan prostat kanserinin ED ile yakından ilişkili olduğu görülmektedir. Yalnızca prostat kanserinin gelişimi ED'ye neden olmasının yanında pelvik organların KS'lerle yakın komşulukta olmaları nedeniyle prostat kanseri tedavisinde tercih edilen radikal prostatektominin ve hormonal terapilerin de ED insidansını arttırdığı bilinmektedir (6, 83). 20.yy ortalarına kadar pelvik operasyon geçiren erkek bireylerde seksüel disfonksiyon oranı %90'lara yaklaşırken Dr. Walsh and Donker tarafından geliştirilen KS'lerin korunduğu operasyon tekniklerine rağmen günümüzde hala radikal prostatektomi operasyonu geçiren bireylerde %14-90 arasında ED geliştiği bilinmektedir (4, 34). Radikal prostatektomi sonucu gelişen ED'nin fizyopatolojisi incelendiğinde intraoperatif sinir hasarının yanında gelişen termal, iskemik hasarın ve lokal inflamatuvar proseslerin etkili olduğu görülmektedir. Bu nedenle özellikle prostat kanseri saptanan hastalarda erektil fonksiyonun korunması hastaların yaşam kalitesinin sürdürülmesi açısından oldukça önemlidir (83).

Psikojenik ED ise ani başlayan seksüel fonksiyon kaybı olarak tanımlanmaktadır. Psikojenik ED'ye temel olarak ereksiyonun santral merkezlerden inhibisyonunun veya korporal düz kas kontraksiyonuna aracılık eden aşırı katekolamin miktarının neden olduğu düşünülmektedir (84). Psikojenik ED performans anksiyetesi olarak da tanımlanmakta olup bu bireylerde genellikle nokturnal ereksiyonlar gözlenmektedir (81).

#### **2.2.4. Tedavisi**

ED tedavisi için etkin ve güvenilir yeni terapötik ajanların arayışı tüm hızıyla devam etmektedir. Günümüzde farklı nedenlerle gelişen ED'nin tedavisinde oral olarak PDE 5 inhibitörleri kullanılmaktadır. Sildenafil FDA tarafından 1998 yılında ED tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmış ilk PDE 5 inhibitörü ajan olup onu takiben benzer terapötik etkinliğe sahip tadalafil, vardenafil ve avanafil onay almıştır. Tüm PDE 5 inhibitörü ajanlar cGMP'nin yıkımını engelleyerek korpus kavernozumda gevşeme yaratarak etkinlik göstermektedir. PDE 5 inhibitörleri erektil cevabı arttırmakta ancak cevabın oluşumunu başlatmamaktadır. Klinikte sıklıkla tercih edilen PDE 5 inhibitörlerinin



etkinlik gösterebilmesi için sinir uçlarından veya vasküler endotelyumdan NO salınmalıdır. Bu nedenle PDE 5 inhibitörlerinin parasempatik sinir uçlarını etkileyecek herhangi bir travma, diyabetik nöropati veya pelvik operasyonlar sırasında oluşan KS hasarıyla indüklenen ED’de etkinlikleri düşüktür (41).

PDE 5 inhibitörleri dışında birincil basamak tedavi yöntemlerinden biri de androjen replasman tedavisidir. Androjen replasman tedavisi seksüel fonksiyonu iyileştirmenin yanı sıra androjen seviyesindeki düşüklükten kaynaklı letarji, depresyon ve osteoporozu da düzeltmektedir. Ancak prostat hastalıkları riskini arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle ED tedavisinde kullanılacaksa yarar/zarar ilişkisi göz önünde bulundurulmalıdır (51).

Uzun yıllardır afrodisyak etkinliği olduğu belirtilen presinaptik  $\alpha 2$  reseptör antagonisti yohimbin de ED tedavisinde oral yolla kullanılan bir ajandır. Yohimbin santral yoldan NA salıverilmesini artırarak seksüel isteği arttırırken periferik olarak NA salıverilmesini inhibe ederek korpus kavernozumun kasılmasını inhibe eder (85, 86). Yapılan çalışmalar yohimbinin özellikle psikojenik ED tedavisinde oldukça etkin organik ED tedavisinde etkinliğinin kısıtlı olduğunu göstermektedir (87).

Fentolamin,  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  reseptör antagonisti, NA’nın  $\alpha$  reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek korpus kavernozum kasılmasını inhibe eder. Yapılan çalışmalar orta ve ağır ED tedavisinde oral fentolaminin güvenli, iyi tolere edilebilen bir ajan olduğunu göstermektedir (88, 89).

Melanokortin reseptör agonistlerinin ED’deki terapötik etkinlikleri araştırılırken, intravenöz melanotanın ereksiyonu indüklediği ancak hastalarda bulantı, esneme benzeri yan etkiler görülmesi üzerine melanotanın aktif metaboliti olan intranazal formu PT-141 geliştirilmiştir. PT-141’in etkisi melanotana kıyasla daha kısa sürede başlamakta olup daha güvenli bir yan etki profiline sahiptir (90, 91).

Parkinson tedavisinde kullanılan dopamin reseptör agonisti apomorfinin oral biyoyararlanımı düşük olmasına rağmen ağız mukozasından emildiğinde erektojenik etkileri olduğu görülmüştür. Bu nedenle yapılan klinik çalışmalar sonucu birçok ülkede sublingual formu ED tedavisinde kullanımı onaylanmıştı. Ancak PDE 5 inhibitörlerinin daha potent ajanlar olması dolayısıyla Avrupa ve Amerika’da piyasadan çekilmiştir (86, 92).

ED tedavisinde PDE 5 inhibitörlerine yanıt vermeyen veya kullanımlarının kontrendike olduğu durumlarda kullanımı basit, güvenli, etkin ve noninvazif bir yöntem olan topikal terapiler denenmeye başlanmıştır. ED’de topikal terapinin ilk öncüsü PGE<sub>1</sub> analogu alprostadildir. Yapılan araştırmalarda topikal alprostadilin ereksiyonu uyardığı, özellikle PDE 5 inhibitörlerinin yanında adjuvan bir ajan olarak kullanılabileceği saptanmış ve Kanada’da kullanımı onaylanmıştır (41). Alprostadil topikal kullanım haricinde intrakavernöz enjeksiyon veya üretraya yerleştirme gibi çeşitli yöntemlerle de kullanılmaktadır (51).

ED fizyopatolojisi incelendiğinden sGC aktivatörleri ve RhoA/Rho kinaz inhibitörlerinin ED tedavisinde etkin ajanlar olabileceği öngörülmüştür. Bu kapsamda NO yolağında önemli rolü olan GC aktivatörü BAY 60-4552 ilgili yapılan deneysel çalışmalarda özellikle radikal prostatektomi sonucu gelişen ED ve diyabetik ED’de umut verici sonuçlar elde edilmiş ve çalışma faz aşamalarına taşınmıştır. Ancak bilinmeyen nedenlerle çalışma Faz II aşamasında durdurulmuştur (93, 94). Benzer şekilde deneysel çalışmalarda etkinliği ispatlanmış RhoA/Rho kinaz inhibitörü SAR407899 ile ilgili araştırmalar da Faz II aşamasında durdurulmuştur (95).

ED tedavisinde non-farmakolojik yaklaşımlar da uzun süredir denenilen tedavi seçenekleridir. Bu kapsamda mekanik olarak kan akımının penise doğru artmasını sağlayan ve sistemik yan etkileri bulunmayan vakum cihazları kullanılmaktadır. Oral ve enjektabl tedavi seçeneklerinin başarısız olduğu durumlarda ise penil protez operasyonları denenmektedir. Ancak oldukça pahalı bir alternatif olması kullanımını kısıtlamaktadır (51).

Son yıllarda klinik ve prelinik olarak çeşitli büyüme faktörleri, nöroinflamatuvar ajanlar, peptidler, antifibrotik ajanlar ve gen terapilerinin ED tedavisindeki etkinlikleri araştırılmaktadır (96–101).

## **2.3. Periferik Nöropati**

### **2.3.1. Tanımı**

Periferik nöropati toplumlarda oldukça sık gözlenen, birçok farklı nedenle ortaya çıkabilen ve periferik sinir sistemini hedef alan nörolojik komplikasyonlara verilen genel bir isimdir (102, 103). En sık görülen periferik nöropati nedenleri; travmalar (spinal kord hasarı, cerrahiye bağlı hasarlar), genetik etkenler, diyabet, alkolizm, vitamin eksiklikleri (tiyamin, B<sub>12</sub> vitamini), enfeksiyonlar (HIV vb.), çeşitli kanser türleri (lenfoma, multiple

myelom vb.), otoimmün hastalıklar (sistemik lupus eritemozus, romatoid artrit vb.), ilaçlar (sitotoksik ajanlar, statinler vb.) ve toksinler olarak karşımıza çıkmaktadır (104, 105). Yapılan çalışmalar periferik nöropati prevalansının yaklaşık %2-3 civarında olduğunu ve bu prevalansın artan yaşla %8'lere yükseldiğini göstermektedir (102). Periferik nöropatinin klinik belirtileri bireysel farklılıklar göstermekte olup, hastalar genel olarak duyuşal değişiklikler, ağrı, güçsüzlük ve otonomik bir takım semptomlardan şikayet etmektedirler. Bu nedenle periferik nöropatili bir hastaya tanı koymak oldukça güçtür (106).

### **2.3.2. Patofizyolojisi**

Periferik nöropati patogenezinde metabolik yollardaki değişiklikler, kovalent modifikasyonlar, organel fonksiyonlardaki farklılaşmalar, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, değişmiş hücre içi inflamatuvar sinyalizasyon, aksonal taşımada bozulmalar ve iyon kanalları aktivitesindeki değişikliklerin sorumlu olduğu düşünölmektedir. Ancak tüm mekanizmalar tamamen aydınlatılamamıştır. Aydınlatılan mekanizmaların tümü, aksonal fonksiyon bozukluğuna ve nöropatik semptomlara yol açmaktadır (107). Periferik nöropati patogenezinde nöron dejenerasyonunun yanı sıra aksonal taşımada oldukça önemli rollere sahip nöron destek hücrelerinin de hasarı söz konusudur. Özellikle travmatik nöropatilerde sinir liflerini saran Schwann ve miyelin hücreleri hasarı ön plandadır (108).

### **2.3.3. Travmatik Nöropatiler**

Travmatik nöropatiler 1942 yılında Seddon tarafından aksonal hasar derecesi esas alınarak nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olarak üç ana grupta sınıflandırılmıştır (109). Nöropraksi, en hafif sinir hasarı olup aksonal hasarın belirginleşmediği fokal demiyelinizasyonla karakterizedir. Nöroprakside çeşitli nedenlerle sinirin sıkıştırılması sonucu aksonal iletim hızında azalma görülür. Aksonotmezis ise fokal demiyelinizasyonu takiben direkt akson hasarı ile karakterize olup akson bütünlüğü henüz bozulmamıştır. En ağır sinir hasarı olan nörotmezis de ise akson ve çevre dokuların bütünlüğü bozulmuştur (110). Yapılan bu sınıflama 1951 yılında Sunderland tarafından aksonotmezis ve nörotmezisin kendi içinde derecelendirilmesiyle güncellenmiştir (111).

Travmatik nöropatilerin önemli kısmını oluşturan sıkıştırma hasarı genellikle sinir lifinin bütünlüğünün bozulmadan klemp gibi küt bir alet ile sıkıştırılması ile oluşan yaralanmalardır. Travmaya bağlı uç organ hasarı gelişen durumlarda sinirin yeniden uyarılabilirliği iki şekilde sağlanmaktadır. Birincisi intakt aksondan çıkan kollateral dallanmalar sayesinde, ikincisi ise hasarlanan aksonun yenilenmesi şeklindedir (110, 112).

Aksonal hasarın %20-30 civarı olduğu durumlarda ilk olarak kollateral dallanma mekanizması aktifleşir. Bu süreç hasarı takiben ilk dört gün içinde başlayıp ve altı aya kadar devam etmektedir. Hedef organı uyarabilmek için birçok aksonal dallanma oluşmaktadır. İyileşmenin sağlanmasının ardından nörotrofik sinyaller alamayan fazlalık aksonal dallar dejenere olmaktadır (110, 113). Ağır aksonal hasarın hakim olduğu durumlarda ise rejenerasyon wallerian dejenerasyonu, aksonal rejenerasyon ve uç organ reinervasyonu olmak üzere üç ana süreçten oluşmaktadır (110). Wallerian dejenerasyonu, hasarlanan sinir lifinin tekrar uyarılabilir hale gelebilmesi için hasarın başlangıcından itibaren ilk hafta içinde başlayan ve hasarlanan alanın distalinden lezyon bölgesine doğru gelişen moleküler ve hücresel değişiklikleri ifade etmektedir (114).

Periferik sinir lifleri genel olarak akson, aksonları saran schwann hücreleri ve miyelin kılıf, vasküler tabakayla sinir liflerinin arasında yerleşen fibroblast destek hücrelerinden oluşmaktadır. Sinir lifi travma yoluyla ani şekilde hasarlandığında lezyon bölgesinin distalinde wallerian dejenerasyonu başlar ve akson ile miyelin kılıf parçalanır. Ardından makrofajlar ve schwann hücreleri parçalanmış akson ve miyelin kılıf kalıntılarını temizler (114). Sinir hasarını takiben hasar bölgesinin distalinde yeni aksonun oluşması için özellikle  $Ca^{++}$  and  $Na^{+}$  iyon düzeylerinde meydana gelen değişikliklerle hasarlı bölge apoptoza sürüklenmektedir. Hasarın proksimal kısmında ise apoptoz ilk ranvier boğuma kadar gerçekleşmektedir. Eğer hasar nöron gövdesine çok yakın bir yerde meydana gelmişse tüm nöron apoptoza gitmektedir (115, 116).

Ağır hasarın eşlik ettiği durumlarda wallerian dejenerasyonu tamamlandıktan sonra nöron rejenerasyon fazına geçer ve büyüme ilişkili protein-43 (*growth-associated protein, GAP-43*), tübülün ve aktin gibi büyüme ilişkili proteinler upregüle olurken, akson çapının korunmasına aracılık eden nörofilamentler ise downregüle olmaktadır (117, 118).

Hasarlı aksonun temizlenmesinin ardından aksonal rejenerasyon başlamaktadır. Rejenerasyon fazına geçen nöron büyüme konisi oluşturur. Hasardan saatler sonra büyüme konisi filapodia adı verilen uzantılar verir ve hücre gövdesinde aktin miyozin üretimi artar (119, 120). Eğer hasarı takiben bir skar dokusu oluşmuşsa büyüme konisi proteazlar salgılayarak skar dokusunu eritir ve istenmeyen hücreler arası etkileşimleri de ortadan kaldırır (110, 121). Bu aşamada aksonal rejenerasyon için gerekli nörotrofik faktörlerin ana kaynaklarında schwann hücreleri önemli roller üstlenmektedir (110). Nörotrofik faktörler akson gelişmesi, sinaps oluşumu ve nöronal canlılıkta önemli rolleri olan peptidlerdir.

Etkilerini sinir uçlarında yer alan kendine özgü reseptörlerine bağlanarak gösterirler. wallerian dejenerasyonunu başlamasıyla özellikle sinir büyüme faktörü (*nerve growth factor*, NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) ve Nörotrofin-4 (NT-4)'ün üretiminin arttığı bilinmektedir (114, 122–124). NGF sağlıklı nöronlarda az miktarda eksprese olurken Schwann hücresi harabiyetini takiben upregüle olmakta ve schwann hücrelerinin büyümesini, proliferasyonunu arttırmaktadır (125).

Büyüme konisi endonöral tüpe ulaştığında remiyelinizasyon ve aksonal genişleme başlar, sonuçta foksiyonel olarak yeniden uyarılabilirlik gerçekleşir ve rejenerasyon fazı tamamlanmış olur (126).

#### **2.3.4. Periferik Nöropati ve PKC Yolağı İlişkisi**

PKC yaklaşık kırk yıl önce yapısı aydınlatılmış, birçok farklı proteini serin (ser)/treonin(Thr) rezidülerinden fosforile eden kinaz enzim ailesinin bir üyesidir. Diğer kinazlara benzer şekilde N-terminalinde regülatör ve C-terminalinde kinaz domainlerden oluşur. Yapısında ATP ve substrat bağlanma bölgeleri içermektedir (127). PKC genel olarak konvansiyonel/klasik PKC alt tipleri (PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\gamma$ ), yeni PKC alt tipleri (PKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ) ve atipik PKC alt tipleri (PKC  $\zeta$ ,  $\lambda$ /i) olmak üzere 3 ana grup altında sınıflandırılmaktadır (128). PKC; düz kas hücreleri, kalp, karaciğer, beyin, dalak, testis, akciğer ve nöronlar başta olmak üzere birçok farklı doku/hücrede eksprese olmakta ve farklı alt tipleri aynı dokuda birlikte bulunabilmektedir (129). PKC adrenalın, anjiyotensin, çeşitli hormonlar, büyüme faktörleri, dopamin ve endorfin gibi nörotransmitterlerin kendine özgü reseptörlerine bağlanarak membran fosfolipaz C'yi (PLC) uyararak DAG ikincil ulağı aracılığıyla sitozolden membrana transloke olarak aktive olmaktadır. Yeni PKC alt tipleri aktive olmak için yalnızca DAG'a ihtiyaç duyarken konvansiyonel izozimler DAG'ın yanı sıra  $Ca^{++}$  varlığına da ihtiyaç duymaktadırlar. PKC aktivasyonu bir agonist aracılığıyla olabileceği gibi fizyolojik ve patofiyolojik koşullarda oluşan hücre içi  $Ca^{++}$  düzeyindeki artış ve çeşitli post-translasyonel modifikasyonların varlığıyla da olabilmektedir. Çeşitli hücre tiplerinde dağılım gösteren PKC izozimlerinin fizyolojik ve patolojik durumlarda uyarılara bağlı olarak farklı etkilere neden olabildiği bildirilmiştir (127). Düz kastaki etkileri incelendiğinde çeşitli uyarılarla aktive olan PLC, DAG ve  $IP_3$  oluşumuna neden olmakta, DAG ise PKC'yi aktive etmektedir. Aktive olan PKC potent miyozin fosfataz inhibitörü olan CPI-17'yi fosforile ederek kontraktilitenin sürdürülmesine aracılık eder (130). Aktive olan PKC'nin ayrıca Raf/Mitojenle aktive olan protein kinaz

(*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) kinaz (MEK)/MAPK yolağını aktive ederek aktin-bağlayıcı protein kaldesmonu fosforile ettiği ve direkt olarak başka bir aktin-bağlayıcı protein olan calponini de fosforile ederek kontraksiyonu arttırdığı da bilinmektedir (128).

PKC'nin fizyolojik koşullarda nöronal fonksiyonları incelendiğinde beyinde oldukça yaygın olarak bulunduğu nöronal eksitabiliteye, nörotransmitter salımına ve nöronal plastisiteye katkıda bulunduğu bilinmektedir (131). Ayrıca periferik sinir rejenerasyonu incelendiğinde diğer protein kinaz aileleri arasında PKC'nin dikkat çektiği görülmektedir (132). Çeşitli PKC alt tiplerinin diyabet, kronik kalp hastalıkları, otoimmün hastalıklar, psöriazis, kanser ve özellikle Alzheimer, Parkinson gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda ve periferik nöropatilerde rol aldığı gösterilmiştir (127). Paklitaksel ile indüklenen periferik nöropatide özellikle PKC  $\beta$  II ve PKC  $\delta$  alt tiplerinin ekspresyonlarının değiştiği ve ağrı oluşumuna katkıda bulunduğu saptanmıştır (133). Borghini ve ark. yaptıkları çalışmada siyatik sinirde PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  II ve  $\delta$  alt tiplerinin schwann hücrelerinde;  $\epsilon$  ve  $\beta$  I alt tiplerinin de genel olarak nöronun aksonal kısmında bulduklarını rapor etmişlerdir (134). Araştırmalar non-selektif PKC inhibitörlerinin diyabetik koşullarda azalan kan akımını ve motor nöron iletim hızını iyileştirdiğini ve bu yaklaşımın periferik nöropatilerin önemli kısmını oluşturan diyabetik nöropatilerde umut verici olduğunu göstermektedir. Özellikle diyabetik nöropatilerde oluşan motor nöron iletim hızı ve kan akımındaki azalmanın PKC  $\beta$  alt tipi aktivasyonundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (135). Diğer çalışmalarda da hiperglisemik koşullarda özellikle PKC  $\beta$  II alt tipinin aktive olup vazokonstriksiyona neden olarak endonöral kan akımını azalttığı ve böylece nöronal disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle PKC  $\beta$  II alt tipinin inhibisyonuyla periferik nöropati gelişiminin önlenmesinin, nöroprotektif etkili ilaç araştırmalarında yeni bir strateji olabileceği düşünülmektedir (136).

### **2.3.5. Periferik Nöropati ve GT İlişkisi**

Glutamat, santral sinir sistemi ana eksitator nörotransmitteridir. Glutamerjik sistemin aşırı aktivasyonu sonucu sinaptik aşırımı artan glutamat, eksitotoksikite sonucu nöron hasarı ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle presinaptik uçtan salıverilen glutamat presinaptik uçta veya glialarda yerleşim gösteren transmembranal Na<sup>+</sup> bağımlı eksitator aminoasit taşıyıcıları (EAAT) aracılığıyla hücrelere geri alınır (137). EAAT'lerin beş farklı alt tipi bulunmaktadır. Bunlardan EAAT-1 (GLAST) ve EAAT-2 (GLT-1) genel

olarak glialarda bulunmakta ve EAAT-2'nin glutamat geri alımının yaklaşık %90'undan sorumlu ana GT olduğu bilinmektedir. EAAT-3, EAAT-4 ve EAAT-5 ise genel olarak nöronlarda yerleşim göstermekte; EAAT-4 daha çok serebellumda, EAAT-5 ise retinada bulunmaktadır (138). Glutamerjik nörotransmisyonun kontrolünde glutamatın glial metabolizması önemli yer tutmaktadır. Dolayısıyla özellikle glial yerleşim gösteren EAAT-1 ve EAAT-2 eksitotoksosite sonucu oluşan nöronal hasarın önlenmesinde oldukça önemlidir (137). Çeşitli patolojik durumlarda GT ekspresyon ve aktivitelerinde meydana gelen değişimler otoimmün ensefalomyelit, nöropatik ağrı, ALS, epilepsi, iskemi gibi durumların gelişmesine neden olmaktadır. Ancak periferik sinir sistemindeki yerleşimleri ve fizyolojik/patofizyolojik durumlardaki ekspresyon düzeylerine ilişkin bilgiler kısıtlıdır. Glutamerjik sistemin periferik sinir sistemindeki rolleri hakkında kısıtlı bilgiler bulunmasına rağmen özellikle nöromüsküler junction'larda ve schwann hücrelerinde GT'lerin varlığının saptanması bu konudaki çalışmalara hız kazandırmıştır (139). Choi ve ark. tarafından EAAT-1, EAAT-2 ve EAAT-3'ün optik sinirde eksprese edildiği ve optik sinir hasarı sonucu özellikle EAAT-1 ekspresyon düzeyinin azaldığını raporlamış, dolayısıyla glial GT'lerin optik sinir nörotoksitesine karşı koruyucu etkinlik gösterdikleri ileri sürülmüştür (140). Ayrıca ağrının iletiminde rol oynayan nosiseptif afferent sinir liflerinde, dorsal kök gangliyon ve spinal kord hücrelerinde GT'lerin eksprese edildiği gösterilmiş ve siyatik sinir hasarı sonucu gelişen nöropatik ağrıda spinal korddaki EAAT-1 ve EAAT-2 ekspresyonlarında meydana gelen azalmanın rol oynadığı ifade edilmiştir (141).

### **2.3.6. Periferik Nöropati ve Ürogenital Sistem İlişkisi**

Herhangi bir nedenle gelişen periferik nöropati, mesane ve seks organlarının inervasyonunu bozarak ürogenital disfonksiyon gelişimine neden olmaktadır. Ancak bu durumun çoğu zaman başlangıçta asemptomatik olması tanı koyulmasını zorlaştırmaktadır (142). Özellikle periferik nöropati prevalansının oldukça yüksek olduğu diyabet hastalarında sıklıkla diyabetik sistopati, detrusor overaktivitesi ve üriner inkontinans problemleri ortaya çıkmaktadır. Birçok hastada mesane disfonksiyonu erken dönemlerde saptanamamaktadır (143).

Diyabetik hastalarda mesane disfonksiyonunun yanı sıra seksüel disfonksiyonun da sıklıkla geliştiği bilinmektedir. Yapılan araştırmalar diyabetik erkeklerde ED gelişiminin

normal erkek bireylere göre üç kat daha fazla olduğunu göstermekte bu duruma da diyabetle indüklenen nöropatilerin ve vasküler hasarın neden olduğu bilinmektedir (144).

Diyabet haricinde özellikle travmaya bağlı nöropatilerin önemli bir kısmını oluşturan radikal prostatektomi sonucu üriner inkontinans ve ED yüksek oranda gelişebilmektedir (145, 146). Radikal prostatektomi sırasında sinir koruyucu (*nerve-sparing*) tekniklerin gelişmesine rağmen prostatın mesaneye yakın komşulukta olması, mesane ve seksüel organları uyaran pelvik pleksus, hipogastrik ve KS'lerin prostata olan yakın yerleşimleri sebebiyle üriner inkontinans, detrusor hipo veya overaktivitesi ve ED kaçınılmaz hale gelmektedir (146, 147). Travmatik periferik nöropatiye bağlı ürogenital bozukluklarda direkt nöronal hasara ek olarak travmaya bağlı gelişen inflamasyon ve iskeminin de sinir liflerine zarar verdiği, uç organda apoptotik/fibrotik süreçlerin oluşumuna aracılık ettiği saptanmıştır (148).

Kemoterapiyle indüklenen periferik nöropatilerde de dizüri ve üriner inkontinans gibi alt idrar yolu semptomlarının ve ED'nin sıklıkla görüldüğü rapor edilmiştir (149).

#### **2.4. ED'de Deneysel Hayvan Modelleri**

ED'nin ilerleyen yaşın yanında radikal prostatektomi, diyabet ve kemoterapi gibi nedenlerle insidansının hızla artması ve dolayısıyla hastaların yaşam kalitesini ciddi oranda etkilemesi; ayrıca günümüzde kardiyovasküler hastalıklar açısından ciddi bir risk faktörü olarak kabul edilmesi fizyopatolojisinin anlaşılmasında ve tedavisinde yeni yaklaşımların araştırılması gereklidir. Tüm bu çalışmaların etik olarak insanlarda yapılamaması deneysel hayvan modellerinin geliştirilmesine neden olmuştur (150).

ED'de uzun yıllardır deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Özellikle 1863 yılında Eckharda tarafından yapılan pelvik sinirlerin erektil fonksiyondaki öneminin belirtildiği çalışmanın ardında seksüel disfonksiyon ve ED patofizyolojisinin aydınlatılmasına yönelik birçok deneysel çalışma yürütülmüştür (151, 152). 20.yy'nin başlarında çalışmalar köpek, kedi, maymun ve tavşanlar gibi hayvanlar üzerinde yürütülürken günümüzde bu hayvanların yerini ekonomik olmaları, bakımlarının ve temin edilmelerinin kolaylığı gibi nedenlerle rodentlerin aldığı görülmektedir (151). Özellikle sıçan ürogenital anatomisinin aydınlatılması ve KS'lerin elektriksel stimülasyonu sonucu İKB'de görülen değişiklikler rodent kullanımını arttırmıştır. Heaton ve ark.'larının farmakolojik ajanlarla ereksiyonun uyarılabilirliğini göstermesinin ardından Mills ve ark.'larının ortalama arteriyel basıncının (OAB) İKB'yi etkilediğini göstermesi üzerine



çeşitli modifikasyonlar yapılarak günümüzde kullanılan yöntemler geliştirilmiştir (153–155).

#### 2.4.1. Diyabet Modelleri

Diyabetle indüklenen ED'nin insidansının yüksek olması ve mevcut oral tedavilere yanıtın yetersiz kalması nedeniyle yeni terapötik ajanların keşfi için ED'nin değerlendirilmesinde çeşitli vasküler ve nöronal değişikliklere yol açan Tip 1 ve Tip 2 diyabet modelleri kullanılmaktadır (156). Diyabetik ED modellerinden sıçan ve fareler için en sık kullanılan model streptozotosinle (STZ) indüklenen diyabetik ED modelidir. STZ ile indüklenen ED modeli insülin bağımsız diyabetik bir model olup vasküler hasara ve nöropatlere neden olduğu bilinmektedir. STZ etkisini pankreatik  $\beta$  hücrelerinde konsantrasyon bağımlı nekroza yol açarak gösterir (156, 157). Özellikle yüksek doz STZ'nin akson ve schwann hücre hasarına neden olarak periferik nöropatiyi indüklediği bilinmektedir (156, 158, 159). Yapılan çalışmalar nöropati yanında düz kas ve endotel hasarı yarattığını ve İKB'de belirgin düşüşe neden olduğunu göstermiştir (160, 161). Ayrıca STZ'nin penisin parasempatik inervasyonunu bozduğu ve eNOS ekspresyonunu azalttığı dolayısıyla endotelial disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir (162).

BB/Wor (*BioBreeding/Worcester*) sıçanları ise tip 1 diyabete sahip sıçanlar olup hem santral hem de periferik nöropati belirtileri göstermektedir. Yapılan çalışmalar BB/Wor diyabetik sıçanlarda erektil fonksiyonun %50 oranında azaldığını korpus kavernozum yapısında ise yüksek oranda apoptozis geliştiğini göstermektedir (163). Bu modelin avantajı diğer modellerde olduğu gibi sıçanlarda vaskülopatinin gelişmemesidir. Böylelikle sadece nöropatik değişiklikler değerlendirilebilmektedir. Ancak yüksek maliyetli olmaları BB/Wor tipi sıçanların kullanımını kısıtlamaktadır (164).

Genetik olarak tip 2 diyabete sahip Zucker tip sıçanlar da diyabetik ED'nin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Zucker tip sıçanlar hipergliseminin yanında obezite, hiperlipidemi ve hipertansiyona da sahiptir ve genellikle obezite ve metabolik sendrom araştırmalarında kullanılmaktadır. Bu modelde hem vasküler hem de nöronal değişiklikler görmek mümkündür (165). Zucker tip sıçanlarda leptin reseptöründe mutasyon olduğu bilinmektedir. Ancak tip 2 diyabetli hastalarda leptin reseptör eksikliği saptanmamıştır. Bu nedenle klinik durumu sağlıklı olarak yansıtmadığı düşünülmektedir ve bu eksikliği gidermek için Zucker tip sıçanlar genelde Sprague Dawley sıçanlarla melezleştirilerek kullanılmaktadır (166).

Alloksan da STZ gibi pankreas hücre hasarı yaratarak tip 1 diyabet modeli oluşturulmasında kullanılan bir kimyasaldır. Bu model yüksek doz alloksan kullanımı gerektirdiğinden STZ'ye oranla daha az tercih edilmektedir (156, 167). Ayrıca yüksek dozda alloksanın pankreas hasarının yanında böbrek hasarına neden olup ölüm oranını artırması kullanımını kısıtlayan diğer bir faktördür. Alloksanla indüklenen diyabetin de periferik nöropati ve kardiyovasküler hasara neden olduğu bilinmektedir. Korpus kavernozum kontraksiyonuna ve eNOS inhibisyonuna neden olarak erektil fonksiyonu bozduğu gösterilmiştir (168).

Tüm bu modellerin haricinde *db/db* obez fareler, OLETF diyabetik sıçanlar da diyabet sonucu gelişen ED'nin araştırılmasında kullanılan deney hayvanlarıdır (162).

#### **2.4.2. Yaşlanma Modelleri**

Yaşlanmanın ED gelişimindeki en önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle yaşa bağlı ED'nin gelişimindeki mekanizmaları ayrıntılarıyla ortaya koymak için deney hayvanlarında yaşa bağımlı erektil fonksiyon incelenmektedir (156). 9-14 ve 62 haftalık Sprague Dawley sıçanlarda yapılan araştırmalar yaşla tunika tabakasında incelleme, İKB ve NOS aktivitesinde azalma olduğunu göstermektedir (169–171). Benzer şekilde Wistar tipi sıçanlarda da yaşlanmayla birlikte korporal düz kasta elastik liflerin dejenere olduğu ve kollajen miktarının arttığı dolayısıyla erektil fonksiyonun bozulduğu gösterilmiştir (151).

#### **2.4.3. Hiperkolestrolemi Modelleri**

Yapılan çalışmalar total kolesteroldeki her mmol/L'lik artışın ED riskini 1.32 kat arttırdığını göstermektedir. Bu nedenle hiperkolestrolemi ile indüklenen ED modelleri sıçan ve tavşanlarda tercih edilmektedir. Tavşan ve sıçanlar yaklaşık 3-12 ay yüksek yağ içerikli besinlerle beslenmekte ve sonuç olarak İKB/OAB oranında ve eNOS, nNOS ekspresyonunda azalma saptanmaktadır (172–174). Bunun haricinde apolipoprotein E geni silinmiş farelerde de endotelial disfonksiyon geliştiği buna bağlı olarak vazoreaktivitenin değiştiği ve eNOS ekspresyonunun azalarak ED geliştiği saptanmıştır (156).

#### **2.4.4. Hipertansiyon Modelleri**

Hipertansiyonun ED ve kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle özellikle spontan hipertansif sıçanlarda (SHR) ED çalışmaları sürdürülmektedir. Çalışmalar SHR'lerde İKB'nin ve peniste eNOS, nNOS

ekspresyonunun azaldığını korpus kavernozumda fibrotik değişiklikler olduğunu göstermektedir (175, 176).

#### **2.4.5. KS Hasarı**

Prostat kanserinin en yaygın tedavi yöntemi olan radikal prostatektominin yaygınlaşmasıyla son yıllarda sinir koruyucu cerrahi yöntemlerin kullanılmasına rağmen radikal prostatektomi sonucu ED gelişimi hala en yaygın görülen komplikasyon olarak karşımıza çıkmaktadır (154). Walsh ve ark. radikal prostatektomi sonucu nöronal yolların etkilenecek ED gelişimine neden olduğunu göstermişlerdir. Langworthy ve ark.'nın sıçanlarda pelvik sinirlerin korpus kavernozumunu uyardığını göstermesi çalışmalara hız kazandırmış ve Quinalan ve ark. erektil fonksiyonun değerlendirilmesi için ilk deney hayvanı modelini geliştirmiştir (162).

Çeşitli hayvan modellerinde KS hasarı, KS'nin tek veya çift taraflı sıkıştırılması, kesilmesi, dondurulması ve gerilmesi gibi farklı tekniklerle uygulanmaktadır (151). KS sinir hasarı modeli genellikle bir klemp veya forseps yardımıyla KS'nin çeşitli zaman dilimlerinde mekanik olarak sıkıştırılması şeklinde uygulanmaktadır. KS hasarı uygulanan tüm modellerde İKB/OAB oranının, MPG ve KS'de nNOS ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (177, 178). Yapılan çalışmalar bir süre sonra KS rejenerasyonunun gerçekleştiğini gösterse de bu süre içinde peniste gerçekleşen morfolojik değişikliklerin erektil fonksiyonun tam olarak geri kazanımını engellediğini göstermektedir (179).

KS hasarı modelleri unilateral ve bilateral olarak uygulanmaktadır. Unilateral modelde; KS'lerin bir tanesi hasarlanıp kontralateral KS sağlam bırakılmaktadır. Ancak bu modelde sağlıklı sinirden hasarlı kısma doğru aksonal dallanmalar ve istenmeyen reinervasyonlar oluşabilmekte, bu durum da test edilmek istenen hipotezin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Bu model tek taraflı sinir hasarının olduğu pelvik operasyonlar sonucu gelişen hasarın bir modeli olarak kullanılmaktadır (154). BKSH ise aynı hayvanda iki KS'nin de aynı protokol uygulanarak hasarlanmasına dayanmaktadır. BKSH'nin sinirlerin korunduğu radikal prostatektomi sonucu gelişen ED'yi en iyi yansıtan model olduğu saptanmıştır (97, 154, 180). Bilateral KS kesisi ise sinirlerin korunmadığı radikal prostatektomi sonucu gelişen ED'yi yansıtmaktadır (181, 182). Son yıllarda radikal prostatektomi sonucu gelişen ED tedavisinde nörotrofik ve nöroprotektif tedavi arayışları hız kazanmıştır. Bu yaklaşımlar için en uygun deney modelleri olan KS hasarı modellerinin kullanımı artmıştır (162).

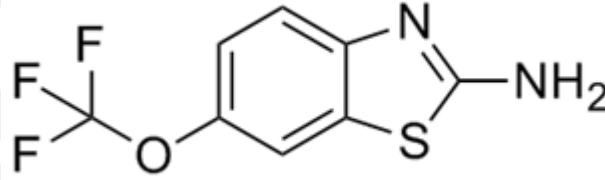
## 2.4.6. Diğer Modeller

Operasyonel veya kimyasal kastrasyon, sigara ile indüklenen ED, spinal kord hasarı, stresle indüklenen modeller, arteriyel ligasyon gibi modeller de ED patofizyolojisi veya olası terapötik etkili ajanların araştırılması için literatürde kullanılmaktadır (151, 156, 162).

## 2.5. Riluzol

### 2.5.1. Kimyasal Yapısı ve Endikasyonları

Riluzol (2-amino-6-(triflorometoksi) benzotiyazol) ilk olarak 1960'lı yıllarda sentezlenmiş ve 1980'li yıllarda antikonvülsan etkisi sebebiyle Mizoule ve Gandelsman tarafından patentlenmiş olan benzotiyazol türevidir (183, 184) (Şekil 2).



Şekil 2. Riluzolün kimyasal yapısı (Bryson'dan, 184)

İlerleyen yıllarda anksiyolitik, antikonvülsan ve anestezi özelliklerinin de keşfedilmesine rağmen günümüzde nöroprotektif etkileri sebebiyle nörodejeneratif bir hastalık olan ALS'nin tedavisinde kullanılan etkisi kanıtlanmış ilk ilaç olup, 1995 yılında ALS tedavisi için FDA tarafından onaylanmış ve günümüzde hala klinikte kullanılmaktadır (9, 10).

Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar riluzol tedavisinin ALS dışında Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarda, nöropatik ağrı, psikiyatrik bozukluklarda ve birçok periferik sinir hasarı modelinde umut verici sonuçlar sunduğunu göstermiştir (17, 185–191). Ayrıca yapılan prelinik çalışmalarda deney hayvanlarında oluşturulan spinal kord hasarı modellerinde oluşan nöropatolojik tabloyu anlamlı şekilde iyileştirdiği gözlenmiştir (192–194). Bu sonuçlardan hareketle riluzol akut spinal kord hasarı tedavisinde kullanılmak üzere faz çalışmalarına girmiş ve hala Faz II/III araştırması devam etmektedir (195).

### 2.5.2. Farmakokinetik Özellikleri

Riluzolün oral biyoyararlanımı %60 civarındadır. Yüksek yağ içerikli bir öğün sonrası kullanımında serum kan konsantrasyonunun %45 oranında azaldığı bilinmektedir. Klinikte kararlı durum plazma konsantrasyonuna 5 günlük düzenli kullanım sonucu ulaştığı saptanmıştır. Ayrıca %96 oranında plazma proteinlerinden albümine ve lipoproteinlere bağlandığı bilinmektedir (184). ALS tedavisinde 25, 50 ve 100 mg'lık dozları çeşitli kombinasyonlar halinde kullanılabilir. Gastrointestinal kanaldan hızla absorpsiyona uğradığı bilinen riluzol oral alımı takiben 1-1.5 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmaktadır (196). Riluzol büyük oranda karaciğerde sitokrom (CYP) P450 enzim ailesinden CYP1A1, CYP1A2 ve glukuronidasyonla metabolize edilmektedir ancak klerensi bireylerarası farklılıklar göstermektedir. 6 ana olmak üzere birçok metaboliti olduğu bilinmektedir (184). Riluzolün CYP 1A2 enzimiyle N-hidroksiriluzol metabolitine dönüştüğü ve bu formun majör aktif metabolit olduğu yapılan *in vitro* çalışmada saptanmıştır. Riluzolün CYP 1A1 aracılığıyla da minör metabolitleri olan 4-hidroksiriluzol, 5-hidroksiriluzol, 7-hidroksiriluzol ve 2-amino-6-hidroksibenzotiyazol'e dönüştüğü bilinmektedir (197, 198).

### 2.5.3. Etki Mekanizması

Riluzolün nöroprotektif etkisini nasıl meydana getirdiği kesin olarak bilinmemekle birlikte çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Çeşitli çalışmalarda riluzolün hacme-duyarlı klorür kanallarını (12), voltaj-bağımlı Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> kanallarını (13), NMDA reseptör aracılı kanalları inhibe ettiği ileri sürülmüştür (14). Bir başka çalışmada ise riluzolün cPLA2'yi inhibe ederek araşidonik asit oluşumunu azalttığı ve bu şekilde antioksidatif etki gösterdiği ifade edilmiştir (15).

Riluzolün en önemli etki mekanizmalarından biri de glutamerjik aşırımı modüle etmesidir (10, 185, 189, 192). Riluzolün sıçan hipokampus ve kortikal sinaptozomlarda K<sup>+</sup>la uyarılan glutamat salımını inhibe ettiği bildirilmiştir (189, 195). Fumagalli ve ark.'nın yaptığı çalışmada riluzolün doz bağımlı olarak EAAT-1, EAAT-2 ve EAAT-3 taşıyıcılarının aktivitesini arttırdığını göstermiştir (199). ALS'li hastalarda da glutamat seviyesinin sağlıklı bireylere göre üç kat daha fazla olduğu ve motor nöronlardaki EAAT ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (200). Bu nedenle riluzolün nöroprotektif etkisinden EAAT aktivatörü etkisinin de sorumlu olabileceği bildirilmiştir. Yalnızca santral olarak değil periferik sinir hasarı sonucu değişen GT ekspresyonlarının da çeşitli

nöroplastik değişikliklere ve eksitotoksik yolakların aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (16, 201–203). Siyatik sinir hasarı oluşturulan sıçanlarda EAAT aktivatörü olan riluzolün non-selektif olarak glutamat uptake'ini arttırdığı ve bu sayede glutamat eksitotoksitesini önleyerek nöroprotektif etki oluşturduğu saptanmıştır (16, 17). Benzer şekilde sıçanlarda optik sinir hasarında riluzol tedavisinin glutamat seviyesini anlamlı olarak azaltarak nöroprotektif etki oluşturduğu gösterilmiştir (204).

Fare astrosit hücre kültüründe yapılan bir çalışmada riluzolün nörotrofik faktörler olan NGF, GDNF ve BDNF sentezini uyardığı saptanmıştır (189). Riluzolün nöroprotektif etkisine iyon kanalı inhibitörü ve anti-eksitotoksik etkilerinin yanında PKC inhibitör etkinliğinin de aracılık ettiği saptanmıştır. Kortikal hücre kültürlerinde yapılan çalışmada PKC aktivatörü ile artan PKC aktivitesinin riluzol uygulamasıyla azaldığı ifade edilerek PKC direkt inhibitörü olduğu gösterilmiştir (18). Endotelial hücre kültürü kullanılarak yapılan bir çalışmada ise riluzolün selektif olarak PKC  $\beta$  II alt tipini inhibe ederek etki gösterdiği saptanmıştır (9).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Tablo 2’de sunulmuştur.

**Tablo 2.** Kullanılan kimyasallar, marka ve kodları

Kimyasal adı	Marka/ Kod
% 0.9 İzotonik Sodyum Klorür (NaCl)	Polifarma
Amonyum persülfat (APS)	Bio-Rad, 161-0700
Batticon® antiseptik solüsyon	Adeka
BCA protein konsantrasyonu ölçüm kiti	Thermo scientific, 23225
Bromofenolblue	Biomatik, A2223
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad, 1705061
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, 43815
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) tetrasodyum tuzu	ZAG Kimya, 10378-23-1
Forane® likit (İzofluran)	Abbott
Fosfataz inhibitör kokteyl 1	Sigma, P2850
Fosfataz inhibitör kokteyl 2	Sigma, P5726
Gliserol	Sigma, G5516
Glisin	Sigma, G8898
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma, 320331
Ketalar® (Ketamin HCl)	Pfizer
Metanol	Isolab, 67-56-1
Nevparin® enjektabl flakon 5000IU/mL (Heparin)	Mustafa Nevzat
Partemol® 1g/100mL (Parasetamol)	Vem İlaç
PMSF (Fenil metil sülfonil florid)	Sigma, 78830
Ponceau S	Sigma, P7170
Proteaz inhibitör kokteyl	Sigma, P8340
Rilutek® 50mg film tablet (riluzol)	Sanofi Aventis
Riluzol	Sigma, R116

Tablo 2. (Devam)

Rompun® %2 (Ksilazin)	Bayer
Sığır serum albümin (BSA)	Capricorn Scientific, BSA-1U
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 <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma, S6508
Sodyum pirofosfat dibazik (Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Sigma, 71501
Superblock™ Blocking Buffer in PBS	Thermo scientific, 37515
Tetrametiletilendiaminden (TEMED)	Sigma, T9281
TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, %10	Bio-Rad, 161-0183
Tris/Glycine/SDS Buffer 10x	Bio-Rad, 161-0772
Tris-Baz (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Sigma, T1503
Triton X 100	Sigma, T8787
Tween 20	Sigma, P1379
Yağsız süt tozu	Regilait
β-merkaptotanol	Merck, 8.057440.0250

### 3.1.2. Antikorlar

Kullanılan antikorlar Tablo 3’de sunulmuştur.

**Tablo 3.** Kullanılan antikorlar, marka ve kodları

Antikor adı	Marka/ Kod
Anti-EAAT-1 antikoru	Bioss, bs-1003R
Anti-EAAT-2 antikoru	Bioss, bs-1751R
Anti-GAP-43 antikoru	Cell Signalling, 8945
Anti-mouse IgG HRP-linked antikoru	Bio-Rad, 170-5047
Anti-PKC β II antikoru	Abcam, ab32026
Anti-p-PKC β II (ser660) antikoru	Cell Signalling, 9371
Anti-rabbit IgG HRP-linked antikoru	Bio-Rad, 170-5045
Anti-β aktin antikoru	Sigma, A5441



### 3.1.3. Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 4’de sunulmuştur.

**Tablo 4.** Kullanılan cihazlar ve markaları

Cihazın Adı	Marka/ Menşei
Anestezi cihazı	E-Z Systems Inc., ABD
Buz makinesi	Hoshaizaki, Japonya
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik, Türkiye
Chemidoc görüntüleme sistemi	Bio-Rad, ABD
Data kayıt ve analiz sistemi	MP35 BIOPAC, 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	BioRad, ABD
Hassas analitik terazi	Ohaus, ABD
Homojenizatör	Heidolph, Almanya
Isıtıcı	Witeg, Almanya
Kaba terazi	Premier, Türkiye
Magnetik karıştırıcı	Witeg, Almanya
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific, ABD
Minisantrifüj	Isolab, Türkiye
Otomatik Pipetler	Eppendorf, ABD
pH metre	Ohaus, ABD
Platin elektrod	Grass Technologies, ABD
Soğutmalı santrifüj	Sigma, ABD
Sonikatör	Bandelin, Almanya
Su banyolu çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Ultrasonik banyo	Elma Ultrasonics, Almanya
Vorteks	Isolab, Türkiye
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Shimadzu, Japonya

### **3.1.4. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar**

#### **3.1.4.1. Stok Çözelti ve Tamponlar**

##### 0.1 N HCl çözeltisi

Derişik stok HCl çözeltisinden (%37'lik) 813 µL alındı, 100 mL'ye deiyonize suyla tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 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. Ardından 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.

##### %20'lik Triton-X 100

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 alikotlanarak (1.5 mL/ 2 mL'lik eppendorf tüp) -20°C'de saklandı.

##### 1 N NaOH Çözeltisi

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

##### 200 mM Sodyum ortovanadat (NaVan) çözeltisi

3.68 g Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (MA: 183.91 g/mol) 90 mL deiyonize suda çözüldü ve pH'sı 1N HCl ile pH 10.0'a ayarlandı. Sarı renk alan çözelti renksiz oluncaya kadar kaynatılıp

soğutuldu ve tekrar pH kontrolü yapıldı. Hazırlanan çözelti alikotlanarak (1.5 mL/ 2 mL'lik eppendorf tüp) -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 alikotlanarak (1 mL/ 1.5 mL'lik eppendorf tüp) -20 °C'de saklandı.

#### 100 mM PMSF

0.174 g PMSF (MA: 174.19 g/mol) 10 mL etanol içinde çözüldü. Hazırlanan çözelti alikotlanarak (0.5 mL/ 0.5 mL'lik eppendorf tüp) -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 pH'ı derişik HCl ile pH 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 alikotlanarak (1 mL/ 1.5 mL'lik eppendorf) -20 °C'de saklandı. Tampona kullanılmadan 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. Çözeltinin pH'si 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

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 çözöldü. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

### **3.1.4.2. Çalışma Çözeltileri ve Tamponları**

#### TNTE lizis tamponu

TNTE Lizis tamponundaki son çözelti konsantrasyonları 50 mM Tris-HCl (pH: 7.4), 150 mM NaCl, %1 Triton-X 100, 1 mM EDTA (pH:7.0), 5 mM NaPPi, proteaz inhibitör kokteyli (PI), %10 Gliserol, 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF olacak şekilde çözeltiler Tablo 5'de yer alan hacimler doğrultusunda birleştirildi ve toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı. TNTE lizis tamponu her deney başlangıcında taze olarak hazırlandı ve deney süresince buz içerisinde saklandı.

**Tablo 5.** TNTE lizis tamponu hazırlamak için gerekli stok çözeltiler, konsantrasyonları ve hacimleri

<b>Stok çözeltiler ve konsantrasyonları</b>	<b>Hacim (µL)</b>
1 M Tris-HCl (pH: 7.4)	1000
5 M NaCl	600
%20'lik Triton-X 100	1000
0.5 M EDTA	40
Gliserol	2000
PI	200
50 mM NaPPi	2000
200 mM NaVan	200
100 mM PMSF	200
Deiyonize su	12360
<b>Toplam</b>	<b>20000</b>

#### Tris-Glisin-SDS (TGS) yürütme tamponu

100 mL 10X TGS deiyonize suyla 1 L'ye seyreltildi. Çözelti her seferinde taze olarak hazırlandı.

### Transfer tamponu

10X Tris-Glisin tamponu 1X olacak şekilde seyreltildi ve 200 mL metanol eklenerek toplam hacim deiyonize suyla 1 L'ye tamamlandı. Çözelti her seferinde taze olarak hazırlanarak transfer işlemine kadar soğuması için +4°C'de saklandı.

### TBST çözeltisi

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

### “Stripping” çözeltisi

3.125 mL 1 M Tris-Cl (pH:6.8), 5 mL %20'lik SDS, 350 µL β-merkaptoetanol karıştırıldı ve toplam çözelti hacmi deiyonize suyla 50 mL'ye tamamlandı. Çözelti her seferinde taze olarak hazırlandı.

### %0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisi

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

### %5'lik Sığır serum albümin (BSA) çözeltisi

2.5 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. Riluzol Çözeltisinin Hazırlanması**

Riluzol Sigma Aldrich (Kat no:R116) ve Sanofi Aventis (Rilutek® 50 mg film tablet)'ten temin edildi. 8 mg/kg dozunda riluzol hazırlamak için; tartılan miktar riluzol veya bir film tablet 0.1 N HCl'de çözündürülüp %0.9'luk NaCl çözeltisiyle istenen konsantrasyona seyreltildi. Tüm enjeksiyonlar intraperitoneal (i.p.) yoldan uygulandı.

### 3.2.2. Rilutek® 50 mg Film Tabletten Riluzol Geri Kazanım Analizi

Rilutek®'e ait 1 film tablet 50 mg riluzol etkin maddesi içermektedir. Deney hayvanına uygulanabilecek riluzol taşıyıcı çözeltisi literatürlerden faydalanılarak daha önceki çalışmalarla optimize edildi (1.6 mg/mL riluzol çözeltisi için 1.6 mg riluzol 145 µL 0.1 N HCl'de çözüldü, %0.9'luk NaCl ile 1 mL'ye tamamlandı). Bu taşıyıcı içerikten hareketle 20 ppm konsantrasyonuna ulaşmak üzere 1 tablet gerekli hacimde 0.1 N HCl+%0.9'luk NaCl karışımında çözüldü ve 15 dakika (dk) ultrasonik banyoda bekletildi. Uygulanan örnek hazırlama işlemi sonucu, ilaç etkin maddesinin ekstre edildiği miktarı saptamak için geri kazanım çalışması yapıldı. Bu amaçla, 1 film tablet, yukarıda belirtilen şekilde uygun çözücü karışımında çözüldü, 0.45 µm çaplı şırınga ucu filtresinden süzülme ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) sistemine enjekte edildi. Bunun yanında, eş konsantrasyondaki 20 ppm baz maddeden hazırlanan standart riluzol çözeltisi direkt sisteme enjekte edildi. Bu işlem 3 farklı tablet üzerinden tekrarlandı ve pik alanları ortalaması alındı. Pik alanları karşılaştırılarak tabletten geri kazanım miktarı "Eşitlik 1" formülü kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Geri kazanım yüzdesi} = \frac{\text{Numune çözelti pik alanı}}{\text{Standart çözelti pik alanı}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

### 3.2.3. Deney Hayvanları

Çalışmada yaşlarına göre eşleştirilmiş, Sprague-Dawley erkek sıçanlar (275-400 g) kullanılmıştır. Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen sıçanlar deney protokolü süresince 21±2°C'de 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusu doğrultusunda merkezde barındırılarak *ad libitum* beslenmiştir. BKSH modelinin oluşturulmasının ardından her bir deney hayvanı ayrı kafeslerde barındırılmıştır. Deneysel çalışmanın yapılabilmesi için KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan etik kurul onayı alınmıştır (2018/01, Ek-1).

### 3.2.4. Deney Grupları ve Deneysel Protokol

Çalışmada BKSH modelinde 1, 7 ve 15 günlük tedavi sonrası riluzolün etkinliğinin değerlendirilmesi planlandı. Tez çalışması kapsamında Tablo 6'de yer alan deney grupları kuruldu ve fonksiyonel çalışmaları gerçekleştirildi.

Deney bitiminde, sıçanların penis dokusu, MPG ve KS'ler çıkarılıp moleküler analizlerde kullanılmak üzere sıvı azotta hızlıca dondurulup -80°C'de saklandı.

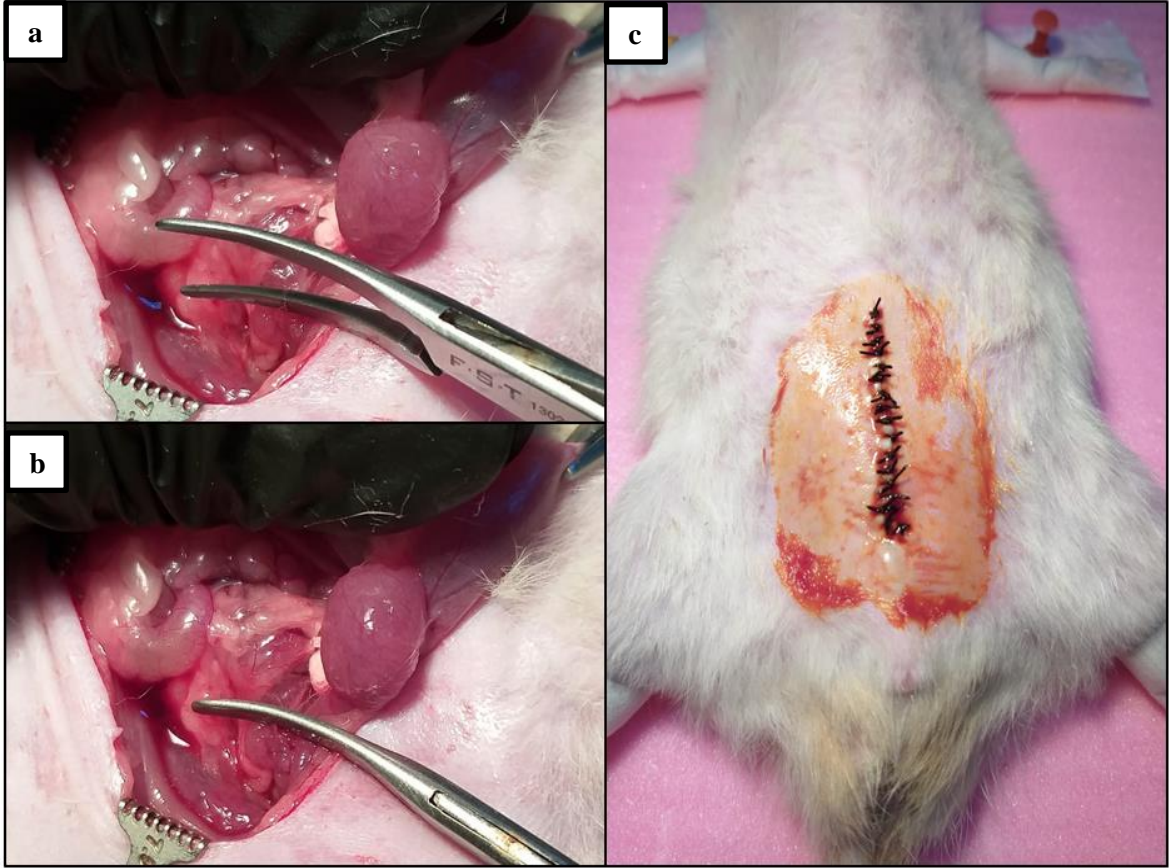
**Tablo 6.** Deney grupları

		<b>Deney Grupları</b>	<b>n</b>
<b>1 Gün</b>	<b>Grupları</b>	1. Sham + Taşıyıcı ( <b>ST</b> )	6
		2. Sham + Riluzol (8mg/kg; <b>SR</b> )	1
		3. BKSH + Taşıyıcı ( <b>BT</b> )	7
		4. BKSH + Riluzol (8mg/kg; <b>BR</b> )	2
<b>7 Gün</b>	<b>Grupları</b>	5. Sham + Taşıyıcı ( <b>7ST</b> )	7
		6. Sham + Riluzol (8mg/kg; <b>7SR</b> )	3
		7. BKSH + Taşıyıcı ( <b>7BT</b> )	6
		8. BKSH + Riluzol (8mg/kg; <b>7BR</b> )	6
<b>15 Gün</b>	<b>Grupları</b>	9. Sham + Taşıyıcı ( <b>15ST</b> )	6
		10. Sham + Riluzol (8mg/kg; <b>15SR</b> )	6
		11. BKSH + Taşıyıcı ( <b>15BT</b> )	5
		12. BKSH + Riluzol (8mg/kg; <b>15BR</b> )	6
		<b>Toplam</b>	<b>61</b>

### 3.2.5. BKSH Modelinin Oluşturulması

Sıçanlar %2'lik izofluran anestezisi altında supin (sırt üstü) pozisyonunda yatırılarak ekstremitelemi cerrahi tablaya sabitlendi. Aseptik şartlarda %70'lik alkolde sterilize edilmiş olan cerrahi aletler kullanılarak abdomen orta hattı boyunca yaklaşık 3 cm'lik bir kesi atıldı. Dikkatli bir şekilde deri altı dokusu ve kas diseksiyonu gerçekleştirilerek mesaneye ulaşıldı. Prostat bezinin görünürlüğünü kolaylaştırmak için mesanenin bütünlüğü bozulmadan baş kısmından küçük bir klemp yardımıyla pozisyonu değiştirildi. KS'lerin belirlenmesini kolaylaştırmak amacıyla skrotum kesesinde yerleşim gösteren testislerin deri bağlantıları dikkatli bir şekilde kesildi ve testis, duktus deferens ve seminal veziküller bir gazlı bez yardımıyla abdomene alındı. Prostat bezinin dorsolateralinde bulunan MPG ve bilateral KS'ler çevre dokulara zarar vermeden tespit edildi. İnce bir forseps yardımıyla prostat bezine bitişik yerleşim gösteren KS'ler izole edildi. MPG'nin 2-3 mm distalinden, sağ ve sol KS'ler bir pens yardımıyla 1'er dk'lık 2 set şeklinde (aralarında 15 saniye (sn)'lik bir periyod bırakılarak) sıkıştırarak BKSH modeli oluşturuldu ve sonrasında abdomene alınan testisler dikkatli bir şekilde skrotal keselere yerleştirildi. Dokuların kurummasını önlemek amacıyla SF ile abdomen boşluğu yıkandı.

İnsizyon önce kas dokusu yakınlştırılarak 4.0'lık cerrahi ipek ile ardından deri tabakası 3.0'lık cerrahi ipek ile cerrahi suture yardımıyla kapatıldı (Resim 4). Hasar uygulanmayan kontrol "sham" sıçanları için benzer işlemler uygulandı ancak KS'ler tespit edildikten sonra hiç bir sıkıştırma işlemi yapılmadan insizyon kapatıldı. Enfeksiyon riskini önlemek için suture bölgesi antiseptik solüsyonla temizlendi. Deney hayvanlarının izofluran anestezisinden uyanması beklendi ve bütün deney hayvanlarının içme sularına bir gün süreyle 2 mg/mL dozunda asetaminofen eklendi. Tablo 5'deki tedavi gruplarında belirtilen gün boyunca deney hayvanlarına hergün aynı saatte 0.5 mL/100 g hacminde i.p. enjeksiyonla riluzol veya taşıyıcı (0.1 N HCl+%0.9'luk NaCl çözeltisi) uygulandı.

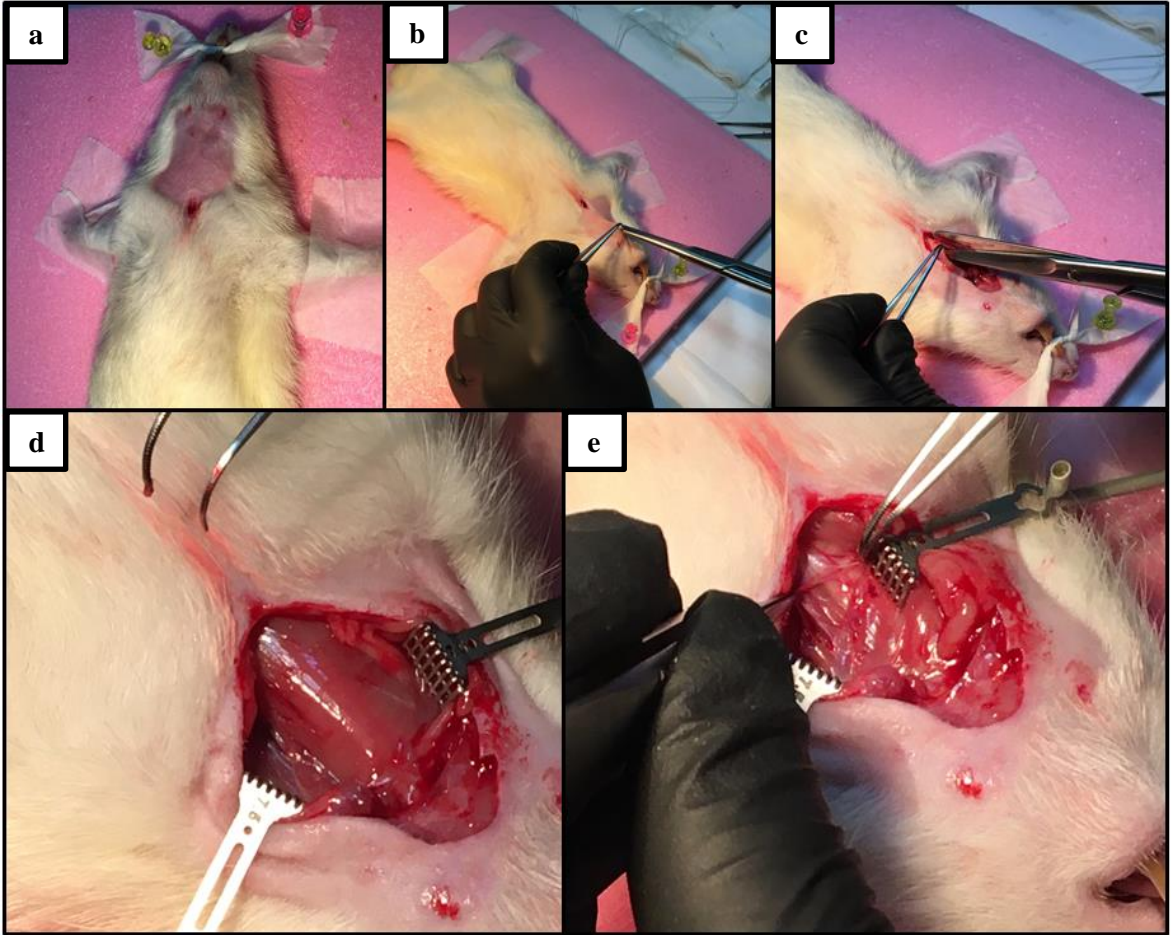


**Resim 4.** BKSH modelinin oluşturulması (a) KS'nin saptanıp pense yerleştirilmesi (b) KS'nin pens yardımıyla sıkıştırılması (c) BKSH hasarının ardından abdominal insizyonun kapatılması. BKSH: Bilateral kavernoöz sinir hasarı, KS: Kavernoöz sinir



### 3.2.6. OAB Ölçümü

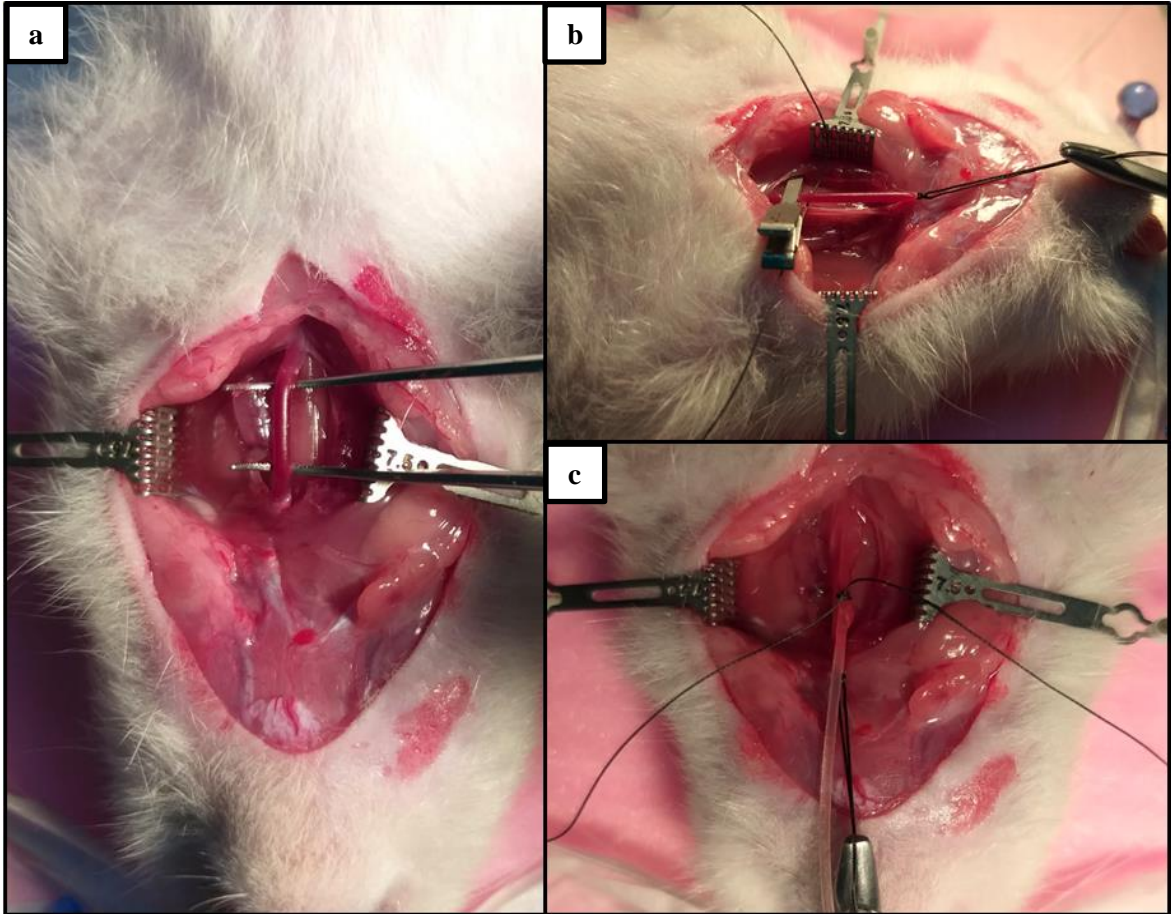
Deney hayvanlarında İKB, sistemik kan basıncına göre değerlendirildiği için İKB ile eş zamanlı olarak OAB ölçülmesi gereklidir. Bu amaçla, Resim 5’de gösterildiği gibi ketamin/ksilazin anestezisi (80 mg/kg, 5 mg/kg i.p.) altında spin pozisyonunda yatırılarak ekstremite ve çenesi sabitlenen deney hayvanlarının boyun bölgesi traş edildi. Aseptik şartlarda yaklaşık 3 cm’lik deri insizyonu gerçekleştirildi. Kas tabakası dikkatlice ayrıldı ve bir pens yardımıyla karotid arter komşuluğunda ilerleyen vagus siniri ve diğer sinir liflerine zarar vermeden bir pens yardımıyla sol karotid arter izole edildi.



**Resim 5.** Karotid arter izolasyonu (a) Deney hayvanının supin pozisyonunda yatırılması (b) Boyun derisi diseksiyonu (c) Boyun bölgesi kaslarının diseksiyonu (d) Karotid arterin saptanması (e) Sinir liflerinin karotid arterden ayrılması

4.0’lık cerrahi ipek iplik yardımıyla sol karotid arter askıya alındı. Arterin kraniyal ucu ipek iplik yardımıyla sıkıca bağlandı ve kan akımı kesildi. Arterin kalbe yakın kısmı ise geçici olarak küçük bir klemple sıkıştırıldı. Böylelikle yaklaşık 1 cm’lik bir alanda kan

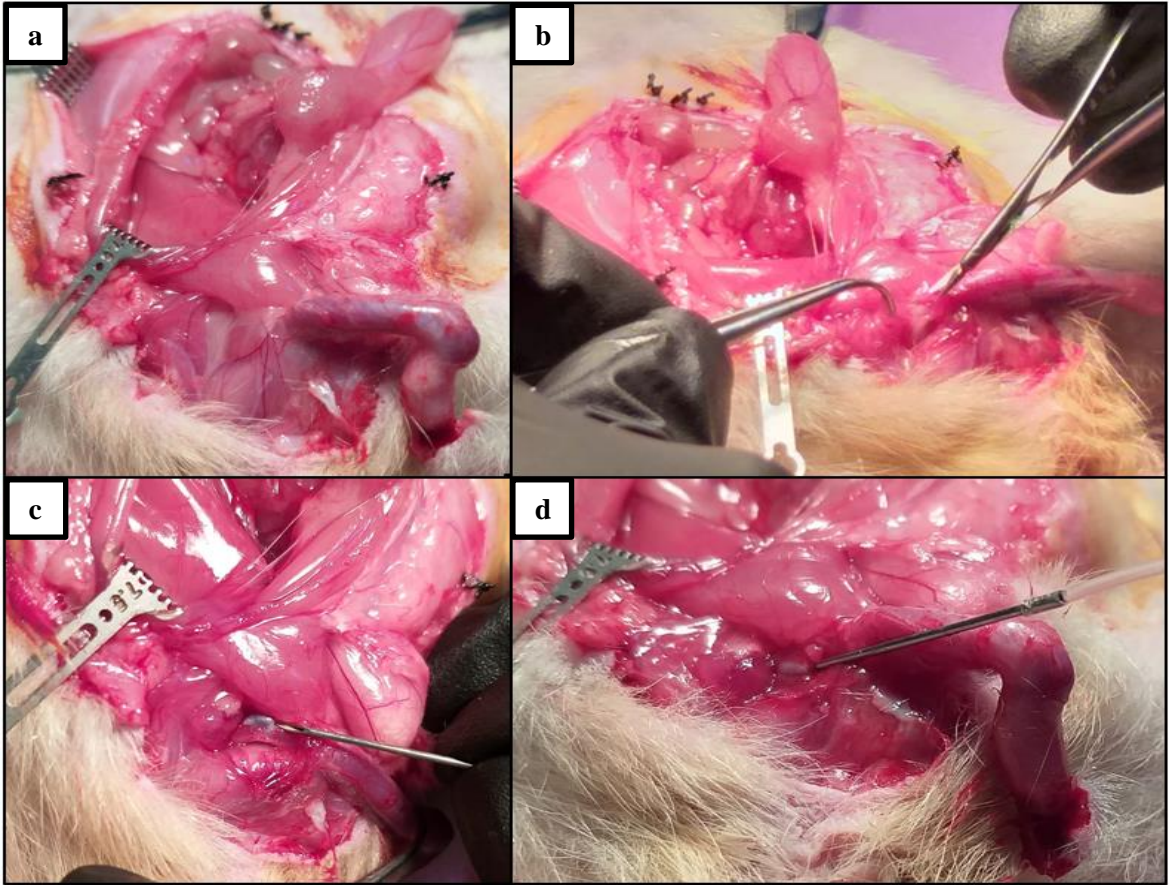
akımı geçici olarak durudurulmuş oldu. Kanülün yerleştirilmesini kolaylaştırmak için bir pens yardımıyla artere gerim verildi. İnce bir damar makasıyla karotid artere kesi atıldı ve bu kesiden diğer ucu basınç transdüserine bağlı olan ucu açılı olarak kesilmiş 250 U/mL heparin içeren polietilen 50 (PE-50) kanül yerleştirildi. Kanül yerleştirildikten sonra karotid arter kanülün üstünden sıkıca ipek iplikle bağlandı (Resim 6). Kan akımının yeniden sağlanabilmesi için yerleştirilen pens çıkarıldı. Pıhtılaşmayı önlemek için sıçanlara kanül yardımıyla bir miktar heparin içeren SF verildi, dokuların kurumasını engellemek amacıyla bölge SF ile ıslatılmış gazlı bezle kapatıldı. Deney boyunca basınç transdüserinin bağlı olduğu data kayıt sistemi (BIOPAC MP35) aracılığı ile OAB kaydedildi.



**Resim 6.** Karotid arter kateterizasyonu (a) Sol karotid arterin belirlenmesi (b) Karotid arterin iki ucunun sıkıştırılarak kan akımının askıya alınması (c) PE-50 kanülün karotid artere yerleştirilmesi. PE-50: Polietilen-50

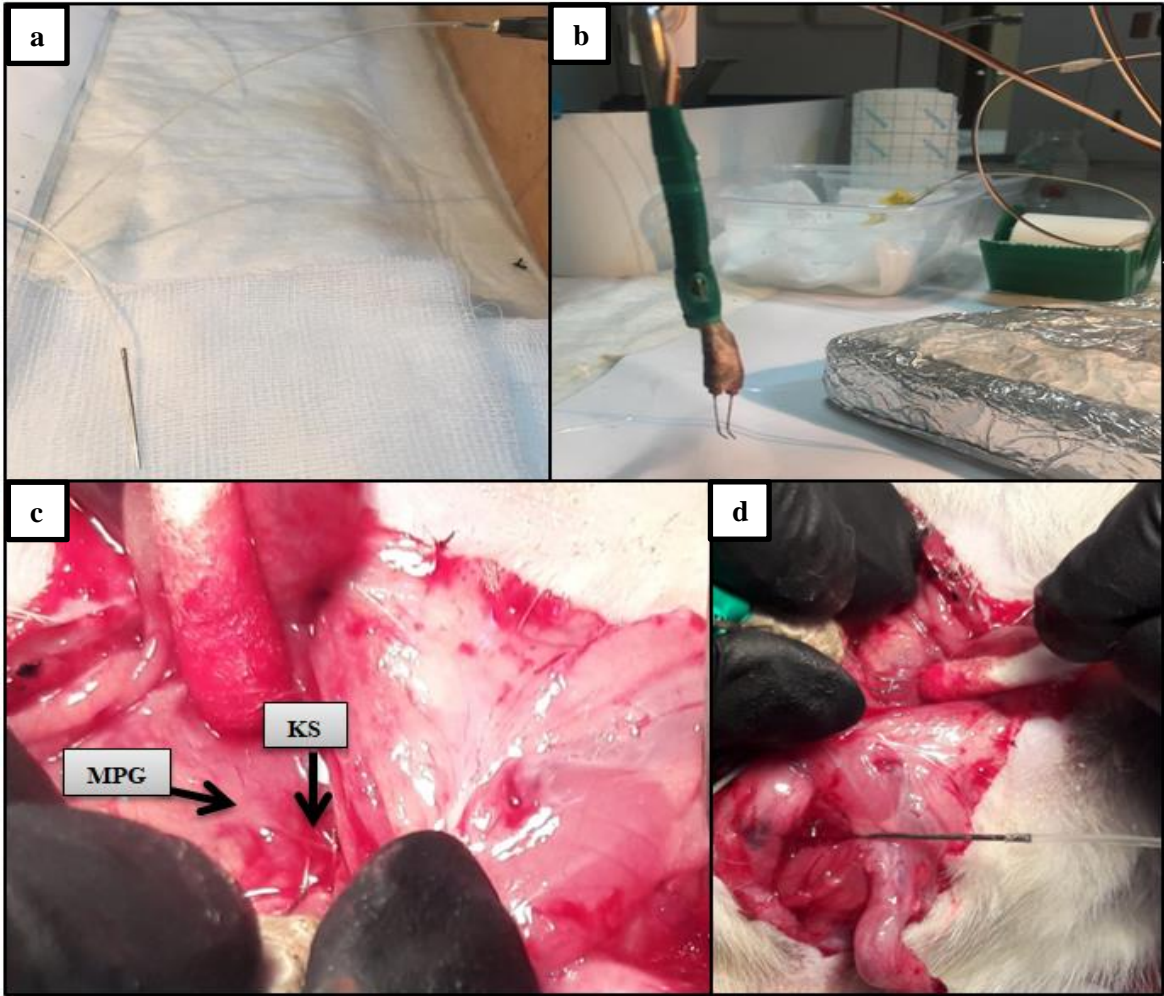
### 3.2.7. İKB Ölçümü

İKB ölçümü için, BKSH cerrahi işleminin uygulandığı alandan abdominal kesi yardımıyla önce deri ardından kas tabakası dikkatlice açıldı. Testisler üst abdomene çekildi ve mesane bir klemp yardımıyla sabitlendi. Daha önce izole edilmiş olan sağ KS tekrar belirlendi. Ardından alt abdominal bir kesiyle devam edilerek penis dokusu yağ ve deri tabakalarından ayrılarak serbestleştirildi (Resim 7a). Tunika albuginea tabakasını saran kas dokusu ince bir damar makasıyla dikkatli bir şekilde kesilerek sağ korpus kavernozum belirlendi (Resim 7b), ucunda 27-G iğne bulunan ve diğer ucu basınç transdüserine bağlı 250 U/mL heparin içeren PE-50 kanül sağ korpusa yerleştirilerek ucunun serbestleşmesi sağlandı (Resim 7c,d). Kanül yardımıyla heparin içeren SF verilerek kanülün doğru yerleşimi değerlendirildi ve sızdırma kontrolü yapıldı. Deney boyunca basınç transdüserinin bağlı olduğu data kayıt sistemi (BIOPAC MP35) aracılığı ile İKB kaydedildi.



**Resim 7.** İnttrakavernöz kanül yerleştirilmesi (a) Penisin serbestleştirilmesi (b) Sağ tunika albuginea tabakasına polietilen kanülün yerleştirilmesi (c) Sağ korpus kavernozum dokusundan İKB'nin ölçülmesi. İKB: İnttrakavernöz basınç

İntrakavernöz kanülün (Resim 8a) yerleştirilmesinin ardından KS belirlenip (Resim 8c) bir pens yardımıyla platin elektrodların (Grass Technologies, NC0578021, Resim 8b) üzerine yerleştirildi (Resim 8d) ve elektriksel uyarılmasına bağlı oluşan İKB değişiklikleri, uygulanan farklı elektriksel uyarı parametrelerine (MAY ST95PT stimülatör; 16 Hz, 1 ms duration, 1-4 ve 8 voltlarda 1 dk'lık stimülasyon) cevap olarak değerlendirildi. Her bir elektriksel stimülasyon uygulaması arasında 5'er dk'lık dinlenme süreleri bırakıldı. Sonuçlar maksimum İKB (mİKB)/OAB ve İKB eğri altında kalan alan/OAB (total İKB/OAB) şeklinde ifade edildi.



**Resim 8.** İKB ölçümü (a) İKB ölçümünde kullanılan kanül (b) Bipolar platin elektrod (c) Sıçan prostat bezinin dorsolateralinde bulunan MPG ve KS (d) Bipolar platin elektrod aracılı KS'nin elektriksel stimülasyonu. İKB: İntrakavernöz basınç, MPG: Majör pelvik gangliyon, KS: Kavernoöz sinir

Fonksiyonel ölçümlerin bitiminden sonra hızlıca yaklaşık 30-60 sn içinde MPG dokusu, 1-3 dk arasında ise penis dokuları çıkarıldı ve sıvı azotta hızlıca dondurularak -80 °C’de moleküler analizler için saklandı.

### **3.2.8. Doku Homojenatlarının Hazırlanması**

Deney hayvanlarında izole edilen MPG ve penis dokularına buz üzerinde yaklaşık 10 mg/mL oranında TNTE lizis tamponunda (her bir penis dokusu 1 mL TNTE lizis tamponu içinde) mekanik olarak cerrahi makasla parçalandıktan sonra buz dolu bir kap içerisinde homojenizatör ile 20 rpm (x1000) devirde 5 kere 10’ar sn; her bir sıçanın sağ ve sol MPG dokuları birleştirilerek TNTE lizis tamponunda (Her bir örnek 100 µl TNTE lizis tamponu içinde) mekanik olarak cerrahi makasla parçalandıktan sonra buz dolu bir kap içerisinde sonikatör ile 20 kHz frekansta 3 kere 10’ar sn homojenize edildi. Doku homojenatları 10000xg +4 °C’de 30 dk santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı. Penis dokusuna ait süpernatantlar buz üzerinde hızlıca alikotlanarak 3’er adet 0.1 mL/ 0.5 mL eppendorf ve 2’şer adet 0.3 mL/ 1.5 mL eppendorflarda; MPG dokusuna ait süpernatantlar ise 3’er adet 0.03 mL/ 0.5 mL eppendorflara alınarak deney gününe kadar -80 °C’de saklandı.

### **3.2.9. Total Protein Tayini**

Elde edilen homojenatlardaki total protein konsantrasyonu bikinkoninik asit (BCA) protein ölçüm kiti kullanılarak saptandı. Kitte bulunan ve konsantrasyonu bilinen BSA (2 mg/mL)’dan gerekli dilüsyonlar yapılarak 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL’lik standartlar hazırlandı. Kitte bulunan Solüsyon A ve Solüsyon B 50:1 oranında karıştırıldı ve çalışma çözeltisi hazırlandı. Her bir örnek ve standart çözeltiden 25 µL çift tekrar olacak şekilde mikropate kuyucuklarına eklendi. Ardından tüm örneklerle hızlıca 200 µL çalışma çözeltisi eklendi. Mikropata kapatılarak 30 sn banko üzerinde hafif bir şekilde karıştırıldı ve su banyosunda 37 °C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Bu süreç sonunda gerçekleşen renk değişimi 562 nm dalga boyunda mikropata okuyucuda ölçüldü ve elde edilen BSA standart çözeltileri absorbanslarından yararlanılarak Microsoft Excel aracılığıyla konsantrasyon-absorbans grafiği çizilip grafik denklemi hesaplandı. Örneklerin absorbansları grafik denklemine yerleştirilerek her bir örnek için total protein miktarı mg/mL cinsinden hesaplandı.

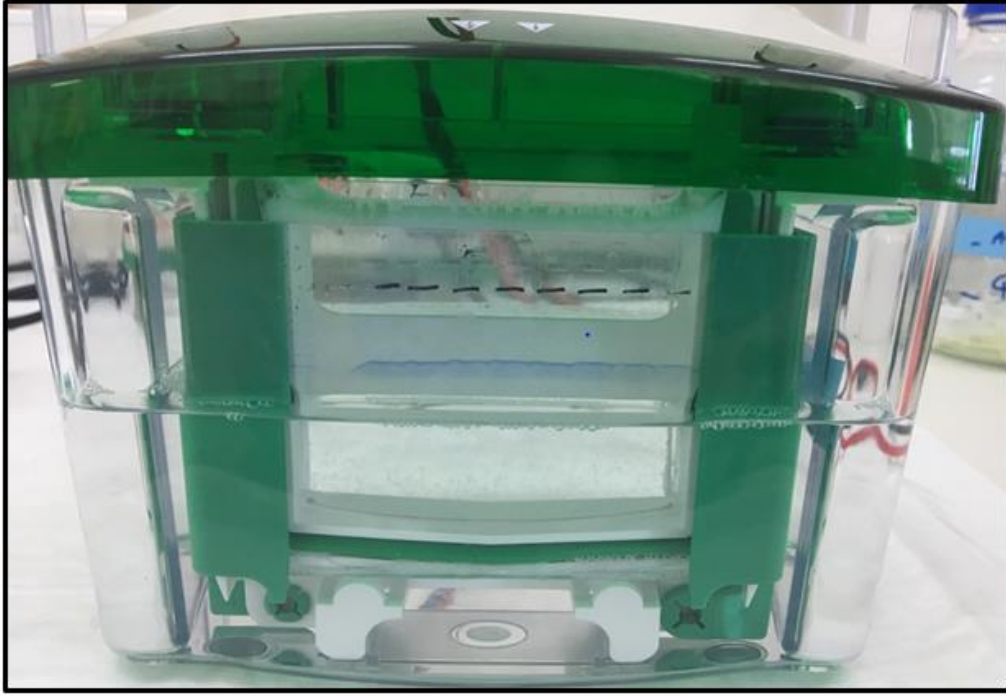
### 3.2.10. Western Blotlama

#### 3.2.10.1. Jelin Hazırlanması

Deiyonize su ve alkolle temizlenen kısa ve uzun camlar kısa cam öne gelecek şekilde jel standına yerleştirildi. Jel içeriğinin hazırlanması için *TGX Stain-Free FastCast %10 Acrylamide Kit* kullanıldı. Kitin içinden çıkan *resolver A* ve *B* solüsyonlarında 3'er mL alınıp karıştırıldı. Bu karışıma %10'luk APS çözeltisinden 30 µL ve TEMED'ten 3 µL eklenerek ayırma jeli hazırlandı. Hazırlanan karışım kısa camın 1 cm altına kadar hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Ardından hızlıca yükleme jelinin hazırlanması için kit içinde bulunan *stacker A* ve *B* solüsyonlarından 1'er mL alınıp içine %10'luk APS'den 10 µL ve TEMED'ten 2 µL eklendi. Hazırlanan yükleme jeli kısa camın üzerine çıkacak şekilde döküldü ve hızlıca camlar arasına her bir kuyucuğu 50 µL hacimli 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi. Jeller polimerizasyonun sağlanması için 30 dk jel standında bırakıldı. Hazırlanan jeller aynı gün kullanıldı.

#### 3.2.10.2. Doku Örneklerinin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

-80 °C'den çıkarılan ve buz üzerinde muhafaza edilen doku örneklerinden penis ve MPG için her bir kuyuya eşit miktarda protein yüklemesi yapacak şekilde (total protein miktarı 30 µg) alınan süpernatant üzerine 5X yükleme tamponundan eklendi ve son hacim 30 µL olacak şekilde 1X'e deiyonize su ile seyreltildi. Örnekler hızla karıştırılıp 2-3 sn santrifüjlendi ve kaynar su banyosunda 5 dk kaynatıldı. Ardından örnekler vortekste karıştırıldı ve 2-3 sn santrifüjlendi. Bu şekilde tüm örneklerde protein denatürasyonu işlemi yapılarak yüklemeye hazır hale getirildi. Hazırlanan örnekler aynı gün elektroforez işlemi için kullanıldı.



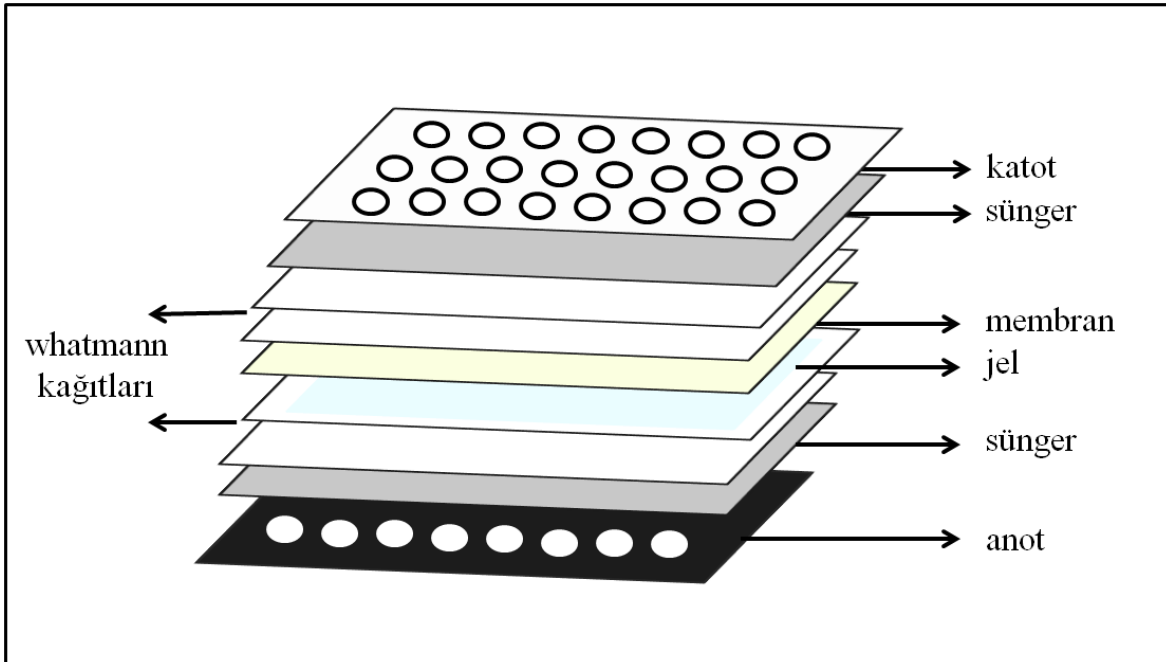
**Resim 9.** Protein elektroforezi görüntüsü

Hazırlanan jeller deiyonize suyla yıkandı. Kuyucukların görünür hale gelmesi için dipleri asetat kalemiyle işaretlendi. Jeller uzun camlar dışa bakacak şekilde elektroforez için kullanılacak tanka yerleştirildi. Jeller arasına yürütme tamponu dökülerek sızdırma kontrolü yapıldı. Sızdırma olmadığından emin olunduktan sonra tank uygun seviyeye kadar yürütme tamponuyla dolduruldu. Yüklemeye hazır hale getirmek için jeller üzerindeki taraklar çıkarıldı. Her jelin ilk kuyucuğunda 3  $\mu$ L molekül ağırlık markörü olacak şekilde 30  $\mu$ L'lik örnekler kuyucuklara yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra örnekler 80 V'da en son 25 kDa'lık molekül ağırlık çizgisi görülene kadar yaklaşık 100-120 dk oda sıcaklığında yürütüldü (Resim 9).

### **3.2.10.3. Transfer İşlemi**

Jeldeki örneklerin transferi için PVDF membranlar kullanılarak ıslak transfer metodu uygulandı. Elektroforezde yürütme işleminin tamamlanmasını takiben jeller tanktan çıkarılarak deiyonize suyla yıkandı ve ince bir spatula yardımıyla camlar birbirinden dikkatlice ayrıldı. Jel üzerindeki kuyucuklar ve protein bulunmayan kısımlar hızlıca temiz bir jilet yardımıyla kesildi ve jel soğuk transfer tamponuyla doldurulmuş bir kaba aktarılarak dengelenmeye bırakıldı. Diğer yandan jele uygun boyutlarda PVDF membran kesildi ve 5-10 dk saf metanolde orbital çalkalayıcıda çalkalamaya bırakıldı.

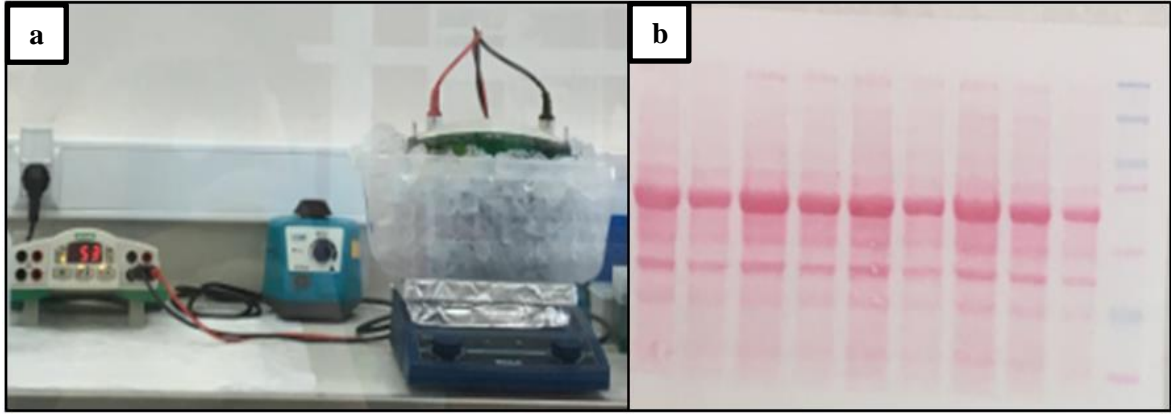
Metanolden çıkarılan membran soğuk transfer tamponu içerisine yerleştirilip 15 dk 60 rpm devirde orbital çalkalayıcıda doyunluğa ulaşması sağlandı. İçinde soğuk transfer tamponu bulunan başka bir kaba transfer kaseti yerleştirildi. Kasetin siyah yüzeyine sırasıyla bir adet transfer tamponuyla ıslatılmış destek süngeri ve bir adet whatmann kağıdı yerleştirildi. Bir adet ıslak whatmann kağıdı yardımıyla jel alınarak kaset üstündeki whatmann kağıdının üzerine dikkatlice yerleştirildikten sonra doyunluğa ulaşmış olan PVDF membran 45°'lik açıyla hava kabarcığı kalmayacak şekilde jelin üzerine yerleştirildi ve bir roll yardımıyla kalan hava kabarcıkları çıkarıldı. Ardından transfer tamponuyla ıslatılmış iki adet whatmann kağıdı ve destek süngeriyle kaset içeriği tamamlandı (Şekil 3).



Şekil 3. Islak transfer kaset içeriği

Kaset kaydırılmadan dikkatli bir şekilde kapatıldı. Hazırlanan kaset transfer tamponuyla doldurulmuş olan tankın içerisine siyah yüzeyi anota (siyah), şeffaf yüzeyi katota (kırmızı) gelecek şekilde yerleştirildi. Tank iç ortam sıcaklığının dengelenebilmesi için temiz bir buz aküsü ve bir balık yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde buz dolu bir kap içerisinde 80V'da 2 saat transfer işlemine bırakıldı (Resim 10a).





**Resim 10.** Transfer işlemi (a) Islak transfer işlemi görüntüsü (b) Transfer işleminden sonra Ponceau S ile boyanan PVDF membran görüntüsü. PVDF: Polivinilidin florür

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membran dikkati bir şekilde kasetten çıkarıldı ve Ponceau S çözeltisiyle boyanarak transfer işleminin doğruluğu ve yeterliliği teyit edildi (Resim 10b). Daha sonra membran deiyonize suyla yıkanarak Ponceau S çözeltisinden arındırıldı ve saf metanolle 5-10 sn yıkandıktan sonra 15 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Membran kurduktan sonra az miktarda saf metanolle ıslatıldı ve 3 kere 10'ar dk TBST çözeltisiyle yıkandı.

#### **3.2.10.4. Membranın Bloklanması**

Membranlar yıkama işleminden sonra bloklama işlemi için *SuperBlock™ Blocking Buffer in PBS* veya %5'lik BSA çözeltisi ile oda sıcaklığında 60 rpm devirde orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübasyona bırakıldı. Böylece spesifik olmayan bağlanma noktaları bloklama işlemiyle kapatıldı.

#### **3.2.10.5. Primer Antikorla İnkübasyon**

Bloklamayı takiben Tablo 7'de belirtilen şekilde, primer antikorlarla 20 rpm devirde orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

**Tablo 7.** Primer antikor seyreltme oranları, çözeltileri, inkübasyon sıcaklığı ve süreleri

<b>Antikor</b>	<b>Seyreltme oranı</b>	<b>Seyreltme çözeltisi</b>	<b>İnkübasyon sıcaklığı ve süresi</b>
Anti-EAAT-1 antikor	1:1000	%5'lik BSA çözeltisi	+4 °C'de gece boyu > 12 saat
Anti-EAAT-2 antikor	1:1000	%5'lik BSA çözeltisi	+4 °C'de gece boyu > 12 saat
Anti-GAP-43 antikor	1:1500	%5'lik BSA çözeltisi	+4 °C'de gece boyu > 12 saat
Anti-PKC $\beta$ II antikor	1:1000	SuperBlock™ Blocking Buffer in PBS	+4 °C'de gece boyu > 12 saat
Anti-p-PKC $\beta$ II (Ser 660) antikor	1:1000	%5'lik BSA çözeltisi	+4 °C'de gece boyu > 12 saat
Anti- $\beta$ aktin antikor	1:3000	%5'lik süt tozu çözeltisi	Oda sıcaklığında 1 saat

### 3.2.10.6. Sekonder Antikorla İnkübasyon

Primer antikor inkübasyonunu takiben membran üç kere 10'ar dk TBST ile oda sıcaklığında 60 rpm devirde orbital çalkalayıcıda çalkalanarak yıkandı. Yıkamanın ardından membranlar Tablo 8'de belirtilen şekilde, primer antikorlara uygun sekonder antikorlarla 20 rpm devirde orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

**Tablo 8.** Sekonder antikor seyreltme oranları, çözeltileri, inkübasyon sıcaklığı ve süreleri

<b>Antikor</b>	<b>Seyreltme Oranı</b>	<b>Seyreltme çözeltisi</b>	<b>İnkübasyon sıcaklığı ve süresi</b>
Anti-mouse IgG HRP-linked antikor	1:8000	%5'lik süt tozu çözeltisi	Oda sıcaklığında 1 saat
Anti-rabbit IgG HRP-linked antikor	1:8000	%5'lik süt tozu çözeltisi	Oda sıcaklığında 1 saat

### 3.2.10.7. “Stripping” İşlemi

Hedef antikor anti- $\beta$  aktin antikoruyla yakın molekül ağırlıklarına sahip olduğunda  $\beta$  aktini saptayabilmek için “stripping” işlemi uygulandı. ECL ile görüntülenen membran üç kere 10’ar dk TBST ile oda sıcaklığında 60 rpm devirde orbital çalkalayıcıda çalkalanarak yıkandı. Yıkamanın ardından membran “stripping” çözeltisiyle su banyosunda 50 °C’de 30 dk muamele edildi. “Stripping” işlemi takiben membran tekrar üç kere 10’ar dk TBST ile 60 rpm devirde orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında yıkandı. Yıkamanın ardından membran %5’lik BSA içerisinde 1 saat oda sıcaklığında 60 rpm devirde orbital çalkalayıcıda bloklandı ve  $\beta$  aktini saptamak için primer ve sekonder antikorla inkübasyon işlemleri tekrarlandı.

### 3.2.10.8. Görüntüleme

Sekonder antikor inkübasyonu tamamlandıktan sonra membran üç kere 10’ar dk TBST ile oda sıcaklığında 60 rpm devirde orbital çalkalayıcıda çalkalanarak yıkandı. Yıkamanın ardından membran temiz bir pens yardımıyla bir kaba alındı ve 0.8 mL ECL solüsyonu (ECL solüsyonlarının 1:1 oranındaki karışımı) ile pipet yardımıyla yıkandı.



**Resim 11.** ChemiDoc™ MP görüntüleme cihazı

Görüntülemeye hazır olan membran ChemiDoc™ MP görüntüleme cihazıyla (Resim 11) uygun protokoller kullanılarak görüntülendi. Hedeflenen antikorun görüntüleme işlemi tamamlandıktan sonra membran tekrar üç kere 10'ar dk TBST ile oda sıcaklığında 60 rpm devirde orbital çalkalayıcıda çalkalanarak yıkandı. Yıkamanın ardından membran kurummasını engellemek için az miktarda TBST ile ıslatılarak streç filme sarılarak saklandı.

### **3.3. İstatistiksel Analiz**

Fonksiyonel analizler için sonuçlar (İKB, OAB) aritmetik ortalama değer  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler GraphPad Prism (Sürüm 5.01; Graphpad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü ANOVA' nın ardından Newman-Keuls post testi kullanılarak karşılaştırıldı. Western blot sonuçları görüntü analiz programı kullanarak (Image J, NIH, ABD) hesaplandı ve bant yoğunluğu aynı blot üstündeki  $\beta$  aktin bant yoğunluğu ile karşılaştırılarak oranlanıp kontrol grubuna göre normalize edildi. Gruplar arasındaki farklar student t-testi kullanılarak karşılaştırıldı. Deney gruplarındaki hayvan sayısı (0.8-0.85 güç ve 0.05 oranında tip 1 hata olasılığına göre) n= 5-6 /grup olarak belirlendi. İstatistiksel anlamlılık  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  ve  $p<0.001$  olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

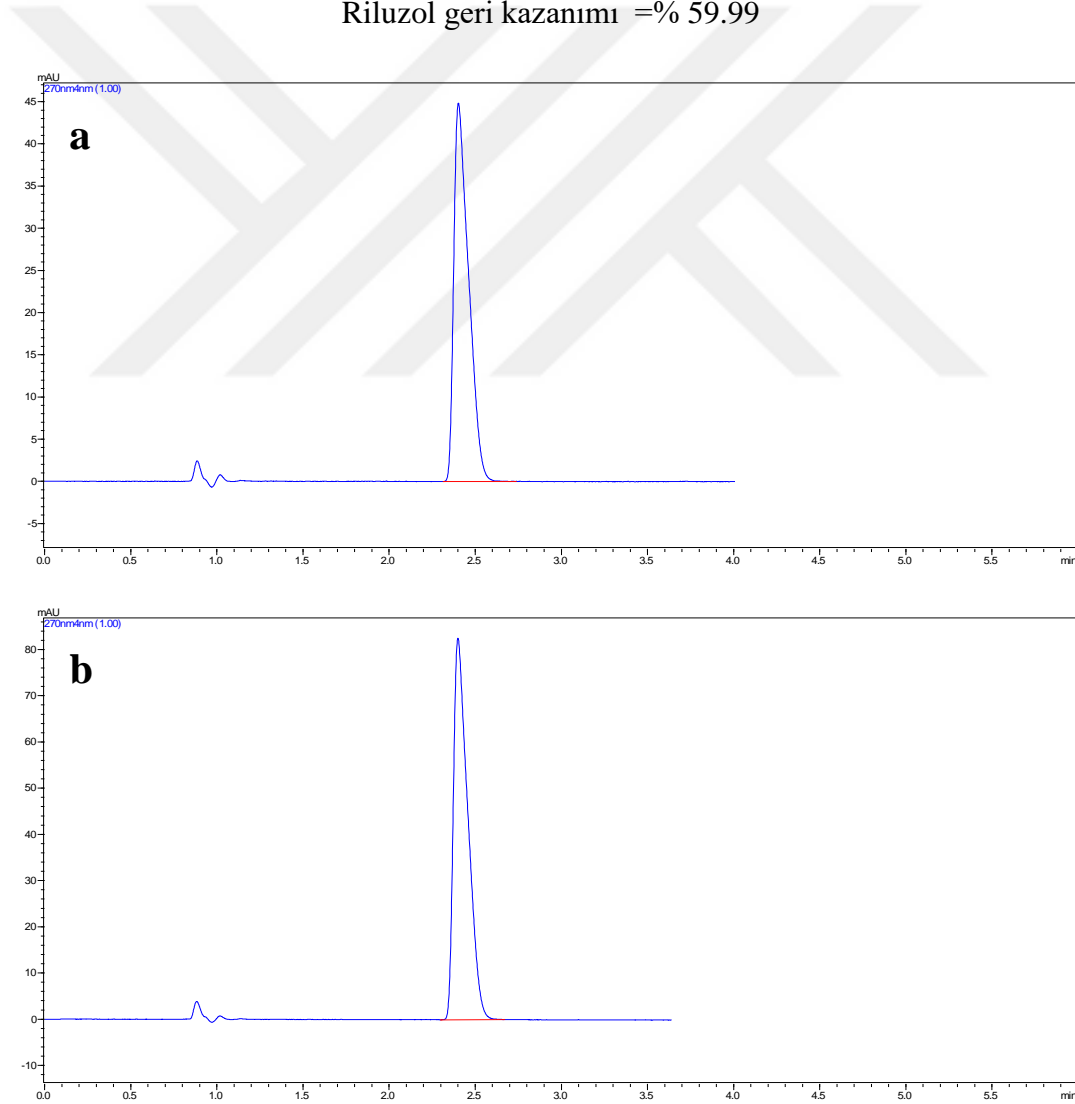
## 4. BULGULAR

### 4.1. Rilutek® 50 mg Film Tabletten Riluzol Geri Kazanımı

Yapılan YBSK geri kazanım analizi sonucunda riluzol piki 2-3 dk arasında saptanırken analiz sırasında herhangi bir kirlilik veya yardımcı madde piki gözlenmemiştir. Bu sonuç tablet içindeki diğer yardımcı maddelerin seçilen çözücüde çözülmediğini göstermektedir. Numunenin ve standart çözeltinin sisteme enjeksiyonu ile elde edilen pik alanları ortalamaları sırasıyla  $330.342 \pm 3.7$  ve  $550.646 \pm 8.2$  olarak tespit edildi (Şekil 4) ve “Eşitlik 1” kullanılarak geri kazanım miktarı yüzde cinsinden hesaplandı.

$$\text{Riluzol geri kazanım yüzdesi} = (330.342/550.646) \times 100$$

Riluzol geri kazanımı = % 59.99



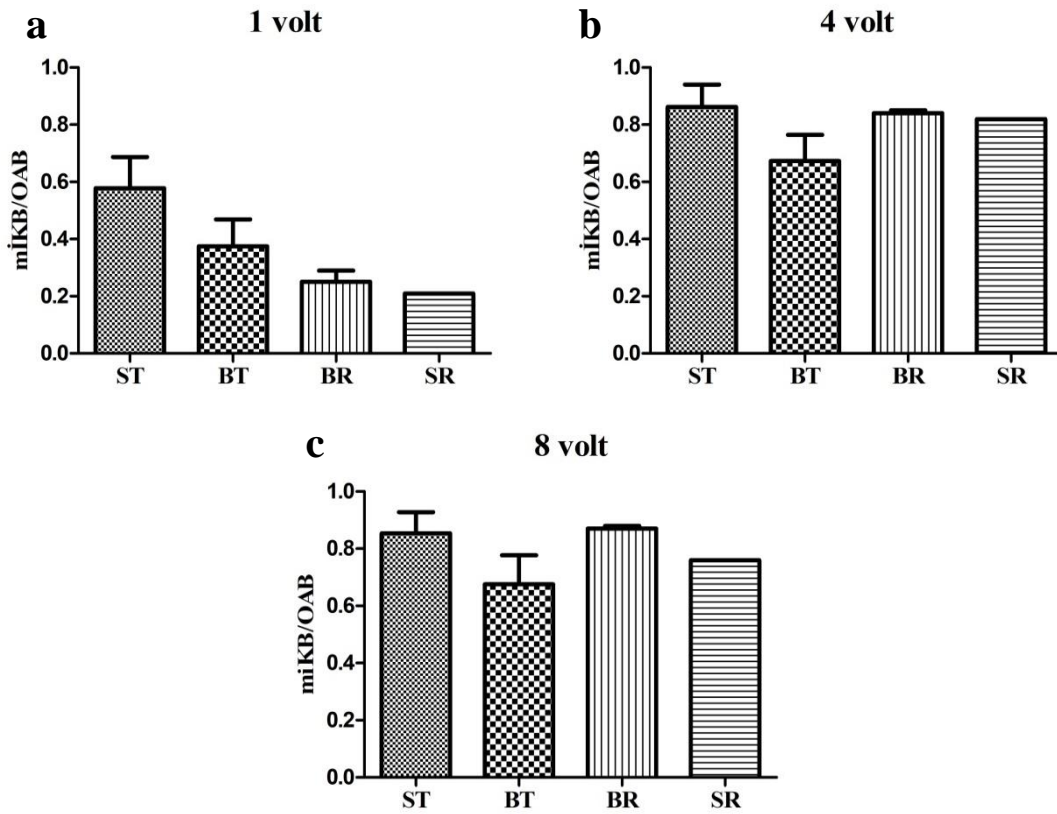
**Şekil 4.** Rilutek® 50 mg film tabletten riluzol geri kazanım analizi. (a) Standart riluzol çözeltisine ait YBSK kromatogramı. (b) Tabletten elde edilen çözeltiliye ait YBSK kromatogramı. YBSK: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

Yukarıda hesaplanan geri kazanım miktarı dikkate alınarak 8 mg/kg riluzol dozu için gerekli derişimde çözelti hazırlandı ve 15 günlük tedavi protokolleri için deney hayvanlarına i.p. yolla uygulandı.

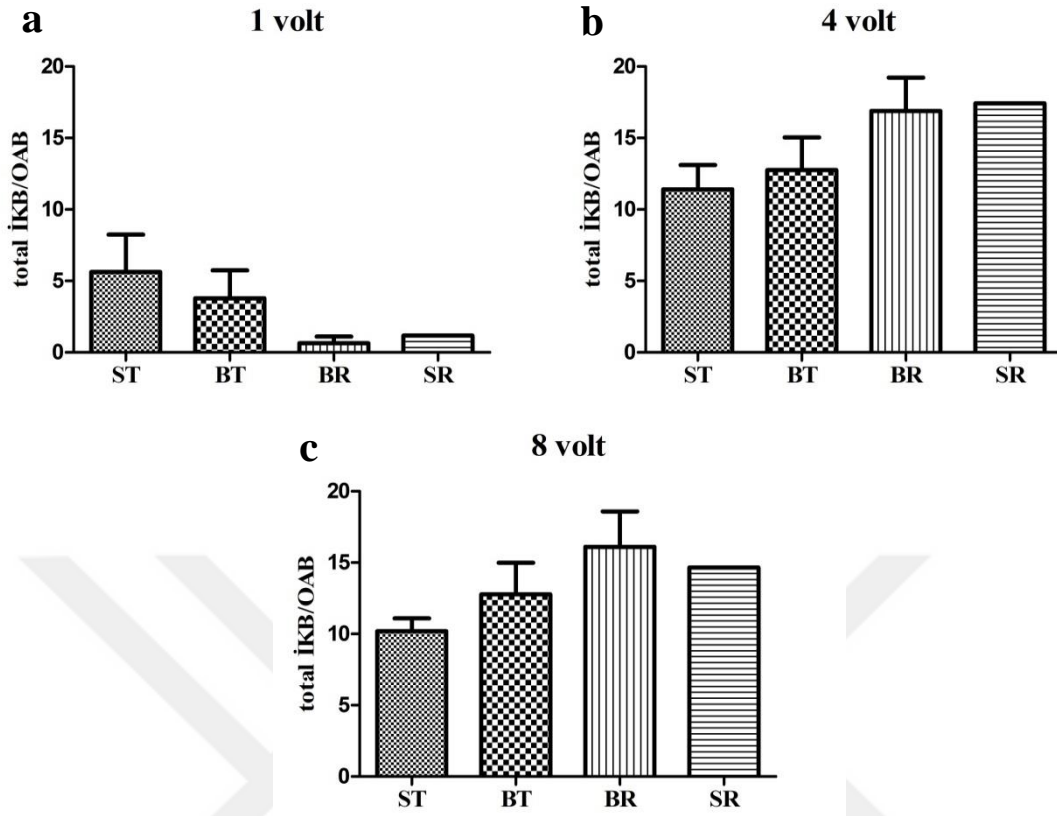
#### 4.2. *In vivo* Eretil Fonksiyonun Değerlendirilmesi

##### 4.2.1. BKSH'yi Takiben Gelişen ED'de 1 Günlük Riluzol Tedavisinin Etkisi

BKSH uygulamasından 1 gün sonra sham (ST) ve hasar (BT) gruplarında mİKİB/OAB ve total İKB/OAB oranları arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu nedenle riluzol tedavisinin etkisi değerlendirilememiştir (Şekil 5, 6).



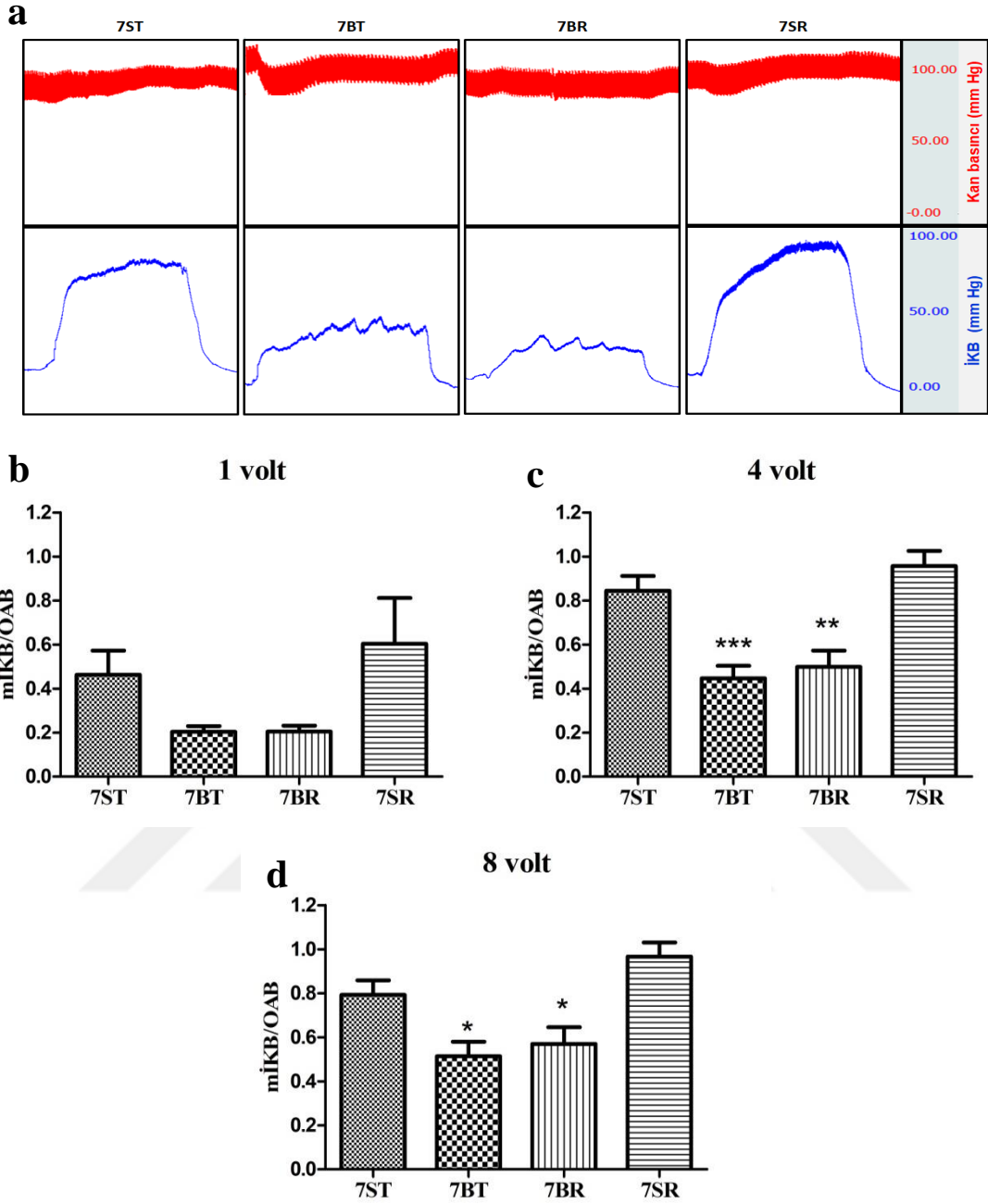
**Şekil 5.** 1 günlük BKSH ve riluzol tedavisini takiben eretil fonksiyon göstergesi mİKİB/OAB oranlarının değerlendirilmesi. (a) BKSH'yi takiben KS'nin 1 voltluk stimölasyonunun mİKİB/OAB oranına etkisi. (b) BKSH'yi takiben KS'nin 4 voltluk stimölasyonunun mİKİB/OAB oranına etkisi. (c) BKSH'yi takiben KS'nin 8 voltluk stimölasyonunun mİKİB/OAB oranına etkisi (n=1-7). BKSH: Bilateral kavernöz sinir hasarı, mİKİB: Maksimum intrakavernöz basınç, OAB: Ortalama arteriyel basınç, ST: Sham+taşıyıcı, BT: BKSH+taşıyıcı, BR: BKSH+riluzol, SR: Sham+riluzol



**Şekil 6.** 1 günlük BKSH ve riluzol tedavisini takiben erektil fonksiyon göstergesi total İKB/OAB oranlarının değerlendirilmesi. (a) BKSH'yi takiben KS'nin 1 voltluk stimülasyonunun total İKB/OAB oranına etkisi. (b) BKSH'yi takiben KS'nin 4 voltluk stimülasyonunun total İKB/OAB oranına etkisi. (c) BKSH'yi takiben KS'nin 8 voltluk stimülasyonunun total İKB/OAB oranına etkisi (n=1-7). BKSH: Bilateral kavernoöz sinir hasarı, KS: Kavernoöz sinir, İKB: İntrakavernoöz basınç, OAB: Ortalama arteriyel basınç, ST: Sham+taşıyıcı, BT: BKSH+taşıyıcı, BR: BKSH+riluzol, SR: Sham+riluzol

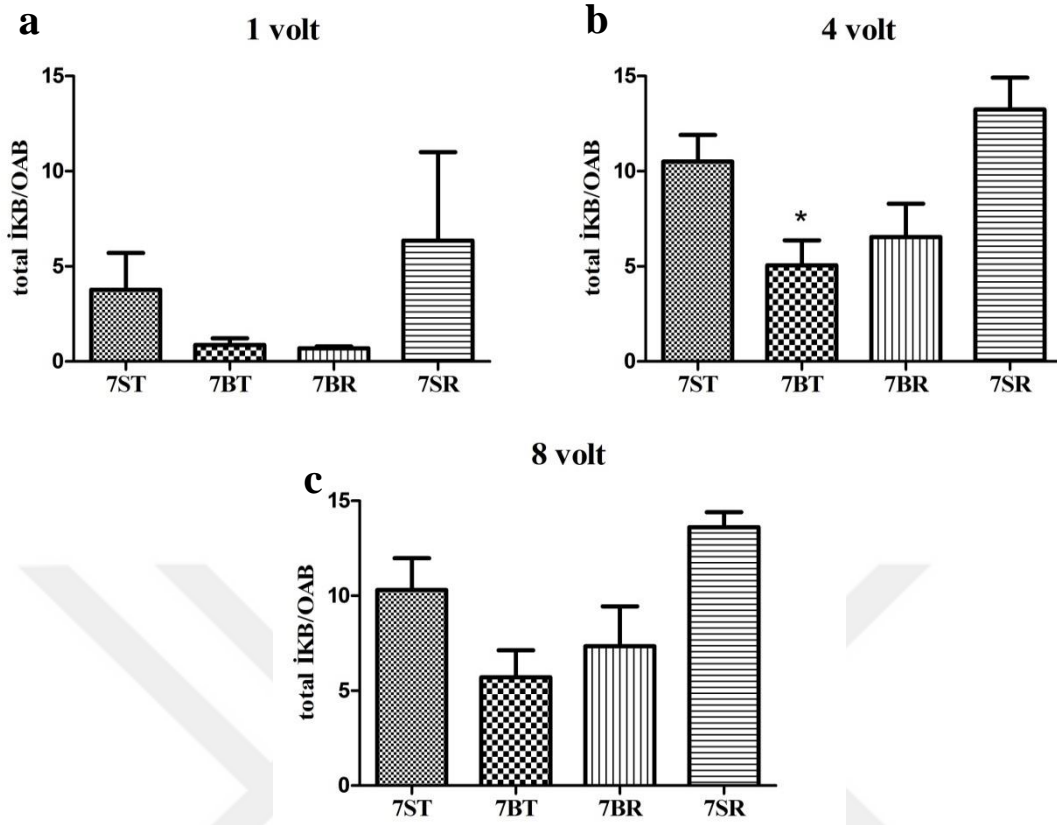
#### 4.2.2. BKSH'yi Takiben Gelişen ED'de 7 Günlük Riluzol Tedavisinin Etkisi

BKSH ardından 7 gün sonra gerçekleştirilen fonksiyonel ölçümlerde sham (7ST) ve BKSH grupları (7BT) karşılaştırıldığında 4 ve 8 voltluk elektriksel stimülasyonlar sonucu mİKB/OAB oranında anlamlı bir azalma saptanmıştır (Şekil 7c,d,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ). İki gruba ait total İKB/OAB oranları karşılaştırıldığında ise yalnızca 4 voltluk stimülasyon sonucu anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 8b,  $p < 0.05$ ). Ancak 7 gün süreyle 8 mg/kg riluzol tedavisi sinir hasarıyla azalan mİKB/OAB ve total İKB/OAB oranlarında denenen üç volta da anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır (Şekil 7, 8).



**Şekil 7.** 7 günlük BKSŞ ve riluzol tedavisini takiben erektil fonksiyon göstergesi mİKİB/OAB oranlarının değerlendirilmesi. (a) 7 günlük BKSŞ'yi takiben taşıyıcı ve riluzol tedavisi almış sıçanların KS'lerine uygulanan 4 voltluk stimölasyon sonucu kan basıncı ve İKB'larındaki değışimi gösteren trace örneği. (b) 7 günlük BKSŞ'yi takiben KS'nin 1 voltluk stimölasyonunun mİKİB/OAB oranına etkisi. (c) 7 günlük BKSŞ'yi takiben KS'nin 4 voltluk stimölasyonunun mİKİB/OAB oranına etkisi. (d) 7 günlük BKSŞ'yi takiben KS'nin 8 voltluk stimölasyonunun mİKİB/OAB oranına etkisi (n=3-7). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 7ST grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkları ifade etmektedir. BKSŞ: Bilateral kavernöz sinir hasarı, KS: Kavernöz sinir, mİKİB: Maksimum intrakavernöz basınç, OAB: Ortalama arteriyel basınç, 7ST: 7 günlük sham+taşıyıcı, 7BT: 7 günlük BKSŞ+taşıyıcı, 7BR: 7 günlük BKSŞ+riluzol, 7SR: 7 günlük sham+riluzol





**Şekil 8.** 7 günlük BKSH ve riluzol tedavisini takiben erektil fonksiyon göstergesi total İKB/OAB oranlarının değerlendirilmesi. (a) 7 günlük BKSH'yi takiben KS'nin 1 voltluk stimülasyonunun total İKB/OAB oranına etkisi. (b) 7 günlük BKSH'yi takiben KS'nin 4 voltluk stimülasyonunun total İKB/OAB oranına etkisi. (c) 7 günlük BKSH'yi takiben KS'nin 8 voltluk stimülasyonunun total İKB/OAB oranına etkisi (n=3-7). \*p<0.05 7ST grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir. BKSH: Bilateral kavernoöz sinir hasarı, KS: Kavernoöz sinir, İKB: İntrakavernoöz basınç, OAB: Ortalama arteriyel basınç, 7ST: 7 günlük sham+taşıyıcı, 7BT: 7 günlük BKSH+taşıyıcı, 7BR: 7 günlük BKSH+riluzol, 7SR: 7 günlük sham+riluzol

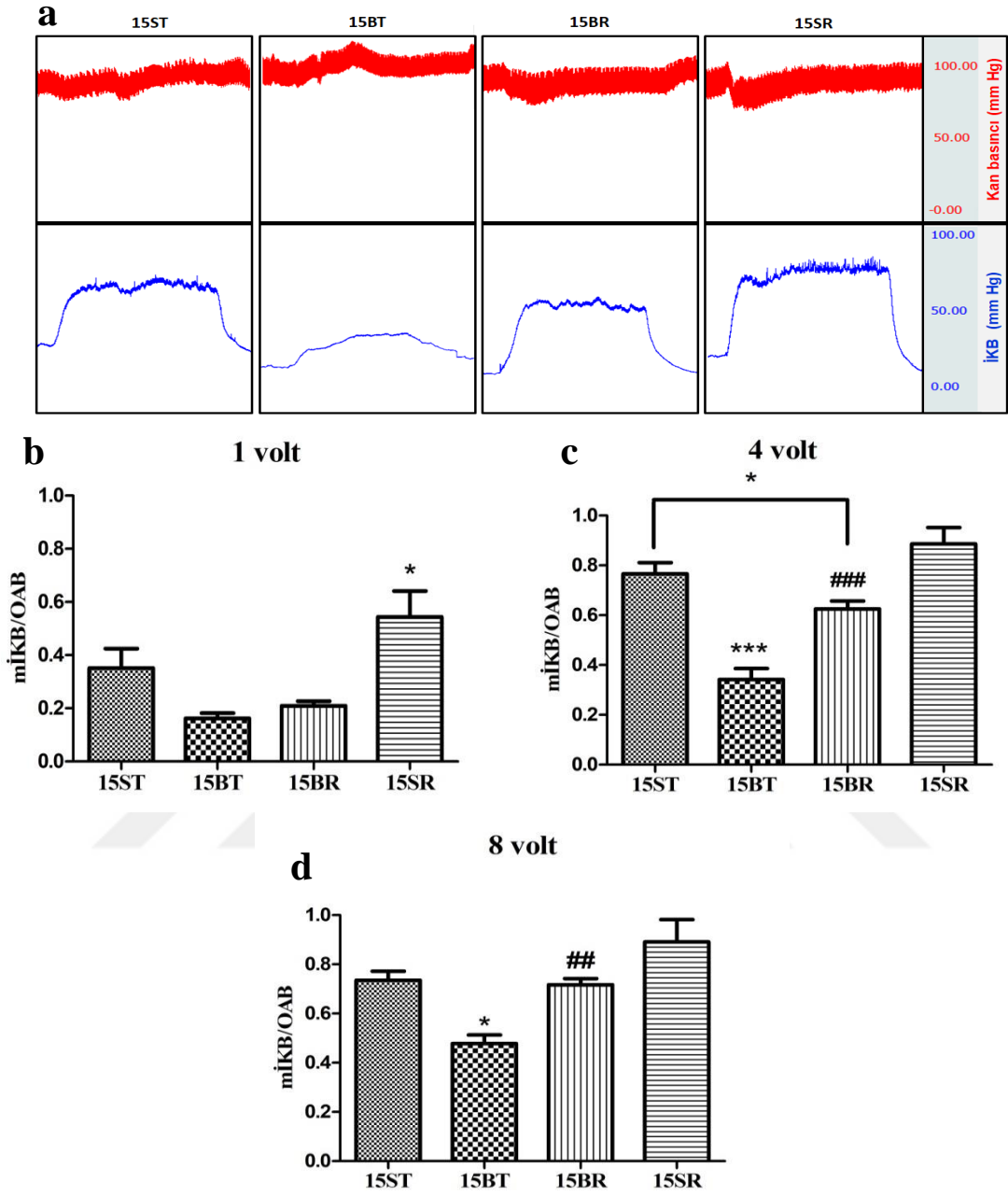
#### 4.2.3. BKSH'yi Takiben Gelişen ED'de 15 Günlük Riluzol Tedavisinin Etkisi

BKSH ardından 15 gün sonra gerçekleştirilen fonksiyonel ölçümlerde sham (15ST) ve BKSH (15BT) grupları karşılaştırıldığında 4 ve 8 voltluk elektriksel stimülasyonlar sonucu mİKB/OAB oranında anlamlı azalma saptanmıştır (Şekil 9; p<0.001, p<0.05). İki gruba ait total İKB/OAB oranları karşılaştırıldığında ise yalnızca 4 voltluk stimülasyon sonucu anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 10, p<0.001). 15 gün süreyle riluzol tedavisi sinir hasarıyla azalan mİKB/OAB oranında 4 ve 8 voltluk stimülasyonlarda anlamlı artışa neden olmuştur (Şekil 9c,d; p<0.001, p<0.01). 4 voltluk stimülasyon sonucu riluzol tedavisi alan hasar grubunun mİKB/OAB oranının sham grubuna kıyasla anlamlı düşük

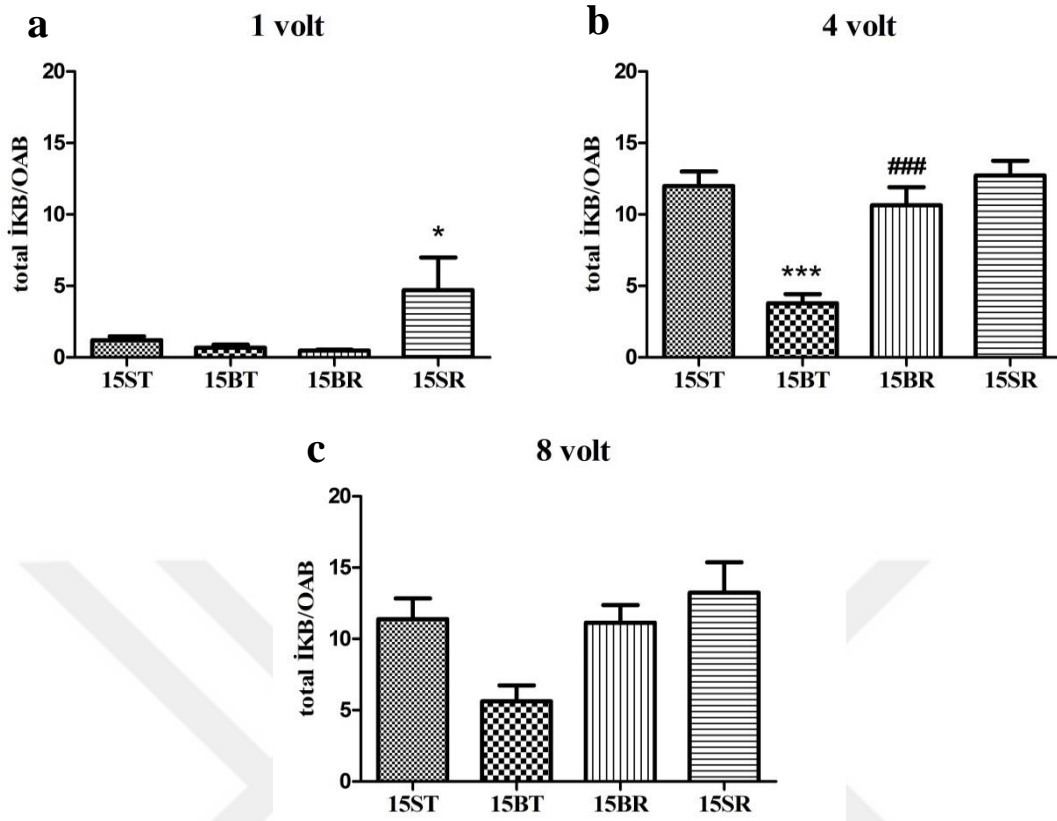
olduğu saptanmıştır (şekil 9c;  $p<0.05$ ). Ancak 8 voltluk stimölasyon sonucu riluzol tedavisi alan hasar grubunun mİKB/OAB oranının sham grubuna benzer olduğu görölmektedir (şekil 9d).

Total İKB/OAB oranları değerlendirildiğinde ise yalnızca 4 voltluk stimölasyonda riluzol tedavisi anlamlı bir iyileşme sağlamıştır (şekil 10b;  $p<0.001$ ). Ancak düşük voltlarda KS stimölasyonunun riluzol tedavisi alan sham grubunda mİKB/OAB ve total İKB/OAB oranlarında anlamlı artışa neden olduğu görölmektedir (şekil 9b, 10a;  $p<0.05$ ).





**Şekil 9.** 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisini takiben erektil fonksiyon göstergesi mIKB/OAB oranlarının değerlendirilmesi. (a) 15 günlük BKSH'yi takiben taşıyıcı ve riluzol tedavisi almış sıçanların KS'lerine uygulanan 4 voltluk stimülasyon sonucu kan basıncı ve İKB'larındaki değişimi gösteren trace örneği. (b) 15 günlük BKSH'yi takiben KS'nin 1 voltluk stimülasyonunun mIKB/OAB oranına etkisi. (c) 15 günlük BKSH'yi takiben KS'nin 4 voltluk stimülasyonunun mIKB/OAB oranına etkisi. (d) 15 günlük BKSH'yi takiben KS'nin 8 voltluk stimülasyonunun mIKB/OAB oranına etkisi (n=5-6). \*\*\* p<0.001, \*p<0.05 15ST grubu ile karşılaştırıldığında; ###p<0.001, ##p<0.01 15BT grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkları ifade etmektedir. BKSH: Bilateral kavernöz sinir hasarı, KS: Kavernöz sinir, mIKB: Maksimum intrakavernöz basınç, OAB: Ortalama arteriyel basınç, 15ST: 15 günlük sham+taşıyıcı, 15BT: 15 günlük BKSH+taşıyıcı, 15BR: 15 günlük BKSH+riluzol, 15SR: 15 günlük sham+riluzol



**Şekil 10.** 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisini takiben erektil fonksiyonun göstergesi total İKB/OAB oranlarının değerlendirilmesi. (a) 15 günlük BKSH'yi takiben KS'nin 1 voltluk stimülasyonunun total İKB/OAB oranına etkisi. (b) 15 günlük BKSH'yi takiben KS'nin 4 voltluk stimülasyonunun total İKB/OAB oranına etkisi. (c) 15 günlük BKSH'yi takiben KS'nin 8 voltluk stimülasyonunun total İKB/OAB oranına etkisi (n=5-6). \*\*\* p<0.001, \*p<0.05 15ST grubu ile karşılaştırıldığında; ###p<0.001 15BT grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkları ifade etmektedir. BKSH: Bilateral kavernoöz sinir hasarı, KS: Kavernoöz sinir, İKB: İntrakavernoöz basınç, OAB: Ortalama arteriyel basınç, 15ST: 15 günlük sham+taşıyıcı, 15BT: 15 günlük BKSH+taşıyıcı, 15BR: 15 günlük BKSH+riluzol, 15SR: 15 günlük sham+riluzol

#### 4.2.4. Spontan Ereksiyon (SE) Oluşumuna Riluzolün Etkisi

BKSH sonrası 7 ve 15 günlük riluzol tedavisi sonrası *in vivo* erektil fonksiyonun değerlendirilmesi için yapılan ölçümler sırasında beklenmedik bir şekilde riluzol uygulamasının deney hayvanlarının bazılarında SE gelişimine neden olduğu görülmüştür. Deney protokolünde 7 ve 15 günlük riluzol tedavisi alan toplam 21 deney hayvanından 10 tanesinde (%47.62) spontan ereksiyon gözlemlendi. SE gözlenen hayvanların 3'ü sham 3'ü hasar grubu olmak üzere 6'sı (%60) 7 günlük riluzol tedavisi alırken, 2'si sham 2'si hasar

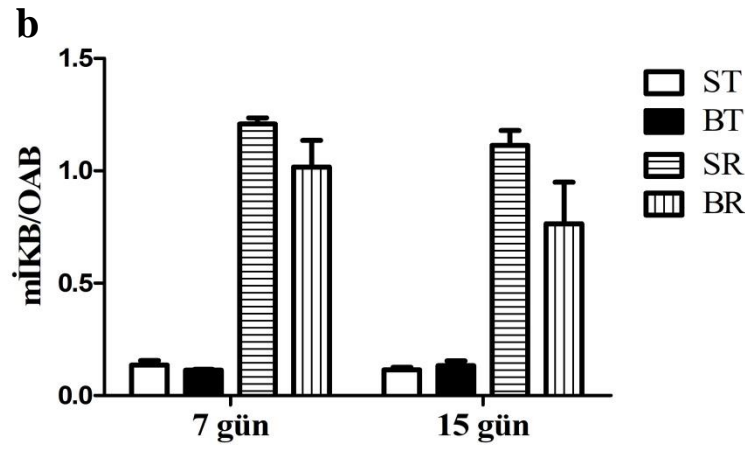
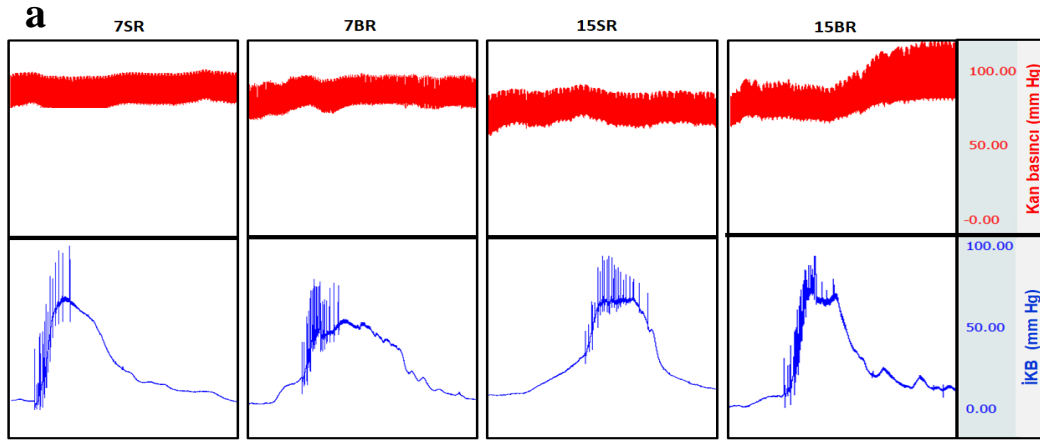
grubu olmak üzere 4'ü (%40) 15 günlük riluzol tedavisi almaktadır. Detaylar Tablo 9'da gösterilmiştir.

Yapılan değerlendirmede SE gözlenen total deney hayvanı sayılarının sham ve hasar gruplarında eşit olduğu görülmüştür. Bazı deney hayvanlarında elektriksel stimülasyon olmadan veya elektriksel stimülasyon olduktan sonra birden fazla SE oluştuğu gözlenmiştir.

SE'lere ait mİKB/OAB oranları incelendiğinde sham gruplarında oranların oldukça yüksek olduğu görülürken hasar gruplarında mİKB/OAB oranlarının kısmen daha düşük olduğu görülmüştür (Şekil 11 a,b).

**Tablo 9.** Tedavi gruplarına göre SE sayıları ve yüzdeleri. SE: Spontan ereksiyon

Tedavi grupları	Stimülasyon olmadan görülen SE sayısı		1 voltluk stimülasyon sonrası görülen SE sayısı		4 voltluk stimülasyon sonrası görülen SE sayısı		8 voltluk stimülasyon sonrası görülen SE sayısı	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>7SR</b>	3	50	2	33.33	1	16.67	0	0
<b>7BR</b>	0	0	0	0	2	66.67	1	33.33
<b>15SR</b>	2	66.67	0	0	1	33.33	0	0
<b>15BR</b>	1	50	0	0	1	50	0	0

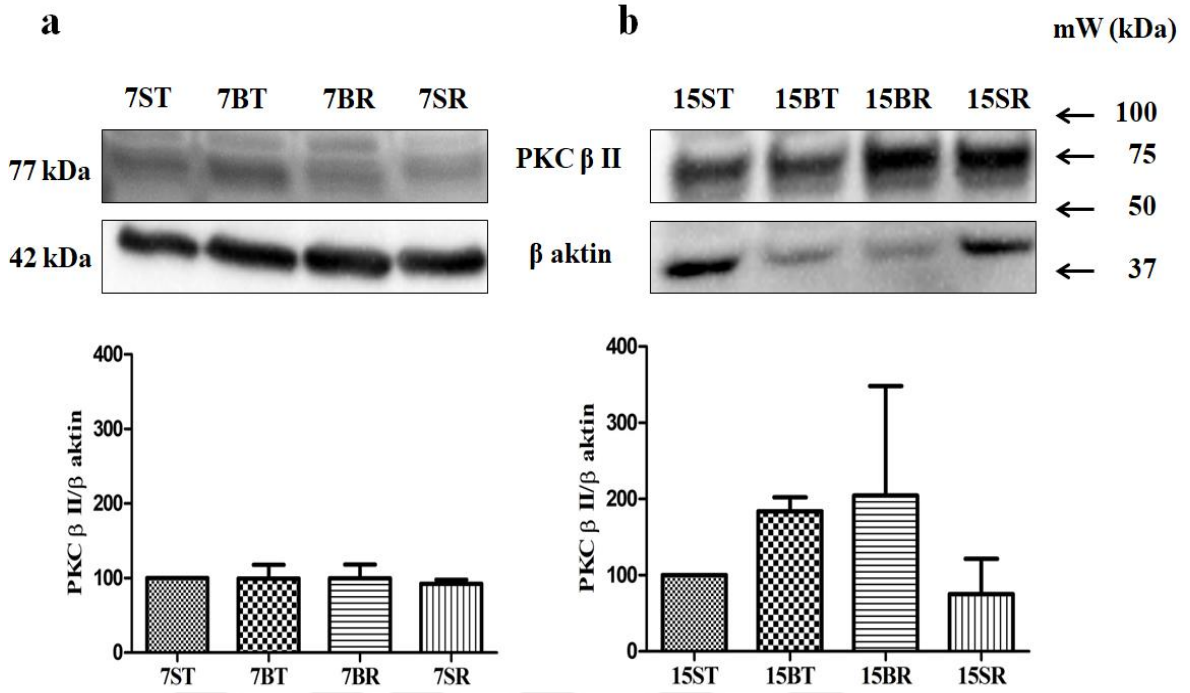


**Şekil 11.** 7 ve 15 günlük riluzol tedavisini takiben görülen SE'nin değerlendirilmesi. **(a)** SE'leri gösteren trace örnekleri. **(b)** 7 ve 15 günlük riluzol tedavisinin neden olduğu SE'lere ait mIKB/OAB oranları. SE: Spontan ereksiyon, mIKB: maksimum intrakavernöz basınç, OAB: Ortalama arteriyel basınç, ST: Sham+taşıyıcı, BT: BKSH+taşıyıcı, SR: Sham+riluzol, BR: BKSH+riluzol

### 4.3. Western Blot Sonuçları

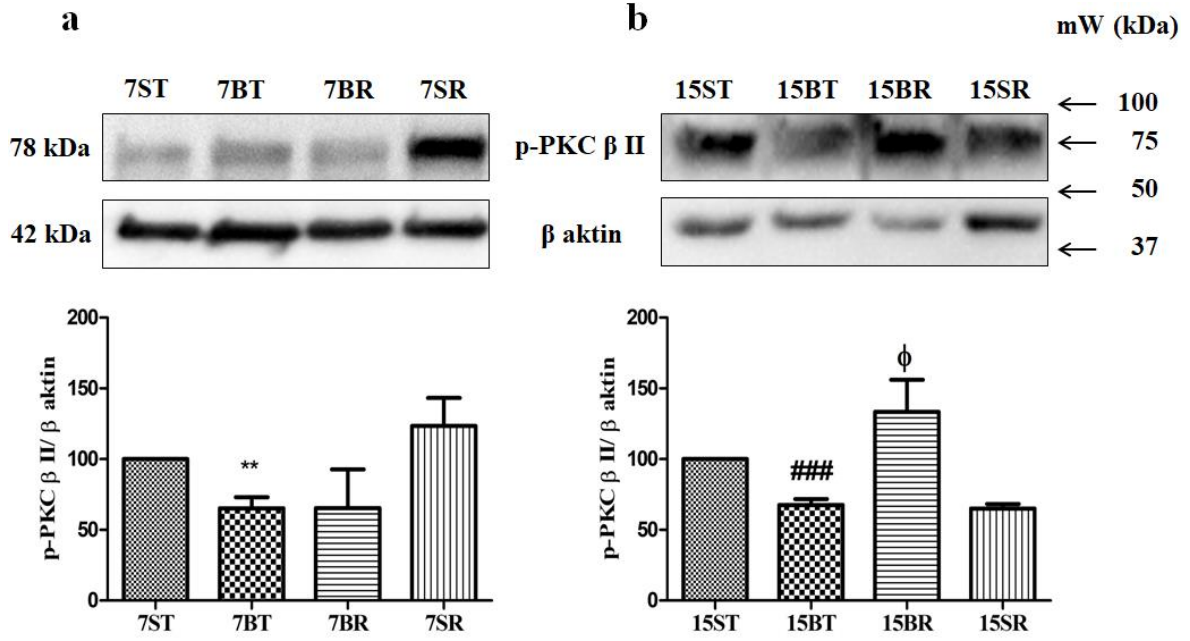
#### 4.3.1. Penis Dokusunda BKSH'yi Takiben Riluzol Tedavisinin PKC $\beta$ II ve p-PKC $\beta$ II Ekspresyonu Üzerine Etkisi

BKSH ardından 7 ve 15 gün boyunca riluzol ve taşıyıcı tedavisi alan sıçanların penis dokularındaki PKC  $\beta$  II ve p-PKC  $\beta$  II protein ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre penis dokusunda 7 veya 15 günlük sinir hasarında veya riluzol tedavisiyle PKC  $\beta$  II ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 12).



**Şekil 12.** 7 ve 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin penis PKC β II ekspresyon düzeyine etkisi. **(a)** 7 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin penis PKC β II ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=4). **(b)** 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin penis PKC β II ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=2). BKSH: Bilateral kavernöz sinir hasarı, PKC β II: Protein kinaz C β II, 7ST: 7 günlük sham+taşıyıcı, 7BT: 7 günlük BKSH+taşıyıcı, 7BR: 7 günlük BKSH+riluzol, 7SR: 7 günlük sham+riluzol, 15ST: 15 günlük sham+taşıyıcı, 15BT: 15 günlük BKSH+taşıyıcı, 15BR: 15 günlük BKSH+riluzol, 15SR: 15 günlük sham+riluzol

Penis dokusunda p-PKC β II ekspresyonları değerlendirildiğinde 7 ve 15 günlük BKSH'yi takiben p-PKC β II ekspresyonları anlamlı olarak azalırken 7 günlük riluzol tedavisi bu azalmayı önleyememiştir. Ancak 15 günlük riluzol tedavisi sinir hasarı sonucu gelişen p-PKC β II ekspresyonundaki azalmayı önlemiştir (Şekil 13).

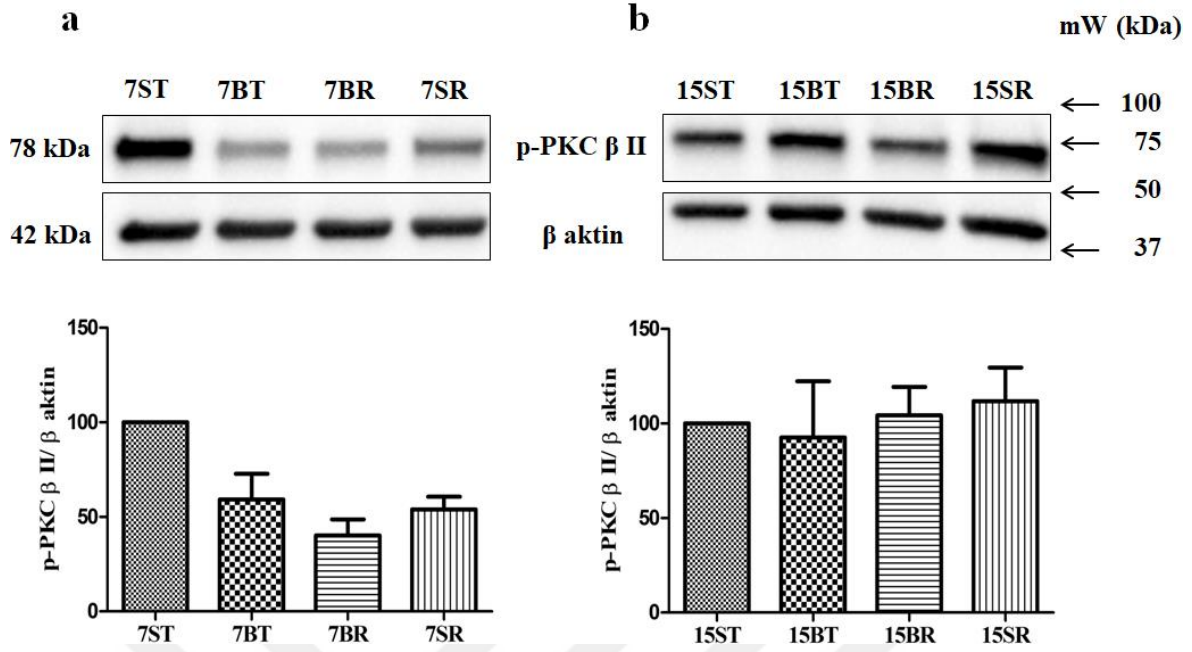


**Şekil 13.** 7 ve 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin penis p-PKC β II ekspresyon düzeyine etkisi. **(a)** 7 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin penis p-PKC β II ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=3-4). **(b)** 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin penis p-PKC β II ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=3-4). \*\* p<0.01 7ST grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir. ### p<0.001 15ST grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir. φ p<0.05 15BT grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir. BKSH: Bilateral kavernoöz sinir hasarı, p-PKC β II: Fosfo-protein kinaz C β II, 7ST: 7 günlük sham+taşıyıcı, 7BT: 7 günlük BKSH+taşıyıcı, 7BR: 7 günlük BKSH+riluzol, 7SR: 7 günlük sham+riluzol, 15ST: 15 günlük sham+taşıyıcı, 15BT: 15 günlük BKSH+taşıyıcı, 15BR: 15 günlük BKSH+riluzol, 15SR: 15 günlük sham+riluzol

#### 4.3.2. MPG dokusunda BKSH'yi Takiben Riluzol Tedavisinin p-PKC β II Ekspresyonu Üzerine Etkisi

BKSH ardından 7 ve 15 gün boyunca riluzol ve taşıyıcı tedavisi alan sıçanların MPG dokularındaki p-PKC β II protein ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler incelenmiştir. MPG dokusunda 7 veya 15 günlük sinir hasarında veya riluzol tedavisiyle p-PKC β II ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 14).

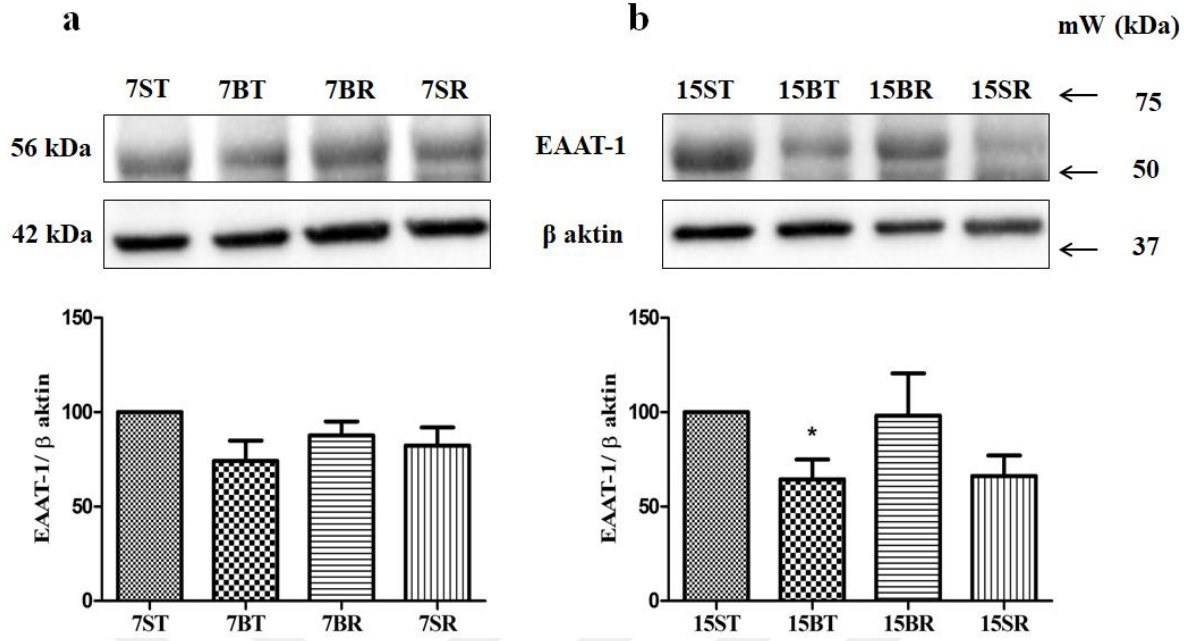




**Şekil 14.** 7 ve 15 günlük BKSŞ ve riluzol tedavisinin MPG p-PKC β II ekspresyon düzeyine etkisi **(a)** 7 günlük BKSŞ ve riluzol tedavisinin MPG p-PKC β II ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=3) **(b)** 15 günlük BKSŞ ve riluzol tedavisinin MPG p-PKC β II ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=3). BKSŞ: Bilateral kavernöz sinir hasarı, MPG: Majör pelvik gangliyon, p-PKC β II: Fosfo-protein kinaz C β II, 7ST: 7 günlük sham+taşıyıcı, 7BT: 7 günlük BKSŞ+taşıyıcı, 7BR: 7 günlük BKSŞ+riluzol, 7SR: 7 günlük sham+riluzol, 15ST: 15 günlük sham+taşıyıcı, 15BT: 15 günlük BKSŞ+taşıyıcı, 15BR: 15 günlük BKSŞ+riluzol, 15SR: 15 günlük sham+riluzol

#### 4.3.3. MPG Dokusunda BKSŞ'yi Takiben Riluzol Tedavisinin EAAT-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

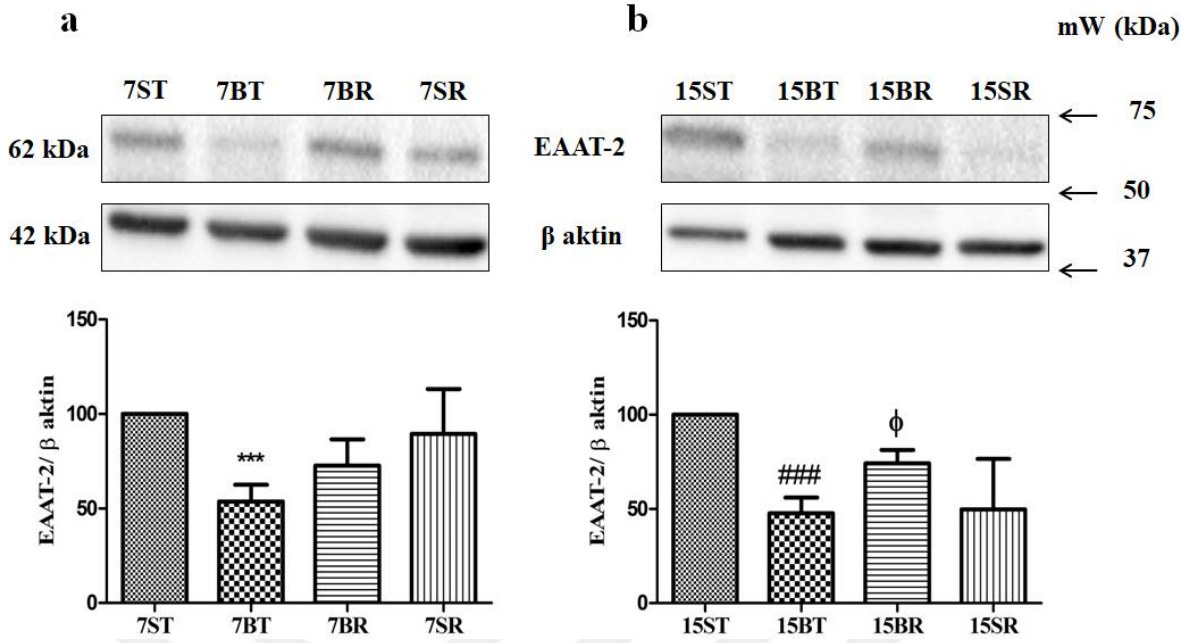
BKSŞ ardından 7 ve 15 gün boyunca riluzol ve taşıyıcı tedavisi alan sıçanların MPG dokularındaki EAAT-1 protein ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler incelenmiştir. MPG dokusunda 7 günlük sinir hasarını takiben EAAT-1 ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik görülmezken, 15 günlük sinir hasarını takiben EAAT-1 düzeyinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Ancak riluzol tedavisi EAAT-1 ekspresyonundaki azalmayı önleyememiştir (Şekil 15).



**Şekil 15.** 7 ve 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin MPG EAAT-1 ekspresyon düzeyine etkisi. **(a)** 7 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin MPG EAAT-1 ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=4). **(b)** 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin MPG EAAT-1 ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=4-5). \*p<0.05 15ST grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir. BKSH: Bilateral kavernoöz sinir hasarı, MPG: Majör pelvik gangliyon, EAAT-1: Eksitator aminoasid taşıyıcısı-1, 7ST: 7 günlük sham+taşıyıcı, 7BT: 7 günlük BKSH+taşıyıcı, 7BR: 7 günlük BKSH+riluzol, 7SR: 7 günlük sham+riluzol, 15ST: 15 günlük sham+taşıyıcı, 15BT: 15 günlük BKSH+taşıyıcı, 15BR: 15 günlük BKSH+riluzol, 15SR: 15 günlük sham+riluzol

#### 4.3.4. MPG Dokusunda BKSH'yi Takiben Riluzol Tedavisinin EAAT-2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

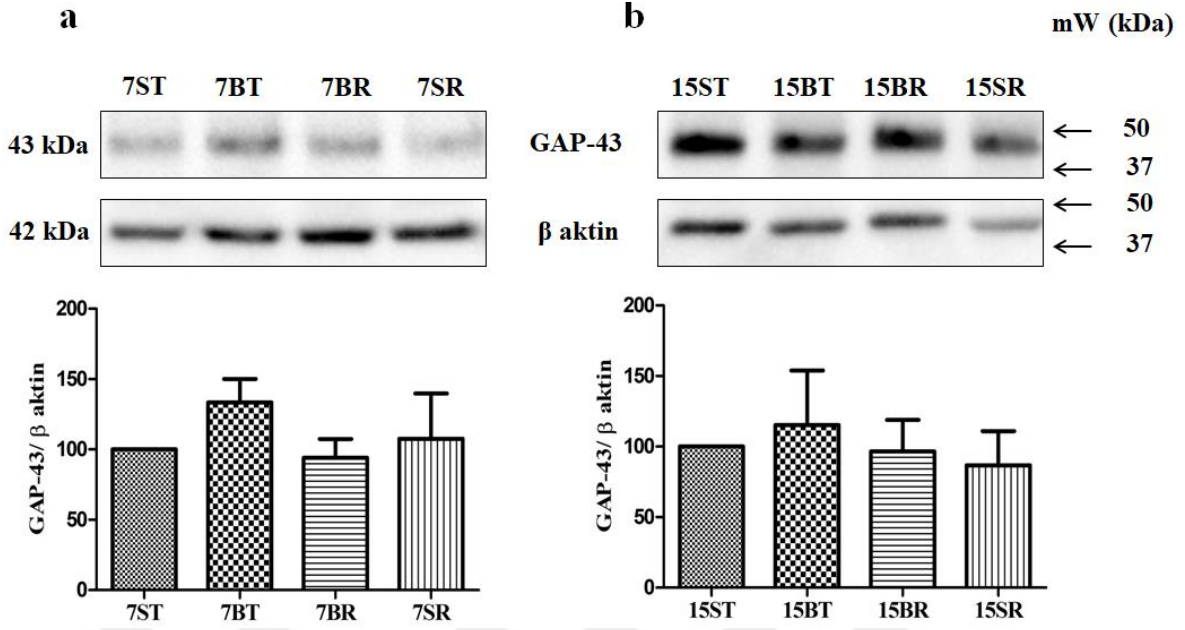
BKSH ardından 7 ve 15 gün boyunca riluzol ve taşıyıcı tedavisi alan sıçanların MPG dokularındaki EAAT-2 protein ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler incelenmiştir. MPG dokusunda 7 ve 15 günlük sinir hasarını takiben EAAT-2 ekspresyonunda anlamlı bir azalma saptanmıştır. 7 günlük riluzol tedavisinin EAAT-2 ekspresyonundaki azalmayı önleyemediği görülürken 15 günlük riluzol tedavisinin EAAT-2 ekspresyonundaki azalmayı önlediği saptanmıştır (Şekil 16).



**Şekil 16.** 7 ve 15 günlük BKSŞ ve riluzol tedavisinin MPG EAAT-2 ekspresyon düzeyine etkisi. **(a)** 7 günlük BKSŞ ve riluzol tedavisinin MPG EAAT-2 ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=4). **(b)** 15 günlük BKSŞ ve riluzol tedavisinin MPG EAAT-2 ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=4-5). \*\*\*p<0.001 7ST grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir. ###p<0.001 15ST grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir. φp<0.05 15BT grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir. BKSŞ: Bilateral kavernoöz sinir hasarı, MPG: Majör pelvik gangliyon, EAAT-2: Eksitator aminoasid taşıyıcısı-2, 7ST: 7 günlük sham+taşıyıcı, 7BT: 7 günlük BKSŞ+taşıyıcı, 7BR: 7 günlük BKSŞ+riluzol, 7SR: 7 günlük sham+riluzol, 15ST: 15 günlük sham+taşıyıcı, 15BT: 15 günlük BKSŞ+taşıyıcı, 15BR: 15 günlük BKSŞ+riluzol, 15SR: 15 günlük sham+riluzol

#### 4.3.5. MPG Dokusunda BKSŞ'yi Takiben Riluzol Tedavisinin GAP-43 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

BKSŞ ardından 7 ve 15 gün boyunca riluzol ve taşıyıcı tedavisi alan sıçanların MPG dokularındaki GAP-43 ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler incelenmiştir. MPG dokusunda 7 veya 15 günlük sinir hasarında GAP-43 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Benzer şekilde BKSŞ sonrası riluzol tedavisi de MPG'de GAP-43 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 17).



**Şekil 17.** 7 ve 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin MPG GAP-43 ekspresyon düzeyine etkisi **(a)** 7 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin MPG GAP-43 ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=4-5) **(b)** 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisinin MPG GAP-43 ekspresyon düzeyi üzerine etkileri (n=4-6). BKSH: Bilateral kavernoöz sinir hasarı, MPG: Majör pelvik gangliyon, GAP-43: Büyüme ilişkili protein-43, 7ST: 7 günlük sham+taşıyıcı, 7BT: 7 günlük BKSH+taşıyıcı, 7BR: 7 günlük BKSH+riluzol, 7SR: 7 günlük sham+riluzol, 15ST: 15 günlük sham+taşıyıcı, 15BT: 15 günlük BKSH+taşıyıcı, 15BR: 15 günlük BKSH+riluzol, 15SR: 15 günlük sham+riluzol

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Prostat bezinin anatomisinden kaynaklı cerrahi bakımdan oldukça avantajlı olması ve geliştirilen sinir koruyucu cerrahi tekniklerin operasyonun başarısını yükseltmesine rağmen, nöronların cerrahi sırasında hasarlanması klinikte radikal prostatektomi sonucu gelişen ED ve mesane disfonksiyonuna neden olmaktadır. Özellikle son yıllarda prostat kanserinin erken yaşlarda saptanabilmesi sebebiyle radikal prostatektomi operasyonu geçiren genç bireylerin yaşam kaliteleri açısından erektil fonksiyon bozukluğu tedavi edilmelidir. Bu nedenle radikal prostatektomi sonucu gelişen ED hem klinik hem de deneysel açıdan üzerinde yoğunlaşılması gereken nörovasküler bir komplikasyondur (7). Günümüzde farklı etiyojik kaynaklı ED tedavisinde cGMP'nin yıkımını önleyerek NO bağımlı yolağın aktivasyonunda rol oynayan PDE 5 enzim inhibitörleri birinci sıra olarak gösterilse de nöronal hasarın hakim olduğu dönem olan radikal prostatektomiye takiben 6 ay içinde kullanımlarına hastaların yalnızca %12-17'si cevap vermektedir (146, 205). Bu nedenle radikal prostatektomi sonucu gelişen ED'nin mekanizmasının incelenmesi ve tedavi yaklaşımı olarak nöroprotektif etkili ilaçların geliştirilmesi son yıllarda yapılan birçok çalışmanın ana hedefini oluşturmaktadır (8). Bu çalışmada radikal prostatektomi sonucu gelişen ED modeli olarak kullanılan sıçan BKSH modelinde, klinikte nöroprotektif etkisi sebebiyle nörodejeneratif koşullarda güvenle kullanılan riluzolün, BKSH sonucu gelişen ED'ye etkisi ve bu etkiye aracılık ettiğini düşündüğümüz PKC- $\beta$  II ve GT yollarıyla ilişkisi fonksiyonel ve moleküler düzeyde incelenmiştir.

Çalışmamızda sıçanlara 1, 7 ve 15 günlük BKSH modeli uygulanmış ve öncelikle fonksiyonel değişiklikler incelenmiştir. 1 günlük BKSH modelinde erektil fonksiyonda anlamlı bir azalma saptanmamışken, 7 ve 15 günlük BKSH modelinde erektil fonksiyon sham grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır. Sonuçlarımızla uyumlu olarak yapılan diğer benzer çalışmalarda da 7 ve 14 günlük KS hasarını takiben erektil fonksiyonun anlamlı olarak azaldığı ve ED geliştiği rapor edilmiştir (5, 154, 206). Çalışmamızda uyguladığımız BKSH modelinde 1 gün sonra erektil fonksiyonda anlamlı bir azalma oluşmamıştır. Literatürde 1 günlük KS hasarı sonucu sıçan ve farelerde ED geliştiğine dair çalışmalar olmasına rağmen, (207, 208) bu farklılığın türler arası değişkenlikten ve uygulanan hasarın şiddeti, kullanılan cerrahi ekipmanın farklılığı, hasar süresi ve hasarı uygulayan araştırmacının bireysel değişkenliği gibi parametrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Riluzol, klinikte ALS tedavisinde 25, 50 ve 100 mg'lık dozları çeşitli kombinasyonlar halinde oral yoldan kullanılan nöroprotektif etkili bir ajandır (196). Riluzolün çeşitli deney modellerinde nöroprotektif etkisinin incelendiği çalışmalarda oral yoldan genellikle 8, 10, 12 mg/kg/gün dozlarında uygulanırken, daha çok tercih edilen i.p. yolla uygulama olduğu görülmüş ve i.p. olarak genellikle 2, 4, 6, 8 ve 16 mg/kg/gün dozları nöroprotektif etkiye aracılık eden tedavi dozları olarak kullanılmıştır (185, 191, 204, 209–212). Literatür araştırmaları doğrultusunda çalışmamızda riluzolün etkinliğini değerlendirmek üzere değişken sürelerde nöroprotektif etkiden sorumlu, deneysel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen etkili dozlarından biri olan 8 mg/kg/gün dozu sıçanlara uygulanmak üzere seçilmiştir. Çalışmamız kapsamında doz optimizasyonu yapılması planlanmamış ve bu konuda herhangi bir ön çalışma yapılmamıştır. Öncelikli hedefimiz, deneysel nöroprotektif etkili dozundan hareketle riluzolün literatürde daha önce incelenmemiş postgangliyonik otonomik nöropati modeli olan BKSH modelindeki nöroprotektif etkinliğini değerlendirmektir.

Bulgularımız 7 günlük BKSH'yi takiben 8 mg/kg/gün i.p. riluzol uygulamasının hasarla azalan erektil fonksiyonu önleyemediğini göstermektedir. Eretil fonksiyonun göstergesi İKB'nin riluzol tedavisi alan grupta taşıyıcı verilen hasar grubuna göre artma trendi olmasına rağmen sham grubuna kıyasla hala anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür. Diğer taraftan BKSH hasarını takiben 15 gün riluzol (8 mg/kg; i.p.) tedavisi erektil fonksiyonu anlamlı olarak iyileştirdi. Medico ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada siyatik sinir hasarı ile indüklenen periferik nöropati modelinde 2, 4 ve 8 mg/kg/gün dozlarında i.p. riluzol tedavisi hasarı takiben 3 gün boyunca uygulanmış ve riluzol tedavisinin doza bağımlı olarak sıçanların motor fonksiyonlarını iyileştirdiği saptanmıştır. (191). Cabaj ve ark.'nın çalışmasında ise yenidoğan sıçanlarda siyatik sinir hasarını takiben 14 gün boyunca 16 mg/kg/gün i.p. riluzol tedavisi uygulanmış ve riluzolün nöroprotektif etki gösterdiğini saptamışlardır (213). Costa ve ark. tavşanlarda yaptığı bir çalışmada ise fasiyal sinir hasarı sonucu 4 hafta boyunca 4 mg/kg/gün i.p. riluzol tedavisinin akson yoğunluğunda üç kata varan artmaya neden olduğunu göstermişlerdir (211). Pintèr ve ark. brakial pleksus yararlanması modeli olan ventral kök avulsiyonu modelinde 3 hafta boyunca i.p. 4 mg/kg (ilk hafta boyunca 4 mg/kg/gün; sonraki 2 hafta gün aşırı 4 mg/kg) riluzol tedavisinin motor nöron ölümlerini azalttığını tespit etmişlerdir (214). Bergerot ve ark. ise benzer deney modelinde 2 hafta boyunca i.p. 4 mg/kg/gün riluzol tedavisinin motor nöronlardaki dentritik uzantıları arttırdığını ve lokomotor

aktiviteyi iyileştirdiğini göstermişlerdir (215). Vorwerk ve ark. da sıçanlarda optik sinir hasarı modelinde 7. gün sonunda glutamat seviyesinin pik yaptığını ve 7'si hasardan önce olmak üzere toplam 14 günlük i.p. 8 mg/kg/gün riluzol tedavisinin glutamat seviyesini anlamlı olarak azalttığını ve bu sayede retinal gangliyon hücrelerinin kaybını engelleyebileceğini öne sürmüşlerdir (204).

Mekanik hasarla indüklenen nöropati modellerin yanı sıra antineoplastik ilaçlarla indüklenen periferik nöropatilerde de riluzol tedavisinin etkinliği incelenmiştir. Poupon ve ark. farelerde oksaliplatinle indüklenen periferik nöropatinin neden olduğu ağrı, duyu ve motor sinirlerdeki yapısal/ elektrofizyolojik değişiklikleri 13.2 mg/kg/güne karşılık gelecek şekilde içme suyuyla uygulanan riluzol tedavisinin önlediğini göstermişlerdir (216). Ayrıca günümüzde kolorektal kanser hastalarında oksaliplatinle indüklenen periferik nöropatide riluzolün terapötik etkinliği faz 2 çalışması kapsamında araştırılmakta ve çalışmanın 2021 yılında tamamlanması beklenmektedir (217). Çalışmamız kapsamında sıçanlarda postgangliyonik otonomik nöropati modeli olan BKSH başarıyla oluşturulmuş ve bu modelde İKB değişiklikleri değerlendirildiğinde 8 mg/kg/gün riluzol tedavisinin fonksiyonel olarak oluşan hasarı iyileştirdiği ilk defa gösterilmiştir. Bu nedenle bulgularımız klinikte farklı etiyolojilerde nöroprotektif etkisi sebebiyle güvenle kullanılan riluzolün ilaç yeniden amaçlandırma ve yeniden konumlandırılması stratejisi kapsamında periferik nöropatilerdeki etkinliği bakımından önemli ön veri niteliğindedir.

Çalışmamızda beklenmedik bir şekilde sham ve hasar gruplarına 7 ve 15 gün boyunca i.p. uygulanan riluzol tedavisinin, deney hayvanlarının önemli kısmında SE oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Sham grubuna ait deney hayvanlarının bir kısmında kayıt süresince birden fazla kez SE olduğu gözlenmiştir. Literatür incelendiğinde riluzolün SE veya priapik aktiviteyle ilişkisini gösteren herhangi bir deneysel çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak FDA verilerine göre Rilutek® 50 mg film tabletin yan etki profilinin incelendiği klinik çalışmada hastalarda ürogenital sistem yan etkileri içerisinde nadiren priapizm olduğu rapor edilmiştir (218). İleri ki çalışmalarımızda, bu gözlemin sistematik olarak incelenmesi, olası mekanizmalarının (PDE enzimleriyle ilişkisi, nNOS-eNOS/NO/cGMP yolağı ilişkisi, RhoA/Rho kinaz sinyalizasyonu ile etkileşimleri, nöronal etkileri) aydınlatılmaya çalışılması planlanmıştır.

Çalışmamız kapsamında BKSH ile indüklenen ED'de riluzolün *in vivo* olarak gösterilen terapötik etkinliğinin moleküler mekanizmaları da aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu amaçla, deney gruplarında *in vivo* erektil fonksiyon ölçümü tamamlandıktan sonra, penis ve MPG dokuları çeşitli protein ekspresyonlarının incelenmesi için uygun şekilde toplanıp western blot analizleri için hazırlanmıştır. Çalışmamızda 7 veya 15 günlük BKSH modelinde penis dokusunda PKC  $\beta$  II ve p-PKC  $\beta$  II protein ekspresyonları incelenmiştir. Penis dokusunda 7 veya 15 günlük BKSH ve BKSH'yi takiben riluzol tedavisinde PKC  $\beta$  II protein ekspresyonlarında anlamlı bir değişiklik saptanmazken p-PKC  $\beta$  II protein ekspresyonlarında 7 ve 15 günlük BKSH ile anlamlı azalma saptanmıştır. Ayrıca 7 günlük riluzol tedavisinin p-PKC  $\beta$  II protein ekspresyonundaki azalmayı önleyemediği görülürken hasarı takiben 15 günlük riluzol tedavisinin p-PKC  $\beta$  II ekspresyonundaki azalmayı önlediği bulunmuştur. Penis dokusunun ardından MPG dokusunda yalnızca peniste ekspresyonu değiştiği görülen p-PKC  $\beta$  II protein ekspresyonunun 7 ve 15 günlük BKSH modelinde sonrası değişimi incelenmiştir. MPG'de 7 veya 15 günlük BKSH sonrası p-PKC  $\beta$  II protein ekspresyonunun anlamlı olarak değişmediği saptanmıştır. MPG'de riluzol tedavisinin etkinliğini değerlendirmek için BKSH sonrası riluzol tedavisi alan gruplarda da p-PKC  $\beta$  II protein ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

PKC proteinleri serin/treonin rezidülerinden fosforile eden bir kinaz enzimidir ve üç şekilde aktive olmaktadır; 1) fosforilasyon, 2) ligandla etkileşme (DAG, fosfolipidler ve  $Ca^{++}$ ) 3) enzimin subselüler lokasyonunu sağlayan proteinlere bağlanması. Ortamda herhangi bir uyarı yokken PKC sitozolde yer almaktadır (219). Yeni sentezlenen PKC  $\beta$  II ser660 konumundan fosforillenerek sitozole salınmakta ve hücreler uyarıldığında artan intraselüler DAG PKC'nin sitozolden membrana translokasyonunu sağlayarak PKC'yi aktive etmektedir (219, 220). Bulgularımıza göre hasarla sitozolde p-PKC  $\beta$  II formunun azalması PKC  $\beta$  II'nin membrana transloke olarak aktifleştiğinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir. He ve ark. paklitakselle indüklenen periferik nöropati modelinin afferent duyuşal nöronlarında PKC  $\beta$  II aktivasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada zamana bağlı olarak sitozolik PKC  $\beta$  II ekspresyonu anlamlı olarak azalırken membranal PKC  $\beta$  II ekspresyonu kontrole göre anlamlı olarak artmakta bu durumda PKC  $\beta$  II izoformunun aktifleşmesi olarak yorumlanmaktadır (133). PKC'nin eNOS aktivitesini inhibe ederek endotelial NO'nun üretiminde azalmaya neden olduğu bilinmektedir. PKC aracılı eNOS'un inhibitör Thr495 kısmından fosforillenmesiyle enzimatik aktivite ortadan kalkmakta ve NO üretimi bu şekilde azalmaktadır (221). Özellikle PKC  $\beta$ 'nin endotelial disfonksiyondan sorumlu ana PKC alt tipi olduğu aydınlatılmış ve Tip 2 diyabetli



hastalarda yapılan iki farklı klinik çalışmada PKC  $\beta$  inhibisyonunun diyabete bağımlı hem makrovasküler hem de mikrovasküler endotelial fonksiyonları iyileştirdiği görülmüştür (20, 21). Endotelial hücre kültüründe yapılan bir çalışmada ise hücreler yüksek konsantrasyonda glukozla inkübe edildiğinde membranal p-PKC  $\beta$  II (ser660) ekspresyonunun dramatik bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada PKC  $\beta$  II aktivatörü uygulamasının da benzer şekilde membranal p-PKC  $\beta$  II (ser660) ekspresyonunu arttırdığı ve selektif PKC  $\beta$  II inhibitörü CGP53353'ün konsantrasyon bağımlı olarak bu artışı azalttığı gösterilmiştir (222). Miletic ve ark. siyatik sinir hasarında PKC alt tiplerini inceledikleri bir çalışmada ise siyatik sinir hasarını takiben 7. günde spinal kordda PKC- $\beta$  II ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (19). Noh ve arkadaşları kortikal hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmada PKC aktivatörü uygulaması sonucu artan PKC aktivitesinin riluzol uygulamasıyla azaldığını ilk defa tanımlayarak riluzolün PKC direkt inhibitörü olduğunu göstermişlerdir. Bu etkinin ALS tedavisinde riluzolün nöroprotektif etkinliğini destekleyici bir mekanizma olduğunu savunmuşlardır (18). Ardından Yoo ve arkadaşları endotelial hücre proliferasyonu üzerine yaptığı bir çalışmada riluzolün selektif olarak PKC  $\beta$  II alt tipini inhibe ederek etki gösterdiğini saptamışlardır (9). Sonuç olarak literatürde çeşitli patolojilerde endotelial disfonksiyona ve nörodejeneratif süreçlere aracılık ettiği gösterilen PKC'nin aktive formu olan p-PKC  $\beta$  II (ser660)'nin BKSH sonucu penis düz kasında ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı ve hasar sonrası 15 günlük riluzol tedavisinin de bu azalmayı iyileştirdiği görülmüştür. Ayrıca p-PKC  $\beta$  II (ser660)'ın BKSH sonucu MPG dokusunda ekspresyonunun değişmediği riluzol tedavisinin de bu durumu etkilemediği gösterilmiştir. Bu durumda riluzolün ED'de PKC  $\beta$  II aracılı gelişen nörodejeneratif süreçler dışında vasküler değişiklikleri iyileştirdiği yorumu yapılabilir. Çalışmamızda endotelial disfonksiyonu değerlendirmek üzere eNOS ekspresyon düzeyi değerlendirilmemiştir. Ancak ED'de peniste eNOS ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir. Özellikle peniste incelen p-PKC  $\beta$  II ekspresyon düzeyindeki değişimin fonksiyonel çalışmalarımızla paralellik göstermesi gelişen ED'ye PKC/eNOS/NO yolağının aracılık ettiğini düşündürmektedir. Hipotezin doğrulanması için ileriki çalışmalarda bu yolağın araştırılması hedeflenmektedir.

Yapılan birtakım araştırmalar riluzolün nöroprotektif etkisini glutamerjik sistemle etkileşimine dayandırmaktadır. Normal fizyolojik şartlarda glutamat presinaptik membrandan salıverilerek postsinaptik membranda bulunan reseptörlerine ((NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propiyonik asit (AMPA), metabotropik glutamat

reseptörleri) bağlanarak katyon influksuna aracılık ederek postsinaptik membran depolarizasyonuna neden olmaktadır. Aşırı miktarda glutamat saliverilmesi aşırı  $Ca^{++}$  influksunu takiben eksitotoksositeye ve sonuçta nöron kaybına neden olur (21). Fizyolojik olarak kritik olan bu ekstraselüler glutamat seviyesinin regülasyonunda, nöron ve glialarda bulunan  $Na^+$  bağımlı EAAT sınıfına dahil olan GT'ler rol oynamaktadır (203, 223). Glutamat uptake'inde ana rol EAAT-1, EAAT-2 ve daha az olarak da EAAT-3 üzerindedir (199). ALS'li hastalarda yapılan çalışmalarda glutamat seviyesinin sağlıklı bireylere göre üç kat daha fazla olduğu ve motor nöronlardaki GT ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda sıçanlarda azalmış GT aktivitesi sonucu glutamat uptake'inin bozulmasını takiben post-sinaptik glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması sonucu nöronal ölümün gerçekleştiği saptanmıştır (200). GT'lerin temel olarak nöronlarda ve destek hücrelerinde ekprese ediliyor olması ve nörodejenerasyon/nöroprotektif süreçlerde etkin rol oynamaları sebebiyle çalışmamızda GT'lerin protein ekspresyonları yalnızca otonomik bir gangliyon olan MPG dokusunda değerlendirilmiştir. Çalışmamızda 7 günlük BKSH sonucu MPG'de EAAT-1 ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik saptanmazken sham grubuna göre 15 günlük BKSH'yi takiben EAAT-1 ekspresyonunda anlamlı azalma saptanmış ancak riluzol tedavisinin bu azalmayı önleyemediği görülmüştür. Ayrıca çalışmamızda sham grubuna göre hem 7 hem de 15 günlük BKSH sonucu MPG'de EAAT-2 ekspresyonunda anlamlı azalma saptanmıştır. Hasar sonrası 7 günlük riluzol tedavisinin EAAT-2 ekspresyonundaki azalmayı önleyemediği görülürken 15 günlük riluzol tedavisinin EAAT-2 ekspresyonundaki azalmayı anlamlı olarak önlediği saptanmıştır. Periferik sinir hasarı sonucu değişen GT ekspresyonlarının çeşitli nöroplastik değişikliklere ve eksitotoksik yolların aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir (16, 201–203). Siyatik sinir hasarı oluşturulan sıçanlarda GT aktivatörü olan riluzolün non-selektif olarak glutamat uptake'ini arttırdığı ve bu sayede glutamat eksitotoksitesini önleyerek nöroprotektif etki oluşturduğu saptanmıştır (16, 17). Benzer şekilde sıçanlarda optik sinir hasarında riluzol tedavisinin glutamat seviyesini anlamlı olarak azaltarak nöroprotektif etki oluşturduğu gösterilmiştir (204). Napier ve ark. farelerde parsiyel siyatik sinir hasarı sonrası 4. ve 7. gün sonunda spinal kordda yapılan immünohistokimyasal analizde EAAT-1 ve EAAT-2 ekspresyonlarının azaldığını EAAT-3 ekspresyonunun değişmediğini göstermişlerdir (203). Benzer şekilde başka bir çalışmada sıçanlarda siyatik sinir hasarını takiben 7 ve 14. günlerde EAAT-1 ve EAAT-2 protein ekspresyonlarının ve aktivitelerinin kontrole göre anlamlı olarak azaldığını; GT aktivatörü etkinliği bilinen riluzol tedavisinin

de glutamat uptake'indeki azalmayı önlediği saptanmıştır (16). Fumagalli ve ark. riluzolün sinaptozomlarda Na<sup>+</sup> bağımlı glutamat uptake'ini doza bağımlı olarak arttırdığını saptamış ancak mekanizmasını tam olarak aydınlatamamışlardır (199). Amin ve ark. yaptıkları çalışmada sıçanlarda siyatik sinir hasarını takiben 14. günde spinal EAAT-2 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığını ve EAAT-2 aktivatörü klavunalik asit tedavisinin bu azalmayı önlediğini göstermişlerdir (224). Ayrıca ALS'li hastalardan alınan postmortem doku örneklerinde EAAT-2 protein düzeyinin oldukça azaldığı ve bu durumun glutamat uptake'indeki azalmadan sorumlu olduğu ifade edilmiştir (200). Oksaliplatinle indüklenen periferik nöropati sonucunda da spinal kordda EAAT-2 ekspresyonunun azaldığı EAAT-3 ekspresyonunun değişmediği ve bu durumun artan glutamat düzeyini takiben sıçanlarda hipersensitiviteye neden olduğu gösterilmiştir. Riluzol tedavisinin ise EAAT-2 ekspresyonundaki azalmayı engellediği; EAAT-3 ekspresyonunu ise değiştirmedeği bulunarak oral riluzol tedavisinin glutamat düzeyini azalttığı ve oksaliplatinle indüklenen hipersensitiviteyi iyileştirdiği sonucuna varılmıştır (225). Sıçanlarda fasiyal sinir kesisi modelinde de benzer şekilde fasiyal nükleusta EAAT-2 ekspresyonunun 3. günden itibaren azaldığı gözlenmiştir (226). Sung ve ark. ise yaptıkları çalışmada siyatik sinir hasarını takiben spinal kord arka boynuzunda 1. ve 4. günde EAAT-2 ekspresyonunun sham grubuna göre arttığını ancak 7. günden sonra anlamlı olarak azaldığını saptamışlardır (16). Çalışmamızda EAAT-1 ve EAAT-2'nin otonomik bir gangliyon olan MPG'deki ekspresyonları ilk defa gösterilmiştir. Dolayısıyla bulgularımız GT'lerin periferik nöronlardaki ekspresyonu konusunda literatüre önemli katkılar sunmaktadır. Sonuçlarımız BKSH sonucu MPG'de 15. günde anlamlı olarak azalan EAAT-1 ekspresyonu sonucu glutamat düzeyinin arttığını ve aşırı glutamatın eksitotoksik etki göstererek nörodejenerasyon gelişimine neden olduğunu düşündürmektedir. Riluzol tedavisiyle EAAT-1 ekspresyonunda hasar grubuna kıyasla anlamlı bir artış saptanmamasına karşın sham grubuyla kıyaslandığında da bir farklılık görülmemektedir. Dolayısıyla anlamlı olmasa da hasarla EAAT-1 ekspresyonunda meydana gelen azalmayı kısmen önleyebildiği yorumu yapılabilir. EAAT-2'nin glutamatın uptake'inden ana sorumlu GT olduğu bilinmektedir. Ancak periferik nöronlarda patolojik durumlardaki değişimiyle ilgili bilgiler kısıtlıdır. Periferik sinir hasarı sonucu EAAT-2'nin spinal korddaki ekspresyonunun azaldığı ve bu durumun glutamerjik eksitotoksisite sonucu nörodejenerasyona neden olduğu çeşitli çalışmalarda saptanmıştır (16, 224, 225). Çalışmamızda EAAT-2 ekspresyonunun BKSH sonrası 7. günde anlamlı olarak azalmış

olması ve bu azalmanın 15. gün sonunda da hala devam ederek fonksiyonel sonuçlarla da paralellik göstermesi glutamat uptake'inin azalarak glutamerjik eksitotoksitesi sonucu gelişen nörodejenerasyonun bir bulgusu olarak değerlendirilebilir. Ayrıca uzun dönem (15 gün) riluzol tedavisinin EAAT-2 ekspresyonundaki azalmayı önlediği ve bu sayede sinir hasarıyla oluşan glutamat uptake'indeki bozulmayı önleyerek nöroprotektif etki gösterdiği söylenebilir. Riluzolün EAAT-2 ekspresyonu üzerinden oluşturduğu düşünülen nöroprotektif etki fonksiyonel sonuçlarımızla da paralellik göstermektedir.

İntraselüler yerleşim gösteren GAP-43, genel olarak nöronal dallanma, aksonal büyüme, nörotransmitter salımı ve sinaptik veziküllerin geri dönüşümünden sorumlu bir proteindir. Özellikle plastisitenin yoğun olduğu bölgelerde yüksek miktarda eksprese olduğu bilinmektedir (227). Benzer şekilde periferik sinirlerde de rejenerasyon süreçlerinde GAP-43 ekspresyonunun arttığı ve bu artışın nörorejenerasyonun bir belirteci olduğu bilinmektedir (228, 229). Çalışmamızda 7 ve 15 günlük BKSH ve riluzol tedavisi sonucunda MPG'de GAP-43 ekspresyonundaki değişiklikler değerlendirilmiştir. Bulgularımız hem 7 hem de 15 günlük hasar ve riluzol tedavisi sonucu MPG'de GAP-43 ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermektedir. Siyatik sinir hasarı modelinde dorsal kök gangliyonundaki GAP-43 seviyesi 21. günde pik düzeye ulaşmakta hasarın 9. haftasında ölçülemez düzeye geldiği saptanmıştır (230). Wang ve ark. siyatik sinir hasarı modelinde hasarla birlikte siyatik sinirde GAP-43 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığını ve uygulanan lazer tedavisinin GAP-43 ekspresyonunu hasarlı gruba kıyasla daha da arttırdığını göstermişlerdir (229). Kato ve ark. unilateral KS kesisi modelinde hasarı takiben 7. günde MPG'de GAP-43 mRNA ekspresyonunun arttığını bulmuşlardır (231). KS hasarı modelinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise MPG'de GAP-43 mRNA ekspresyonlarında 7. günde anlamlı bir değişiklik saptanmazken 14. günde kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu ifade edilmiştir (232). Mulhall ve ark. ise BKSH'yi takiben korporal dokuda immünohistokimyasal olarak GAP-43 yoğunluğunun arttığını göstermiş ancak nöroprotektif etkisi bilinen FK506'nın hasar grubuna kıyasla bu yoğunlukta anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını ancak NGF ekspresyonunun arttığını saptamışlardır. Araştırmacılar NGF'nin genellikle nöronal survival ve nöroprotektif etkide kritik öneme sahipken GAP-43'ün ise nörorejenerasyona aracılık eden bir markır olduğunu ve FK-506'nın nörorejenerasyona değil daha çok nöroprotektif etkiye aracılık ettiği için total GAP-43 seviyesini değiştirmediğini vurgulamışlardır (233). Hayashi ve ark. KS hasarını takiben yaptıkları immünohistokimyasal analizde GAP-43 yoğunluğunun hasarla

azaldığını, immünsupresif bir ligand olan FK-1706'nın ise bu azalmayı geri döndürdüğünü iddia etmişlerdir (180). Çalışmamızda literatürden farklı olarak sham grubuna kıyasla BKSH sonrası 7 veya 15. günde MPG GAP-43 düzeyinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında klinikte ALS tedavisinde kullanılan riluzolün radikal prostatektomi sonucu gelişen ED modeli olan BKSH modelinde zamana bağlı olarak etkisi fonksiyonel ve moleküler düzeyde incelenmiştir. Sonuç olarak, *in vivo* uzun dönem riluzol tedavisinin sinir hasarı sonucu gelişen erektil fonksiyondaki azalmayı önlediği ve beklenmedik şekilde SE'lere neden olduğu görülmüştür. Riluzolün bu terapötik etkisinden p-PKC  $\beta$  II ve GT'lerden EAAT-2 ekspresyonunda meydana getirdiği değişiklikler sorumlu olabilir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, bir otonomik nöropati modelinde PKC  $\beta$  II ve GT'lerin etkisinin değerlendirilmesi ve MPG'de ilk defa GT ekspresyonlarının değerlendirildiği bir çalışma olması nedeniyle literatüre önemli katkılar sağlamaktadır. Çalışmamız günümüzde ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında oldukça önemli bir strateji haline gelen, ilaçların yeniden amaçlandırılması/konumlandırılması kapsamında riluzolün yeni terapötik etkinliğinin değerlendirilmesine ön veri sağlayacak niteliktedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. First MR, Henning AK, Fitzsimmons WE (2016). Use of low-dose tacrolimus and associated hypomagnesemia in the prevention of erectile dysfunction following prostatectomy for prostate cancer. *Pharmacol Rep* 68: 1154–1158.
2. England JD, Asbury AK (2004). Peripheral neuropathy. *Lancet* 363: 2151–2161.
3. Helfand BT, Catalona WJ (2014). The epidemiology and clinical implications of genetic variation in prostate cancer. *Urol Clin North Am* 41: 277–297.
4. Burnett AL, Aus G, Canby-Hagino ED, Cookson MS, D'Amico A V, Dmochowski RR, Eton DT, Forman JD, Goldenberg SL, Hernandez J, Higano CS, Kraus S, Liebert M, Moul JW, Tangen C, Thrasker JB, Thompson I (2007). Erectile function outcome reporting after clinically localized prostate cancer treatment. *J Urol* 178: 597–601.
5. Gratzke C, Strong TD, Gebaska MA, Champion HC, Stief CG, Burnett AL, Bivalacqua TJ (2010). Activated RhoA/Rho kinase impairs erectile function after cavernous nerve injury in rats. *J Urol* 184: 2197–2204.
6. Dean RC, Lue TF (2005). Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* 32: 379–395.
7. Capogrosso P, Salonia A, Briganti A, Montorsi F (2016). Postprostatectomy erectile dysfunction: A Review. *World J Mens Health* 34: 73-88.
8. Hannan JL, Albersen M, Kutlu O, Gratzke C, Stief CG, Burnett AL, Lysiak JJ, Hedlund P, Bivalacqua TJ (2013). Inhibition of rho-kinase improves erectile function, increases nitric oxide signaling and decreases penile apoptosis in a rat model of cavernous nerve injury. *J Urol* 189: 1155–1161.
9. Yoo MH, Hyun H-J, Koh J-Y, Yoon YH (2005). Riluzole inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation in vitro and hyperoxia-induced abnormal vessel formation in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 4780–4787.
10. Cifra A, Mazzone GL, Nistri A (2013). Riluzole: what it does to spinal and brainstem neurons and how it does it. *Neuroscientist* 19(2): 137-144.
11. Gurney ME, Fleck TJ, Himes CS, Hall ED (1998). Riluzole preserves motor function in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 50: 62–66.

12. Bausch AR, Roy G (1996). Volume-sensitive chloride channels blocked by neuroprotective drugs in human glial cells (U-138MG). *Glia* 18: 73–77.
13. Huang CS, Song JH, Nagata K, Yeh JZ, Narahashi T (1997). Effects of the neuroprotective agent riluzole on the high voltage-activated calcium channels of rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 1280–1290.
14. Hubert JP, Delumeau JC, Glowinski J, Prémont J, Doble A (1994). Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells: evidence for a dual mechanism of action. *Br J Pharmacol* 113: 261–267.
15. Koh JY, Kim DK, Hwang JY, Kim YH, Seo JH (1999). Antioxidative and proapoptotic effects of riluzole on cultured cortical neurons. *J Neurochem* 72(2): 716–723.
16. Sung B, Lim G, Mao J (2003). Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23(7): 2899–2910.
17. Coderre TJ, Kumar N, Lefebvre CD, Yu JSC (2007). A comparison of the glutamate release inhibition and anti-allodynic effects of gabapentin, lamotrigine, and riluzole in a model of neuropathic pain. *J Neurochem* 100: 1289–1299.
18. Noh KM, Hwang JY, Shin HC, Koh JY (2000). A novel neuroprotective mechanism of riluzole: direct inhibition of protein kinase C. *Neurobiol Dis* 7(4): 375–383.
19. Miletic V, Bowen KK, Miletic G (2000). Loose ligation of the rat sciatic nerve is accompanied by changes in the subcellular content of protein kinase C beta II and gamma in the spinal dorsal horn. *Neurosci Lett* 288(3): 199–202.
20. Mehta NN, Sheetz M, Price K, Comiskey L, Amrutia S, Iqbal N, Mohler ER, Reilly MP (2009). Selective PKC beta inhibition with ruboxistaurin and endothelial function in type-2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Drugs Ther* 23(1): 17–24.
21. Casellini CM, Barlow PM, Rice AL, Casey M, Simmons K, Pittenger G, Bastyr EJ, Wolka AM, Vinik AI (2007). A 6-month, randomized, double-masked, placebo-controlled study evaluating the effects of the protein kinase C- $\beta$  inhibitor ruboxistaurin on skin microvascular blood flow and other measures of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Care* 30(4): 896–902.

22. Andersson KE, Wagner G (1995). Physiology of penile erection. *Physiol Rev* 75(1): 191–236.
23. Auffenberg GB, Helfand BT, Mcvary KT (2011). Contemporary treatment of erectile dysfunction: a clinical guide, Springer Science Business Media, sayfa:11-22.
24. Dwyer ME, Salgado CJ, Lightner DJ (2011). Normal penile, scrotal, and perineal anatomy with reconstructive considerations. *Semin Plast Surg* 25(3): 179–188.
25. Bitsch M, Kromann-Andersen B, Schou J, Sjøntoft E (1990). The elasticity and the tensile strength of tunica albuginea of the corpora cavernosa. *J Urol* 143(3): 642–645.
26. Treuting P, Dintzis S, Montine K (Eds.) (2018). *Comparative Anatomy and Histology*, 2th edition, Academic Press, sayfa:360.
27. Seyam RM, Kattan SA, Assad LW, El-Sayed RM, Almohanna FH (2013). Penile autotransplantation in rats: An animal model. *Urol Ann* 5(4): 255–258.
28. Droupy S, Benoît G, Giuliano F, Jardin A (1997). Penile arteries in humans. origin--distribution--variations. *Surg Radiol Anat* 19(3): 161–167.
29. Hanyu S (1988). Morphological changes in penile vessels during erection: The mechanism of obstruction of arteries and veins at the tunica albuginea in dog corpora cavernosa. *Urol Int.* 43(4): 219–224.
30. Dail WG, Trujillo D, de la Rosa D, Walton G (1989). Autonomic innervation of reproductive organs: analysis of the neurons whose axons project in the main penile nerve in the pelvic plexus of the rat. *Anat Rec* 224(1): 94–101.
31. 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: 96–108.
32. Giuliano F, Rampin O (2004). Neural control of erection. *Physiol Behav* 83(2): 189–201.
33. Lepor H, Gregerman M, Crosby R, Mostofi FK, Walsh PC (1985). Precise localization of the autonomic nerves from the pelvic plexus to the corpora cavernosa: a detailed anatomical study of the adult male pelvis. *J Urol* 133(2): 207–212.
34. Lue TF (2001). Neurogenic erectile dysfunction. *Clin Auton Res* 11(5): 285–294.



35. Tompkins JD, Vizzard MA, Parsons RL (2013). Synaptic transmission at parasympathetic neurons of the major pelvic ganglion from normal and diabetic male mice. *J Neurophysiol* 109(4): 988–995.
36. Keast JR (2006). Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation. *Int Rev Cytol* 248: 141–208.
37. Cheng S, Yang X, Zhang Y, Xiao C (2013). Culture of major pelvic ganglion neurons from adult rat. *Cytotechnology* 65(4): 663–669.
38. Keast JR (1995). Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion. *Neuroscience* 66(3): 655-662.
39. Traish AM, Netsuwan N, Daley J, Padman-Nathan H, Goldstein I, Saenz de Tejada I (1995). A heterogeneous population of alpha sub 1 adrenergic receptors mediates contraction of human corpus cavernosum smooth muscle to norepinephrine. *J Urol* 153: 222–227.
40. Andersson KE (2003). Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. *J Urol* 170(2): 6-13.
41. Hawksworth DJ, Burnett AL (2015). Pharmacotherapeutic management of erectile dysfunction. *Clin Pharmacol Ther* 98(6): 602–610.
42. 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.
43. Andersson KE (2001). Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev* 53(3): 417–450.
44. Fournier GR, Juenemann KP, Lue TF, Tanagho EA (1987). Mechanisms of venous occlusion during canine penile erection: an anatomic demonstration. *J Urol* 137(1): 163–167.
45. Rees RW, Ziessen T, Ralph DJ, Kell P, Moncada S, Cellet S (2002). Human and rabbit cavernosal smooth muscle cells express rho-kinase. *Int J Impot Res* 14(1): 1–7.

46. Somlyo AP, Somlyo A V (2000). Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522(2): 177–185.
47. Christ GJ, Lue T (2004). Physiology and biochemistry of erections. *Endocrine* 23(2-3): 93–100.
48. Ückert S, Hedlund P, Andersson KE, Truss MC, Jonas U, Stief CG (2006). Update on phosphodiesterase (PDE) isoenzymes as pharmacologic targets in urology: present and future. *Eur Urol* 50(6): 1194–1207.
49. Milenkovic U, Campbell J, Roussel E, Albersen M (2018). An update on emerging drugs for the treatment of erectile dysfunction. *Expert Opin Emerg Drugs* 23(4): 319–330.
50. Akkus E, Kadioglu A, Esen A, Doran S, Ergen A, Anafarta K, Hattat H, Turkish erectile dysfunction prevalence study group (2002). Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Turkey: a population-based study. *Eur Urol* 41(3): 298–304.
51. Burnett AL (2006). Erectile dysfunction. *J Urol* 175: 25-31.
52. Sáenz de Tejada I, Angulo J, Cellek S, González-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, Simonsen U (2005). Pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med* 2(1): 26–39.
53. Gratzke C, Angulo J, Chitale K, Dai Y-T, Kim NN, Paick J-S, Simonsen U, Uckert S, Wespes E, Andersson KE, Lue TF, Srief CG (2010). Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med* 7: 445–475.
54. Hirooka Y, Shimokawa H (2005). Therapeutic potential of rho-kinase inhibitors in cardiovascular diseases. *Am J Cardiovasc Drugs* 5(1): 31–39.
55. Schneider MP, Hilgers KF, Klingbeil AU, John S, Veelken R, Schmieder RE (2000). Plasma endothelin is increased in early essential hypertension. *Am J Hypertens* 13(6): 579–585.
56. Mangiafico RA, Malatino LS, Santonocito M, Spada RS, Polizzi G, Tamburino G (1996). Raised plasma endothelin-1 concentrations in patients with primary hypercholesterolemia without evidence of atherosclerosis. *Int Angiol* 15(3): 240–244.
57. Hakim LS, Goldstein I (1996). Diabetic sexual dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25(2): 379–400.

58. El-Sakka AI, Lin CS, Chui RM, Dahiya R, Lue TF (1999). Effects of diabetes on nitric oxide synthase and growth factor genes and protein expression in an animal model. *Int J Impot Res* 11(3): 123–132.
59. Heaton JPW (2006). LUTS and Sexual Dysfunction: What is the link and how can it be managed? *Eur Urol Suppl* 5(12): 722–728.
60. Schiff JD, Mulhall JP (2004). The link between LUTS and ED: Clinical and basic science evidence. *J Androl* 25(4): 470–478.
61. Burchardt M, Burchardt T, Baer L, Kiss AJ, Pawar R V, Shabsigh A, de la Taille A, Hayek OR, Shabsigh R (2000). Hypertension is associated with severe erectile dysfunction. *J Urol* 164: 1188–1191.
62. Rosas SE, Joffe M, Franklin E, Strom BL, Kotzker W, Brensinger C, Grossman E, Glasser D, Feldman HI (2001). Prevalence and determinants of erectile dysfunction in hemodialysis patients. *Kidney Int* 59(6): 2259–2266.
63. Lue TF (2000). Erectile dysfunction. *N Engl J Med* 342: 1802–1813.
64. Ralph D, McNicholas T (2000). UK management guidelines for erectile dysfunction. *BMJ* 321(7259): 499–503.
65. Schrooten W, Colebunders R, Youle M, Molenberghs G, Dedes N, Koitz G, Finazzi R, de Mey I, Florence E, Dreezen C, Eurosupport Study Group (2001). Sexual dysfunction associated with protease inhibitor containing highly active antiretroviral treatment. *AIDS* 15(8): 1019–1023.
66. Lewis RW (2001). Epidemiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* 28(2): 209–216.
67. Nurnberg HG, Hensley PL, Gelenberg AJ, Fava M, Lauriello J, Paine S (2003). Treatment of antidepressant-associated sexual dysfunction with sildenafil: a randomized controlled trial. *JAMA* 289: 56–64.
68. Derby CA, Mohr BA, Goldstein I, Feldman HA, Johannes CB, McKinlay JB (2000). Modifiable risk factors and erectile dysfunction: can lifestyle changes modify risk? *Urology* 56(2): 302–306.

69. Miner M, Nehra A, Jackson G, Bhasin S, Billups K, Burnett AL, Buvat J, Carson C, Cunningham G, Ganz P, Goldstein I, Guay A, Hackett G, Kloner RA, Kostis JB, LaFlamme KE, Montorsi P, Ramsey M, Rosen R, Sadovsky R, Seftel A, Shabsigh R, Vlachopoulos C, Wu F (2014). All men with vasculogenic erectile dysfunction require a cardiovascular workup. *Am J Med* 127(3): 174–182.
70. Araujo AB, Hall SA, Ganz P, Chiu GR, Rosen RC, Kupelian V, Travison TG, McKinlay JB (2010). Does erectile dysfunction contribute to cardiovascular disease risk prediction beyond the framingham risk score? *J Am Coll Cardiol* 55(4): 350–356.
71. Batty GD, Li Q, Czernichow S, Neal B, Zoungas S, Huxley R, Patel A, De Galan BE, Woodward M, Hamet P, Harrap SB, Poulter N, Chalmers J; Advance Collaborative Group. (2010). Erectile dysfunction and later cardiovascular disease in men with type 2 diabetes: Prospective cohort study based on the advance (action in diabetes and vascular disease: preterax and diamicron modified-release controlled evaluation) trial. *J Am Coll Cardiol* 56(23): 1908–1913.
72. Blumentals WA, Gomez-Camirero A, Joo S, Vannappagari V (2004). Should erectile dysfunction be considered as a marker for acute myocardial infarction? Results from a retrospective cohort study. *Int J Impot Res* 16(4): 350–353.
73. Gazzaruso C, Solerte SB, Pujia A, Coppola A, Vezzoli M, Salvucci F, Valenti C, Giustina A, Garzaniti A (2008). Erectile dysfunction as a predictor of cardiovascular events and death in diabetic patients with angiographically proven asymptomatic coronary artery disease. a potential protective role for statins and 5-phosphodiesterase inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 51(21): 2040–2044.
74. Schouten BWV, Bohnen AM, Bosch JLHR, Bernsen RMD, Deckers JW, Dohle GR, Thomas S (2008). Erectile dysfunction prospectively associated with cardiovascular disease in the Dutch general population: results from the krimpens study. *Int J Impot Res* 20(1): 92–99.

75. Böhm M, Baumhäkel M, Teo K, Sleight P, Probstfield J, Gao P, Mann JF, Diaz R, Dagenais GR, Jennings GLR, Liu L, Jansky P, Yusuf S (2010). Erectile dysfunction predicts cardiovascular events in high-risk patients receiving telmisartan, ramipril, or both: the ongoing telmisartan alone and in combination with ramipril global endpoint trial/telmisartan randomized assessment study in ace intolerant subjects with cardiovascular disease (ontarget/transcend) trials. *Circulation* 121(12): 1439–1446.
76. Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, Rotatori F, Veglia F, Briganti A, Salonia A, Dehò F, Rigatti P, Montorsi F, Fiorentini C (2006). Association between erectile dysfunction and coronary artery disease. Role of coronary clinical presentation and extent of coronary vessels involvement: The COBRA trial. *Eur Heart J* 27(22): 2632–2639.
77. Montorsi F, Briganti A, Salonia A, Rigatti P, Margonato A, Macchi A, Galli S, Ravagnani PM, Montorsi P, Heaton JPW (2003). Erectile dysfunction prevalence, time of onset and association with risk factors in 300 consecutive patients with acute chest pain and angiographically documented coronary artery disease. *Eur Urol* 44(3): 360–365.
78. Baumhäkel M, Böhm M (2007). Erectile dysfunction correlates with left ventricular function and precedes cardiovascular events in cardiovascular high-risk patients. *Int J Clin Pract* 61: 361–366.
79. Hodges LD, Kirby M, Solanki J, O'Donnell J, Brodie DA (2007). The temporal relationship between erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Int J Clin Pract* 61(3): 2019–2025.
80. Chew KK, Finn J, Stuckey B, Gibson N, Sanfilippo F, Bremner A, Thompson P, Hobbs M, Jamrozik K (2010). Erectile dysfunction as a predictor for subsequent atherosclerotic cardiovascular events: Findings from a linked-data study. *J Sex Med* 7(1): 192–202.
81. Eardley I (2002). Pathophysiology of erectile dysfunction. *Br J Diabetes Vasc Dis* 2(4): 272–276.
82. Herzog AG (1988). Seizure control with clomiphene therapy. A case report. *Arch Neurol* 45: 209–210.
83. Hyun JS (2012). Prostate cancer and sexual function. *World J Mens Health* 30(2): 99–107.

84. Steers WD (1990). Neural control of penile erection. *Seminars Urol* 8: 66–79.
85. Grunhaus L, Tiongco D, Zelnik T, Flegel P, Hollingsworth PJ, Smith CB (1989). Intravenous yohimbine. selective enhancer of norepinephrine and cortisol secretion and systolic blood pressure in humans. *Clin Neuropharmacol* 12(2): 106–114.
86. Morales A, Heaton JP, Johnston B, Adams M (1995). Oral and topical treatment of erectile dysfunction. present and future. *Urol Clin North Am* 22(4): 879–886.
87. Ernst E, Pittler MH (1998). Yohimbine for erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Urol* 159(2): 433–436.
88. Goldstein I (2000). Oral phentolamine: an alpha-1, alpha-2 adrenergic antagonist for the treatment of erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 12(1): 75–80.
89. Goldstein I, Carson C, Rosen R, Islam A (2001). Vasomax for the treatment of male erectile dysfunction. *World J Urol* 19(1): 51–56.
90. Wessells H, Levine N, Hadley ME, Dorr R, Hruby V (2000). Melanocortin receptor agonists, penile erection, and sexual motivation: human studies with Melanotan II. *Int J Impot Res* 12(4): 74-79.
91. Diamond LE, Earle DC, Rosen RC, Willett MS, Molinoff PB (2004). Double-blind, placebo-controlled evaluation of the safety, pharmacokinetic properties and pharmacodynamic effects of intranasal PT-141, a melanocortin receptor agonist, in healthy males and patients with mild-to-moderate erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 16(1): 51–59.
92. Porst H, Burnett A, Brock G, Ghanem H, Giuliano F, Glina S, Hellstrom W, Martin-Morales A, Salonia A, Sharlip I, ISSM Standards Committee for Sexual Medicine. (2013). SOP conservative (medical and mechanical) treatment of erectile dysfunction. *J Sex Med* 10(1): 130–171.
93. Patel DP, Pastuszak AW, Hotaling JM (2019). Emerging treatments for erectile dysfunction: a review of novel, non-surgical options. *Curr Urol Rep* 20(8): 44.
94. Albersen M, Linsen L, Tinel H, Sandner P, Van Renterghem K (2013). Synergistic effects of BAY 60-4552 and vardenafil on relaxation of corpus cavernosum tissue of patients with erectile dysfunction and clinical phosphodiesterase type 5 inhibitor failure. *J Sex Med* 10(5): 1268–1277.

95. Guagnini F, Ferazzini M, Grasso M, Blanco S, Croci T (2012). Erectile properties of the Rho-kinase inhibitor SAR407899 in diabetic animals and human isolated corpora cavernosa. *J Transl Med* 10: 59.
96. Ryu JK, Suh JK, Burnett AL (2017). Research in pharmacotherapy for erectile dysfunction. *Transl Androl Urol* 6(2):207-215.
97. Bella AJ, Hayashi N, Carrion RE, Price R, Lue TF (2007). FK1706 enhances the recovery of erectile function following bilateral cavernous nerve crush injury in the rat. *J Sex Med* 4(2): 341–346.
98. Melman A, Bar-Chama N, McCullough A, Davies K, Christ G (2006). hMaxi-K gene transfer in males with erectile dysfunction: results of the first human trial. *Hum Gene Ther* 17(12): 1165–1176.
99. Rogers RS, Graziottin TM, Lin C-S, Kan YW, Lue TF (2003). Intracavernosal vascular endothelial growth factor (VEGF) injection and adeno-associated virus-mediated VEGF gene therapy prevent and reverse venogenic erectile dysfunction in rats. *Int J Impot Res* 15(1): 26–37.
100. Gholami SS, Rogers R, Chang J, Ho HC, Graziottin T, Lin CS, Lue TF (2003). The effect of vascular endothelial growth factor and adeno-associated virus mediated brain derived neurotrophic factor on neurogenic and vasculogenic erectile dysfunction induced by hyperlipidemia. *J Urol* 169(4): 1577–1581.
101. Li WJ, Wang H, Zhou J, Li B, Zhang J, Lu M, Wang Z (2013). P144, A TGF- $\beta$ 1 antagonist peptide, synergizes with sildenafil and enhances erectile response via amelioration of cavernosal fibrosis in diabetic rats. *J Sex Med* 10(12): 2942–2951.
102. Watson JC, Dyck PJB (2015). Peripheral neuropathy: a practical approach to diagnosis and symptom management. *Mayo Clin Proc* 90(7): 940–951.
103. Alport AR, Sander HW (2012). *Clinical Approach to Peripheral Neuropathy*. *Continuum (Minneapolis)* 18(1): 13–38.
104. Mold JW, Vesely SK, Keyl BA, Schenk JB, Roberts M (2004). The prevalence, predictors, and consequences of peripheral sensory neuropathy in older patients. *J Am Board Fam Pract* 17(5): 309–318.

105. Vilholm OJ, Christensen AA, Zedan AH, Itani M (2014). Drug-induced peripheral neuropathy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 115(2): 185–192.
106. Hughes RA (2002). Peripheral neuropathy fact sheet: National Institute of Neurological Disorders and Stroke. *BMJ* 324(7335): 466–469.
107. Cashman CR, Höke A (2015). Mechanisms of distal axonal degeneration in peripheral neuropathies. *Neurosci Lett* 596: 33–50.
108. Henry JL (2014). Mechanisms of peripheral nerve injury – what to treat, when to treat. peripheral neuropathy. Da Silva PA (Ed.), *Peripheral neuropathy*. InTech publishing, sayfa:1-24.
109. Seddon HJ (1942). A classification of nerve injuries. *BMJ* 2: 237–239.
110. Menorca RMG, Fussell TS, Elfar JC (2013). Peripheral nerve trauma : mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin* 29: 317–330.
111. Sunderland S (1951). A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 74(4): 491–516.
112. Aguayo AJ, Peyronnard JM, Bray GM (1973). A quantitative ultrastructural study of regeneration from isolated proximal stumps of transected unmyelinated nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 32(2): 256–270.
113. Campbell WW (2008). Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol* 119: 1951–65.
114. Rotshenker S (2011). Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation* 8: 109.
115. Charlton MP, Atwood HL (1977). Modulation of transmitter release by intracellular sodium in squid gland synapse. *Brain Res* 134(2): 367–371.
116. Michalski B, Bain JR, Fahnstock M (2008). Long-term changes in neurotrophic factor expression in distal nerve stump following denervation and reinnervation with motor or sensory nerve. *J Neurochem* 105(4): 1244–1252.
117. Tetzlaff W, Alexander S, Miller F, Bisby M (1991). Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43. *J Neurosci* 11(8): 2528–2544.



118. Fu SY, Gordon T (1997). The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 14(1-2): 67–116.
119. Jin L-Q, Zhang G, Jamison C, Takano H, Haydon PG, Selzer ME (2009). Axon regeneration in the absence of growth cones: acceleration by cyclic AMP. *J Comp Neurol*. 515(3): 295–312.
120. Marx J (1995). Helping neurons find their way. *Science* 268: 971–973.
121. Geraldo S, Gordon-Weeks PR (2009). Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J Cell Sci* 122: 3595–3604.
122. Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H (1987). Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 104(6): 1623–31.
123. Matsuoka I, Meyer M, Thoenen H (1991). Cell-type-specific regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in non-neuronal cells: comparison of schwann cells with other cell types. *J Neurosci* 11(10): 3165–3177.
124. DiStefano PS, Curtis R (1994). Receptor mediated retrograde axonal transport of neurotrophic factors is increased after peripheral nerve injury. *Prog Brain Res* 103: 35–42.
125. Lunn ER, Brown MC, Perry VH (1990). The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neuroscience* 35(1): 157–165.
126. Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD (1989). Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 18(5): 671–683.
127. Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV (2012). Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 11(12): 937-957.
128. Khalil RA (2013). Protein kinase C inhibitors as modulators of vascular function and their application in vascular disease. *Pharmaceuticals* 6(3): 407-439.
129. Kanashiro CA, Khalil RA (1998). Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25(12): 974-985.

130. Somlyo AP, Somlyo AV (2003). Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83(4): 1325–1358.
131. Zarate CA, Manji HK (2009). Protein kinase C inhibitors: rationale for use and potential in the treatment of bipolar disorder. *CNS Drugs* 23(7): 569-582.
132. Wiklund P, Ekström PAR, Edbladh M, Tonge D, Edström A (1996). Protein kinase C and mouse sciatic nerve regeneration. *Brain Res* 715: 145–154.
133. He Y, Wang ZJ (2015). Nociceptor beta II, delta, and epsilon isoforms of PKC differentially mediate paclitaxel-induced spontaneous and evoked pain. *J Neurosci* 35(11): 4614–4625.
134. Borghini I, Ania-Lahuerta A, Regazzi R, Ferrari G, Gjinovci A, Wollheim CB, Pralong WF (2002).  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ , and  $\epsilon$  protein kinase c isoforms and compound activity in the sciatic nerve of normal and diabetic rats. *J Neurochem* 62(2): 686–696.
135. Eichberg J (2002). Protein kinase C changes in diabetes: is the concept relevant to neuropathy? *Int Rev Neurobiol* 50: 61–82.
136. Nakamura J, Kato K, Hamada Y, Nakayama M, Chaya S, Nakashima E, Naruse K, Kasuya Y, Mizubayashi R, Miwa K, Yasuda Y, Kamiya H, Ienaga K, Sakakibara F, Koh N, Hotta N (1999). A protein kinase C- $\beta$ -selective inhibitor ameliorates neural dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 48: 2090–2095.
137. Parkin GM, Udawela M, Gibbons A, Dean B (2018). Glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2, are potentially important in the pathophysiology and treatment of schizophrenia and affective disorders. *World J Psychiatry* 8(2): 51–63.
138. O'Donovan SM, Sullivan CR, McCullumsmith RE (2017). The role of glutamate transporters in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *NPJ Schizophr* 3(1): 32.
139. Carozzi VA, Canta A, Oggioni N, Ceresa C, Marmioli P, Konvalinka J, Zoia C, Bossi M, Ferrarese C, Tredici G, Cavaletti G (2008). Expression and distribution of 'high affinity' glutamate transporters GLT1, GLAST, EAAC1 and of GCPII in the rat peripheral nervous system. *J Anat* 213(5): 539–546.

140. Choi I, Chiu SY (1997). Expression of high-affinity neuronal and glial glutamate transporters in the rat optic nerve. *Glia* 20: 184–192.
141. Liaw WJ, Stephens RL, Binns BC, Chu Y, Sepkuty JP, Johns RA, Rothstein JD, Tao YX (2005). Spinal glutamate uptake is critical for maintaining normal sensory transmission in rat spinal cord. *Pain* 115: 60–70.
142. Bradley WE (1978). Autonomic neuropathy and the genitourinary system. *J Urol* 119(3): 299–302.
143. Burakgazi AZ, Alsowaity B, Burakgazi ZA, Unal D, Kelly JJ (2012). Bladder dysfunction in peripheral neuropathies. *Muscle Nerve* 45(1): 2-8.
144. Maiorino MI, Bellastella G, Esposito K (2014). Diabetes and sexual dysfunction: Current perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7: 95–105.
145. Singla N, Singla AK (2014). Post-prostatectomy incontinence: Etiology, evaluation, and management. *Turk J Urol* 40(1): 1–8.
146. Emanu JC, Avildsen IK, Nelson CJ (2016). Erectile dysfunction after radical prostatectomy: Prevalence, medical treatments, and psychosocial interventions. *Curr Opin Support Palliat Care* 10(1): 102–107.
147. Hehemann M, Choe S, Kalmanek E, Harrington D, Stupp SI, McVary KT, Podlasek CA (2018). Pelvic and hypogastric nerves are injured in a rat prostatectomy model, contributing to development of stress urinary incontinence. *Sci Rep* 8(1): 16432.
148. Bratu O, Oprea I, Marcu D, Spinu D, Niculae A, Geavlete B, Mischianu D (2019). Erectile dysfunction post-radical prostatectomy - a challenge for both patient and physician. *J Med Life* 10(1): 13–18.
149. Cho OH, Yoo YS, Kim JC, Park RH, Hwang KH (2018). Factors influencing lower urinary tract symptoms in advanced cancer patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Int Neurourol J* 22(3): 192–199.
150. Williams JK, Andersson K-E, Christ G (2012). Animal models of erectile dysfunction (ED): potential utility of non-human primates as a model of atherosclerosis-induced vascular ED. *Int J Impot Res* 24(3): 91–100.
151. Chung E, De Young L, Brock GB (2011). Investigative models in erectile dysfunction: A state-of-the-art review of current animal models. *J Sex Med* 8(12): 3291–3305.

152. Burnett AL (2001). General use of animal models for investigation of the physiology of erection. *Int J Impot Res* 13(3): 135–139.
153. Heaton JP, Varrin SJ, Morales A (1991). The characterization of a bio-assay of erectile function in a rat model. *J Urol* 145(5): 1099–1102.
154. Canguven O, Burnett A (2008). Cavernous nerve injury using rodent animal models. *J Sex Med* 5: 1776–1785.
155. Mills TM, Stopper VS, Wiedmeier VT (1994). Effects of castration and androgen replacement on the hemodynamics of penile erection in the rat. *Biol Reprod* 51(2): 234–238.
156. Podlasek CA (2016). Contemporary treatment of erectile dysfunction. Springer International Publishing Switzerland. sayfa: 1-15.
157. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE (1967). Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 126(1): 201–205.
158. Jakobsen J (1976). Axonal dwindling in early experimental diabetes. II. A study of isolated nerve fibres. *Diabetologia* 12: 547–553.
159. Bestetti G, Rossi GL, Zemp C (1981). Changes in peripheral nerves of rats four months after induction of streptozotocin diabetes. A qualitative and quantitative study. *Acta Neuropathol* 54(2): 129–134.
160. El-Sakka AI, Lin CS, Chui RM, Dahiya R, Lue TF (1999). Effects of diabetes on nitric oxide synthase and growth factor genes and protein expression in an animal model. *Int J Impot Res* 11(3): 123–132.
161. Burchardt T, Burchardt M, Karden J, Buttyan R, Shabsigh A, de la Taille A, Ng PY, Anastasiadis AG, Shabsigh R (2000). Reduction of endothelial and smooth muscle density in the corpora cavernosa of the streptozotocin induced diabetic rat. *J Urol* 164(5): 1807–1811.
162. Kapoor MS, Khan SA, Gupta SK, Choudhary R, Bodakhe SH (2015). Animal models of erectile dysfunction. *J Pharmacol Toxicol Methods* 76: 43–54.
163. McVary KT, Rathnau CH, McKenna KE (1997). Sexual dysfunction in the diabetic BB/WOR rat: a role of central neuropathy. *Am J Physiol* 272: 259-267.

164. Wright JR, Yates AJ, Sharma HM, Thibert P (1983). Pathological lesions in the spontaneously diabetic BB Wistar rat: a comprehensive autopsy study. *Metabolism* 32(1-7): 101–105.
165. Van Zwieten PA, Kam KL, Pijl AJ, Hendriks MG, Beenen OH, Pfaffendorf M (1996). Hypertensive diabetic rats in pharmacological studies. *Pharmacol Res* 33(2): 95–105.
166. Davidson EP, Coppey LJ, Holmes A, Lupachyk S, Dake BL, Oltman CL, Peterson RG, Yorek MA (2014). Characterization of diabetic neuropathy in the Zucker diabetic Sprague-Dawley rat: a new animal model for type 2 diabetes. *J J Diabetes Res* 2014: 714273.
167. Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL (2005). Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(33): 11870–11875.
168. Akingba AG, Burnett AL (2001). Endothelial nitric oxide synthase protein expression, localization, and activity in the penis of the alloxan-induced diabetic rat. *Mol Urol* 5(4): 189–197.
169. Shen ZJ, Jin XD, Chen ZD, Shi YH (2001). Effect of aging on penile ultrastructure. *Asian J Androl* 3(4): 281–284.
170. Yamanaka M, Shirai M, Shiina H, Shirai M, Tanaka Y, Fujime M, Okuyama A, Dahiya R (2002). Loss of anti-apoptotic genes in aging rat crura. *J Urol* 168(5): 2296–2300.
171. Shi JP, Zhao YM, Song YT (2003). Effect of aging on expression of nitric oxide synthase I and activity of nitric oxide synthase in rat penis. *Asian J Androl* 5: 117–120.
172. Xie D, Kontos CD, Donatucci CF, Annex BH (2005). Cholesterol feeding reduces vascular endothelial growth factor signaling in rabbit corporal tissues. *J Sex Med* 2(5): 634–640.
173. Rahman NU, Phonsombat S, Bochinski D, Carrion RE, Nunes L, Lue TF (2007). An animal model to study lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction: the hyperlipidaemic rat. *BJU Int* 100: 658–663.

174. Huang Y-C, Ning H, Shindel AW, Fandel TM, Lin G, Harraz AM, Lue TF, Lin CS (2010). The effect of intracavernous injection of adipose tissue-derived stem cells on hyperlipidemia-associated erectile dysfunction in a rat model. *J Sex Med* 7: 1391–400.
175. Behr-Roussel D, Gorny D, Mevel K, Compagnie S, Kern P, Sivan V, Bernabé J, Bedigian MP, Alexandre L, Giuliano F (2005). Erectile dysfunction: an early marker for hypertension? A longitudinal study in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(1): 276-283.
176. Yono M, Yamamoto Y, Yoshida M, Ueda S, Latifpour J (2007). Effects of doxazosin on blood flow and mRNA expression of nitric oxide synthase in the spontaneously hypertensive rat genitourinary tract. *Life Sci* 81(3): 218–222.
177. Hsieh P-S, Bochinski DJ, Lin GT, Nunes L, Lin CS, Lue TF (2003). The effect of vascular endothelial growth factor and brain-derived neurotrophic factor on cavernosal nerve regeneration in a nerve-crush rat model. *BJU Int* 92: 470–475.
178. Sezen SF, Blackshaw S, Steiner JP, Burnett AL (2002). FK506 binding protein 12 is expressed in rat penile innervation and upregulated after cavernous nerve injury. *Int J Impot Res* 14(6): 506–512.
179. Nangle MR, Keast JR (2007). Reduced efficacy of nitrenergic neurotransmission exacerbates erectile dysfunction after penile nerve injury despite axonal regeneration. *Exp Neurol* 207(1): 30–41.
180. Hayashi N, Minor TX, Carrion R, Price R, Nunes L, Lue TF (2006). The Effect of FK1706 on Erectile Function Following Bilateral Cavernous Nerve Crush Injury in a Rat Model. *J Urol* 176(2): 824–829.
181. Carrier S, Zvara P, Nunes L, Kour NW, Rehman J, Lue TF (1995). Regeneration of nitric oxide synthase-containing nerves after cavernous nerve neurotomy in the rat. *J Urol* 153(5): 1722–1727.
182. Hisasue S-I, Kato R, Sato Y, Suetomi T, Tabata Y, Tsukamoto T (2005). Cavernous nerve reconstruction with a biodegradable conduit graft and collagen sponge in the rat. *J Urol* 173(1): 286–291.

183. Mizoule J, Meldrum B, Mazadier M, Croucher M, Ollat C, Uzan A, Legrand JJ, Gueremy C, Le Fur G (1985). 2-Amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole, a possible antagonist of excitatory amino acid neurotransmission--I. anticonvulsant properties. *Neuropharmacology* 24(8): 767–773.
184. Bryson HM, Fulton B, Benfield P (1996). Riluzole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in amyotrophic lateral sclerosis. *Drugs* 52: 549–63.
185. Mokhtari Z, Baluchnejadmojarad T, Nikbakht F, Mansouri M, Roghani M (2017). Riluzole ameliorates learning and memory deficits in A $\beta$ 25-35-induced rat model of Alzheimer's disease and is independent of cholinergic activation. *Biomed Pharmacother* 87: 135–144.
186. Barnéoud P, Mazadier M, Miquet J-M, Parmentier S, Dubédat P, Doble A, Boireau A (1996). Neuroprotective effects of riluzole on a model of parkinson's disease in the rat. *Neuroscience* 74: 971–983.
187. Bezard E, Stutzmann JM, Imbert C, Boraud T, Boireau A, Gross CE (1998). Riluzole delayed appearance of parkinsonian motor abnormalities in a chronic MPTP monkey model. *Eur J Pharmacol* 356(2-3): 101–104.
188. Huntington Study Group (2003). Dosage effects of riluzole in Huntington's disease: a multicenter placebo-controlled study. *Neurology* 61(11): 1551–1556.
189. Zarate CA, Manji HK (2008). Riluzole in psychiatry: a systematic review of the literature. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4(9): 1223–1234.
190. Ghayour MB, Abdolmaleki A, Behnam-Rassouli M (2017). The effect of riluzole on functional recovery of locomotion in the rat sciatic nerve crush model. *Eur J Trauma Emerg Surg* 43(5): 691–699.
191. Medico M, Nicosia A, Grech M, Onesta M, Sessa G, Rampello L, Drago F (2004). Riluzole restores motor activity in rats with post-traumatic peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 358(1): 37–40.
192. Wu Y, Satkunendrarajah K, Fehlings MG (2014). Riluzole improves outcome following ischemia-reperfusion injury to the spinal cord by preventing delayed paraplegia. *Neuroscience* 265: 302–312.

193. Wu Y, Satkunendrarajah K, Teng Y, Chow DSL, Buttigieg J, Fehlings MG (2013). Delayed post-injury administration of riluzole is neuroprotective in a preclinical rodent model of cervical spinal cord injury. *J Neurotrauma* 30(6): 441–452.
194. Lips J, de Haan P, Bodewits P, Vanicky I, Dzoljic M, Jacobs MJ, Kalkman CJ (2000). Neuroprotective effects of riluzole and ketamine during transient spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology* 93(5): 1303–1311.
195. Nagoshi N, Nakashima H, Fehlings MG (2015). Riluzole as a neuroprotective drug for spinal cord injury: from bench to bedside. *Molecules* 20: 7775–7789.
196. Le Liboux A, Cachia JP, Kirkesseli S, Gautier JY, Guimart C, Montay G, Peeters PA, Groen E, Jonkman JH, Wemer J (1999). A comparison of the pharmacokinetics and tolerability of riluzole after repeat dose administration in healthy elderly and young volunteers. *J Clin Pharmacol* 39(5): 480–486.
197. Sanderink GJ, Bournique B, Stevens J, Petry M, Martinet M (1997). Involvement of human CYP1A isoenzymes in the metabolism and drug interactions of riluzole in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 282(3): 1465–1472.
198. van Kan HJM, van den Berg LH, Groeneveld GJ, van der Straaten RJHM, van Vught PWJ, Lie-A-Huen L, Guchelaar HJ (2008). Pharmacokinetics of riluzole: Evidence for glucuronidation as a major metabolic pathway not associated with UGT1A1 genotype. *Biopharm Drug Dispos* 29(3): 139–144.
199. Fumagalli E, Funicello M, Rauen T, Gobbi M, Mennini T (2008). Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *Eur J Pharmacol* 578(2-3): 171–176.
200. Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326(22): 1464–1468.
201. Mawrin C, Pap T, Pallas M, Dietzmann K, Behrens-Baumann W, Vorwerk CK (2003). Changes of retinal glutamate transporter GLT-1 mRNA levels following optic nerve damage. *Mol Vis* 9: 10–13.



202. Mirzaei V, Manaheji H, Maghsoudi N, Zaringhalam J (2010). Comparison of changes in mRNA expression of spinal glutamate transporters following induction of two neuropathic pain models. *Spinal Cord* 48(11): 791–797.
203. Napier IA, Mohammadi SA, Christie MJ (2012). Glutamate transporter dysfunction associated with nerve injury-induced pain in mice. *J Neurophysiol* 107(2): 649–657.
204. Vorwerk CK, Zurakowski D, McDermott LM, Mawrin C, Dreyer EB (2004). Effects of axonal injury on ganglion cell survival and glutamate homeostasis. *Brain Res Bull* 62(6): 485–490.
205. Hamilton Z, Mirza M (2014). Post-prostatectomy erectile dysfunction: Contemporary approaches from a US perspective. *Res Rep Urol* 6: 35-41.
206. Chen YL, Chao TT, Wu YN, Chen MC, Lin YH, Liao CH, Wu CC, Chen KC, Chou SSP, Chiang HS (2018). NNOS-positive minor-branches of the dorsal penile nerves is associated with erectile function in the bilateral cavernous injury model of rats. *Sci Rep* 8: 1–10.
207. Sezen SF, Lagoda G, Burnett AL (2012). Neuronal nitric oxide signaling regulates erection recovery after cavernous nerve injury. *J Urol* 187(2): 757–763.
208. Wan ZH, Li GH, Guo YL, Li WZ, Chen L (2015). Calpain inhibition improves erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. *Urol Int* 95(2): 233–239.
209. Kennel P, Revah F, Bohme GA, Bejuit R, Gallix P, Stutzmann JM, Imperato A, Pratt J (2000). Riluzole prolongs survival and delays muscle strength deterioration in mice with progressive motor neuronopathy (pmn). *J Neurol Sci* 180(1-2): 55–61.
210. Yamamoto S, Egashira N, Tsuda M, Masuda S (2018). Riluzole prevents oxaliplatin-induced cold allodynia via inhibition of overexpression of transient receptor potential melastatin 8 in rats. *J Pharmacol Sci* 138(3): 214–217.
211. Costa HJZR, Da Silva CF, Costa MP, Lazarini PR (2007). Evaluation of the systemic use of riluzole in post-traumatic facial nerve regeneration: Experimental study in rabbits. *Acta Otolaryngol* 127(11): 1222–1225.

212. Thompson JM, Yakhnitsa V, Ji G, Neugebauer V (2018). Small conductance calcium activated potassium (SK) channel dependent and independent effects of riluzole on neuropathic pain-related amygdala activity and behaviors in rats. *Neuropharmacology* 138: 219–231.
213. Cabaj AM, Slawinska U (2012). Riluzole treatment reduces motoneuron death induced by axotomy in newborn rats. *J Neurotrauma* 29(7): 1506–1517.
214. Pintér S, Gloviczki B, Szabó A, Márton G, Nógrádi A (2010). Increased survival and reinnervation of cervical motoneurons by riluzole after avulsion of the C7 ventral root. *J Neurotrauma* 27: 2273–2282.
215. Bergerot A, Shortland PJ, Anand P, Hunt SP, Carlstedt T (2004). Co-treatment with riluzole and GDNF is necessary for functional recovery after ventral root avulsion injury. *Exp Neurol* 187(2): 359–366.
216. Poupon L, Lamoine S, Pereira V, Barriere DA, Lolignier S, Giraudet F, Aissouni Y, Meleine M, Prival L, Richard D, Kerckhove N, Authier N, Balayssac D, Eschalier A2, Lazdunski M, Busserolles J (2018). Targeting the TREK-1 potassium channel via riluzole to eliminate the neuropathic and depressive-like effects of oxaliplatin. *Neuropharmacology* 140: 43–61.
217. Effectiveness Assessment of Riluzole in the Prevention of Oxaliplatin-induced Peripheral Neuropathy: A Phase II Randomized Study by UNICANCER With the Cooperation of AFSOS (2019). Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03722680?term=riluzole&rank=3>. [Accessed 23 October 2019].
218. Rilutek (riluzole) tablets (2008). Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2009/020599s011s012lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020599s011s012lbl.pdf). [Accessed 23 October 2019].
219. Mochly-Rosen D (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: A theme in signal transduction. *Science* 268(5208): 247–251.
220. Keranen LM, Dutil EM, Newton AC (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 5(12): 1394–1403.

221. Payne GA, Bohlen HG, Dincer ÜD, Borbouse L, Tune JD (2009). Periadventitial adipose tissue impairs coronary endothelial function via PKC- $\beta$ -dependent phosphorylation of nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(1): 460-465.
222. Kouroedov A, Eto M, Joch H, Volpe M, Lüscher TF, Cosentino F (2004). Selective inhibition of protein kinase C $\beta$ 2 prevents acute effects of high glucose on vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 110: 91–96.
223. Xin WJ, Weng HR, Dougherty PM (2009). Plasticity in expression of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in spinal dorsal horn glial cells following partial sciatic nerve ligation. *Mol Pain* 5:15.
224. Amin B, Avaznia M, Noorani R, Mehri S, Hosseinzadeh H (2018). Up-regulation of glutamate transporter 1 (GLT-1) by treatment with clavulanic acid attenuates allodynia and hyperalgesia in neuropathic rats. *BCN* 10(4): 345–354.
225. Yamamoto S, Ushio S, Egashira N, Kawashiri T, Mitsuyasu S, Higuchi H, Ozawa N, Masuguchi K, Ono Y, Masuda S (2017). Excessive spinal glutamate transmission is involved in oxaliplatin-induced mechanical allodynia: a possibility for riluzole as a prophylactic drug. *Sci Rep* 7(1): 9661.
226. López-Redondo F, Nakajima K, Honda S, Kohsaka S (2000). Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. *Brain Res Mol Brain Res* 76(2): 429–435.
227. Nemes AD, Ayasoufi K, Ying Z, Zhou QG, Suh H, Najm IM (2017). Growth associated protein 43 (GAP-43) as a novel target for the diagnosis, treatment and prevention of epileptogenesis. *Sci Rep* 7(1): 17702.
228. Xu QG, Midha R, Martinez JA, Guo GF, Zochodne DW (2008). Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury. *Neuroscience* 152(4): 877–887.
229. Wang CZ, Chen YJ, Wang YH, Yeh ML, Huang MH, Ho ML, Liang JI, Chen CH (2014). Low-level laser irradiation improves functional recovery and nerve regeneration in sciatic nerve crush rat injury model. *Plos One* 9(8): e103348.

230. Holahan M (2015). GAP-43 in synaptic plasticity: molecular perspectives. *Res Rep Biochem* 5:137-146.
231. Kato R, Kiryu-Seo S, Sato Y, Hisasue S, Tsukamoto T, Kiyama H (2003). Cavernous nerve injury elicits GAP-43 mRNA expression but not regeneration of injured pelvic ganglion neurons. *Brain Res* 986(1-2): 166–173.
232. Hannan JL, Matsui H, Sopko NA, Liu X, Weyne E, Albersen M, Watson JW, Hoke A, Burnett AL, Bivalacqua TJ (2016). Caspase-3 dependent nitrergic neuronal apoptosis following cavernous nerve injury is mediated via RhoA and ROCK activation in major pelvic ganglion. *Sci Rep* 6: 1–12.
233. Mulhall JP, Müller A, Donohue JF, Golijanin D, Tal R, Akin-Olugbade Y, Kobylarz K, Cohen-Gould L, Bennett NE, Scardino P (2008). FK506 and erectile function preservation in the cavernous nerve injury model: optimal dosing and timing. *J Sex Med* 5(6): 1334–1344.



**EKLER**

## Ek 1. Etik Kurul Onayı



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

Sayı : 53488718 - 73  
Konu: Onay Belgesi

07/02/2018

Sayın, Prof. Dr. Feride Sena SEZEN  
Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD. Öğretim Üyesi,

"Kavernöz Sinir Hasarıyla İndüklenen Eretil Disfonksiyonda Riluzolün Nöroprotektif Etkisinin İncelenmesi" başlık ve 2018/ 1 protokol numaralı tez çalışma önerisi Kurulumuzca incelenmiş olup; yürürlükteki etik ilke ve kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Ahmet AYAR  
Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

61080 – Trabzon / TÜRKİYE

Tel: +90 (462) 377 5403

Faks: +90(462)325 2270

Elektronik Ağ: www.ktu.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin İrtibat  
Seralettin YILMAZ  
e-posta  
seralettin.yilmaz@ktu.edu.tr

T.C. KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU						
ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu				
	AÇIK ADRESİ	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 61080 /Trabzon				
	TELEFON	0462- 3775853—0462-3775403				
	FAKS, E- posta	0462- 3252270 – etikhd@ktu.edu.tr				
BAŞVURU BİLGİLERİ	ETİK KURUL DOSYA NO:	2018 / 01				
	ÇALIŞMANIN ADI	"Kavernöz Sinir Hasarıyla İndüklenen Erektıl Disfonksiyonda Riluzolün Nöroprotekt Etkisinin İncelenmesi"				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI	ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Feride Sena SEZEN			
	UZMANLIK ALANI	Eczacılık Fakültesi Farmakoloji				
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, ÜNVANI/ADISOYADI	Arş.Gör.Elif Nur BARUT, Y.Doç.Dr.Yeşim KAYA YAŞAR, Arş.Gör.Seçkin ENĞİN				
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	TEZ <input checked="" type="checkbox"/>		AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: <u>2</u>	Tarih: 06/02/2018				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkat alınarak KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'na incelenmiş; yapılan inceleme sonucunda araştırmanın KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Yönergesi'ne uygun bulunarak onaylanmasına ve araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.					
	ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYILARI	Erkek Sığan 90 Adet				
	BAŞLANGIÇ Tarihi ve ETİK KURUL İZİN SÜRESİ:					
ÜYELER						
Unvanı / Adı / Soyadı Etik Kurul Üyelığı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma İle İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ahmet AYAR Başkan	Fizyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Serdar TÜRKİYILMAZ Başkan V.	Genel Cerrahi	KTÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Ali CANSU Üye	Pediyatri	KTÜ Tıp Fakültesi Pediyatri ABD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Engin YENİLMEZ Üye	Histoloji ve Embriyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr.Zerrin PULATHAN Üye	Kalp ve Damar Cerrahisi	KTÜ Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi ABD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Celal ÇANDIRLI Üye	Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi	KTÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Rezzan ALİVAZICIOĞLU Üye	Temel Eczacılık Bilimleri Biyokimya	KTÜ Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri ABD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Nadir BAŞÇINAR Üye	Balıkçılık Teknolojisi	KTÜ Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr.Ismail ABİDİN Üye	Biyofizik	KTÜ Tıp Fakültesi Biyofizik ABD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Y.Doç.Dr.Emel ÇAKIR Üye	Tıbbi Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	KATILMADI
Sait AL Üye	Veteriner Hekim	KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Uzm.Dr.Nuran AYDIN Üye	Nöroloji	Kanıni Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Bölümü	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	KATILMADI
Ecz.Nuran EYÜPOĞLU Üye	Eczacı		K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	KATILMADI

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Soyadı, Adı** : Elif Nur BARUT  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 26.05.1988, TRABZON  
**Telefon (İş)** : 0462 377 88 51  
**E-Posta** : elifgazioglu@ktu.edu.tr  
**Yazışma Adresi (İş)** : Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık  
Meslek Bilimleri Bölümü Farmakoloji Anabilim Dalı Oda  
No:227 TRABZON

### EĞİTİM BİLGİLERİ

<b>Derece</b>	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora</b>	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı	Halen
<b>Lisans</b>	Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Bölümü	2012
<b>Lisans</b>	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011
<b>Lise</b>	Kanuni Anadolu Lisesi	2006

### AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl -Yıl)</b>
1. Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2012- Halen

### YABANCI DİL

İngilizce

### UZMANLIK ALANI

Sağlık Bilimleri Temel Alan, Farmakoloji



## YAYINLAR

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, et al (2019). Uroprotective effect of ambroxol in cyclophosphamide-induced cystitis in mice. *Int Urol Nephrol* 51: 803-810.
4. Barut B, **Barut EN**, Engin S, Özel A, Sezen FS (2019). Investigation of antioxidant, alpha-glucosidase inhibitory, anti-inflammatory and DNA protective properties of *Vaccinium arctostaphylos* L. *Turk J Pharm Sci* 2: 175-183.
5. **Barut EN**, Barut B, Engin S, Yildirim S, Yaşar A, Türkiş S, et al. (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.
6. Engin S, Kiliç M, **Barut EN**, Duman M (2013). Effect of trimebutine maleate on acetylcholine, potassium chloride and adenosine triphosphate induced contractions of rat detrusor smooth muscle. *FABAD* 38: 65-71.

## BİLDİRİLER

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, Sözlü Bildiri, 107-109, Malatya.
2. 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, Poster Bildirisi, 623-623, Belgrad.
3. **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, Poster Bildirisi, 670-670, Belgrad

4. 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, Poster Bildirisi, 200-200, Ankara.
5. Eroğlu G, Sevgi S, Engin S, **Barut EN**, Kaya Yaşar Y, Yariş E, Sezen FS (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, Poster Bildirisi, 26-26, Eskişehir.
6. Eroğlu G, Sevgi S, Engin S, **Barut EN**, Kaya Yaşar Y, Yariş E, Sezen FS (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, Poster Bildirisi, 25-25, Eskişehir.
7. Sezen FS, **Barut EN**, Barut, Doğu AH (2018). Kooperatifçilik ilkeleri ve uygulamaları dersinin eczacılık eğitimine katkısı. II. Ulusal Eczacılık Eğitimi ve Akreditasyon Kongresi, 10-11 Mayıs 2018, Poster Bildirisi, 30-30, Eskişehir.
8. **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, Poster Bildirisi, 735-735, İstanbul.
9. **Barut EN**, Engin S, Yariş E, Sezen FS (2017). Trabzon ili aile sağlığı merkezlerine başvuran geriatrik hasta grubuna ait reçetelerin olası ilaç-ilaç etkileşimleri açısından değerlendirilmesi. Uluslararası 3. İlaç ve Eczacılık Kongresi, 26-29 Nisan 2017, Poster Bildirisi, 450-450, İstanbul.
10. Kaya Yaşar Y, **Barut EN**, Engin S, Duman M, Sezen FS (2017). İzole sıçan torasik aortasında konsantrasyon-bağımlı trimebutin maleat gevşemesinin mekanizmasının incelenmesi. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 17-20 Ekim 2017, Poster Bildirisi, 113-113, Trabzon.
11. **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, Poster Bildirisi, 32-32, Erzurum.

12. **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, Poster Bildirisi, 150-150, Erzurum.
13. Engin S, **Barut EN**, Kerimoğlu G, Duman M, Sezen FS (2017). Farelerde siklofosamid ile oluşturulan hemorajik sistit modelinde pantoprazol'ün koruyucu etkisi. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 17-20 Ekim 2017, Poster Bildirisi, 121-121, Trabzon.
14. 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), Poster Bildirisi, 5-7 Ekim 2017, 10-10, Erzurum.
15. Engin S, **Barut EN**, Yariş E, Sezen FS (2017). Trabzon il merkezinde ayaktan tedavi gören hasta reçetelerinin olası ilaç-ilaç etkileşimleri açısından değerlendirilmesi. 3. Klinik Eczacılık ve Farmasötik Bakım Kongresi, 9-12 Şubat 2017, Poster Bildirisi, 81-81, Antalya.
16. 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, Sözlü Bildiri, 47-47, Antalya.
17. **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.
18. 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, Poster Bildirisi, 145-145, Antalya.
19. 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, Poster Bildirisi, 271-271, Ankara.
20. 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, Poster Bildirisi, 193-194, Ankara.

21. **Gazioğlu EN**, Sağlam M, Engin S, Duman M (2015). Effects of trimebutine maleate on xascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 9-12 Haziran 2015, Poster Bildirisi, 186-187, Ankara.
22. **Gazioğlu EN**, Sağlam M, Erköseoğlu İ, Altintaş Aykan D, Günak SK, Duman M (2013). Karadeniz Teknik Üniversitesi teratojenite bilgi servisine gebelikte ilaç kullanımı nedeniyle başvuran gebelerin retrospektif olarak değerlendirilmesi. 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7 Kasım 2013, Poster Bildirisi, 260-261, Antalya.

### **ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR**

1. Barut EN, "Yayın Teşvik", TÜBİTAK, Eylül 2019
2. Barut EN, "Yayın Teşvik", TÜBİTAK, Eylül 2019
3. TÜBİTAK 1001 Projesi (217S434), Bursiyer, Temmuz 2018-Halen

