

1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

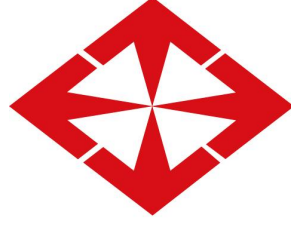
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

YAVAŞ SALIMLI HİDROJEN SÜLFÜR DONÖRÜ GYY4137'NİN
İN VİTRO İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
VASKÜLER ETKİSİNİN VE ETKİ MEKANİZMASININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Arıyan TEIMOORI

ANKARA, 2025



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

YAVAŞ SALIMLI HİDROJEN SÜLFÜR (H₂S) DONÖRÜ GYY4137'NİN
İN VİTRO İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
VASKÜLER ETKİSİNİN VE ETKİ MEKANİZMASININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Arıyan TEIMOORI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selda EMRE AYDINGÖZ

ANKARA, 2025

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından (proje no: DA23/26) ve “1002–Hızlı Destek Programı” kapsamında TÜBİTAK tarafından (proje no: 223S63) desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezimin her aşamasında bana rehberlik eden, bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşarak çalışmaya yön veren, değerli fikirleriyle projeyi zenginleştiren danışman hocam Doç. Dr. Selda EMRE AYDINGÖZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Onun desteği ve yol göstericiliği, tezimin her adımında bana güven ve motivasyon sağlamıştır. Uzmanlık eğitimim sürecinde üzerimde büyük emeği bulunan, bilimsel yaklaşımı ve disiplinli çalışmalarıyla örnek aldığım Prof. Dr. Meral TUNCER'e, bana her zaman anlayışla yaklaşan ve eğitim sürecim boyunca yalnızca akademik değil, insani değerler konusunda da önemli bir rehber olan Prof. Dr. Ş. Remzi ERDEM'e gönülden teşekkür ederim. Ayrıca, akademik yolculuğumda derslerinden ve sohbetlerinden büyük keyif aldığım Prof. Dr. Tolga R. AYDOS'a da teşekkürlerimi sunarım. Tezimin hazırlık aşamasında ve TÜBİTAK projesi olarak sunulmasında bana büyük destek sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Dr. Oğuzhan Ekin EFE'ye ayrıca teşekkürlerimi iletirim.

Araştırma ekibinde yer alarak tezimin planması ve deneylerinin yapılmasında değerli katkılarda bulunan çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Halit Güner ORHAN, Araş. Gör. Dr. Nargiz ZEYNALOVA ve Araş. Gör. Dr. Elif DEMİRTAŞ'a, yoğun emekleri ve destekleri için teşekkür ederim. Verdikleri emek ve sağladıkları katkılar, tez projemin gerçekleştirilmesinde büyük önem taşımıştır. Tez kapsamında yapılan biyokimya testleri için verdikleri destek ile projenin kritik bir kısmını mümkün kılan Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Emine Suna TÜRKOĞLU'na, biyokimya testlerini yapan aynı bölümden öğretim üyesi Doç. Dr. Huriye Eda ÖZTURAN ÖZER'e ve tıbbi biyokimya teknisyeni Sinan KARAÇOCUK'a da teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tez çalışmasının her aşamasında desteklerini esirgemeyen Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi çalışanlarına, özellikle Veteriner Hekim Şevval Aydınay'a, Veteriner Sağlık Teknikerleri Yusuf Çınar ve Haydar Güler'e teşekkür ederim. Ailem ve sevgili Aylin'e de en içten teşekkürlerimi sunarım. Onların desteği ve anlayışı, bu projenin başarılı bir şekilde tamamlanmasında bana büyük güç ve motivasyon sağlamıştır.

Dr. Arıyan TEIMOORI

Mart 2025, Ankara

ÖZET

Koroner arter bypass cerrahisi sırasında kullanılan otolog vasküler greftlerin iskemi-reperfüzyon (İR) hasarı, cerrahi başarıyı olumsuz etkileyebilmektedir. Bu çalışmada, yavaş salınan bir hidrojen sülfür (H_2S) donörü olan GYY4137'nin *in vitro* sıçan İR hasarı modelinde vasküler doku üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Yirmi erkek (21-22 ay, $378,2 \pm 10,19$ g) Sprague-Dawley sıçanın torasik aortu 4 halka preparata bölünerek deney gruplarına randomize edilmiştir: Kontrol, İR, İR + GYY4137 100 μM , İR + GYY4137 300 μM . İR modeli için aort halkası azot ile gazlandırılmış %0,9 salinde $4^\circ C$ 'de 24 saat bekletilip, $37^\circ C$ 'de Krebs-Henseleit solüsyonu içeren, %95 O_2 +%5 CO_2 ile gazlandırılan organ banyosuna alınarak 30 dk sodyum hipoklorite (200 μM) maruz bırakılmıştır. GYY4137 gruplarında salin içine GYY4137 eklenmiştir. Vasküler fonksiyon izole organ banyosu düzeneğinde değerlendirilmiş, doku malondialdehidi glutatyon ve kaspaz-3 aktivitesi biyokimyasal olarak ölçülmüştür.

İR hasarı dokunun KCl (80 mM) yanıtını azaltmış (Kontrol 1815 ± 140 mg, İR 842 ± 160 mg, $p = 0,0003$), fenilefrin konsantrasyon-cevap eğrisinde E_{maks} 'ı artırmış (Kontrol %144,1 $\pm$ %2,64, İR %202,3 $\pm$ %4,9, $p < 0,0001$), asetilkolin konsantrasyon-cevap eğrisinde E_{maks} 'ı (Kontrol %78,4 $\pm$ %1,4, İR %32,6 $\pm$ 3,4, $p < 0,0001$) ve pD_2 'yi düşürmüştür (Kontrol $7,24 \pm 0,05$, İR $5,18 \pm 0,17$, $p < 0,0001$), sodyum nitroprusiyat konsantrasyon-cevap eğrisinde ise E_{maks} 'ı artırırken (Kontrol %101,4 $\pm$ %1,47, İR %113,6 $\pm$ %2,3, $p = 0,0009$), pD_2 'yi azaltmıştır (Kontrol $8,4 \pm 0,03$, İR $8,23 \pm 0,04$, $p = 0,00025$). GYY4137, İR'ye bağlı bu fonksiyonel değişiklikleri düzeltmemiştir. Diğer taraftan, biyokimyasal analizlerde İR ile artan malondialdehid seviyesi (Kontrol $8,4 \pm 0,9$ nmol/g, İR $12,6 \pm 1,0$ nmol/g, $p = 0,02$), 100 μM ve 300 μM GYY4137 ile kontrol düzeyine gerilemiştir (sırasıyla $8,7 \pm 0,9$ nmol/g, $p = 0,008$ ve $7,6 \pm 1,1$ nmol/g, $p = 0,012$). Azalan glutatyon seviyesi (Kontrol 785 ± 61 nmol/g, İR 506 ± 45 nmol/g, $p = 0,012$) 300 μM GYY4137 varlığında normale dönmüş (709 ± 45 nmol/g, $p = 0,004$); artan doku kaspaz-3 seviyesi (Kontrol $2,4 \pm 1,3$ ng/g, İR $8,4 \pm 1,2$ ng/g, $p = 0,02$), 100 μM ve 300 μM GYY4137 ile düzelmiştir (sırasıyla $2,3 \pm 1,3$ ng/g, $p = 0,004$ ve $3,2 \pm 1,1$ ng/g, $p = 0,02$).

Bu bulgular, GYY4137'nin İR hasarını takiben oluşan oksidatif stres ve apoptoza karşı hücrel koruma sağladığını, ancak vasküler disfonksiyonu önemli ölçüde iyileştirmediğini göstermektedir. İleri çalışmalar, sunulan bulguların mekanizmalarının anlaşılmasına ve İR hasarına karşı potansiyel önleme ve tedavi stratejileri geliştirilmesine odaklanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: GYY4137; Hidrojen Sülfür, *In Vitro* Teknikler; Sıçan; İskemi-reperfüzyon

Çalışmaya ilişkin tüm dökümanlara, deney kayıtlarına, sayısal verilere ve istatistik analiz raporlarına şu adresten açık erişim sağlanabilir: <https://osf.io/23sb6>.

ABSTRACT

Evaluation of the Effect and Mechanism of Action of Slow Release Hydrogen Sulfide (H₂S) Donor GYY4137 on Vascular Response in In Vitro Ischemia-Reperfusion Model

Ischemia-reperfusion (IR) injury of autologous vascular grafts used during coronary artery bypass surgery may adversely affect surgical success. In this study, the protective effects of GYY4137, a slow-release hydrogen sulfide (H₂S) donor, on vascular tissue in an *in vitro* rat model of IR injury were investigated.

The thoracic aorta of twenty male (21-22 months, 378.2 ± 45.5 g) Sprague-Dawley rats were divided into 4 ring preparation and randomized into experimental groups: Control, IR, IR + GYY4137 100 µM, IR + GYY4137 300 µM. For the IR model, the aortic ring was kept in 0.9% saline gassed with nitrogen at 4°C for 24 hours, placed in an organ bath containing Krebs-Henseleit solution at 37°C, gassed with 95% O₂+5% CO₂ and exposed to sodium hypochlorite (200 µM) for 30 minutes. In GYY4137 groups, GYY4137 was added to saline. Vascular function was evaluated in the isolated organ bath setup and tissue malondialdehyde, glutathione and caspase-3 activity were measured biochemically.

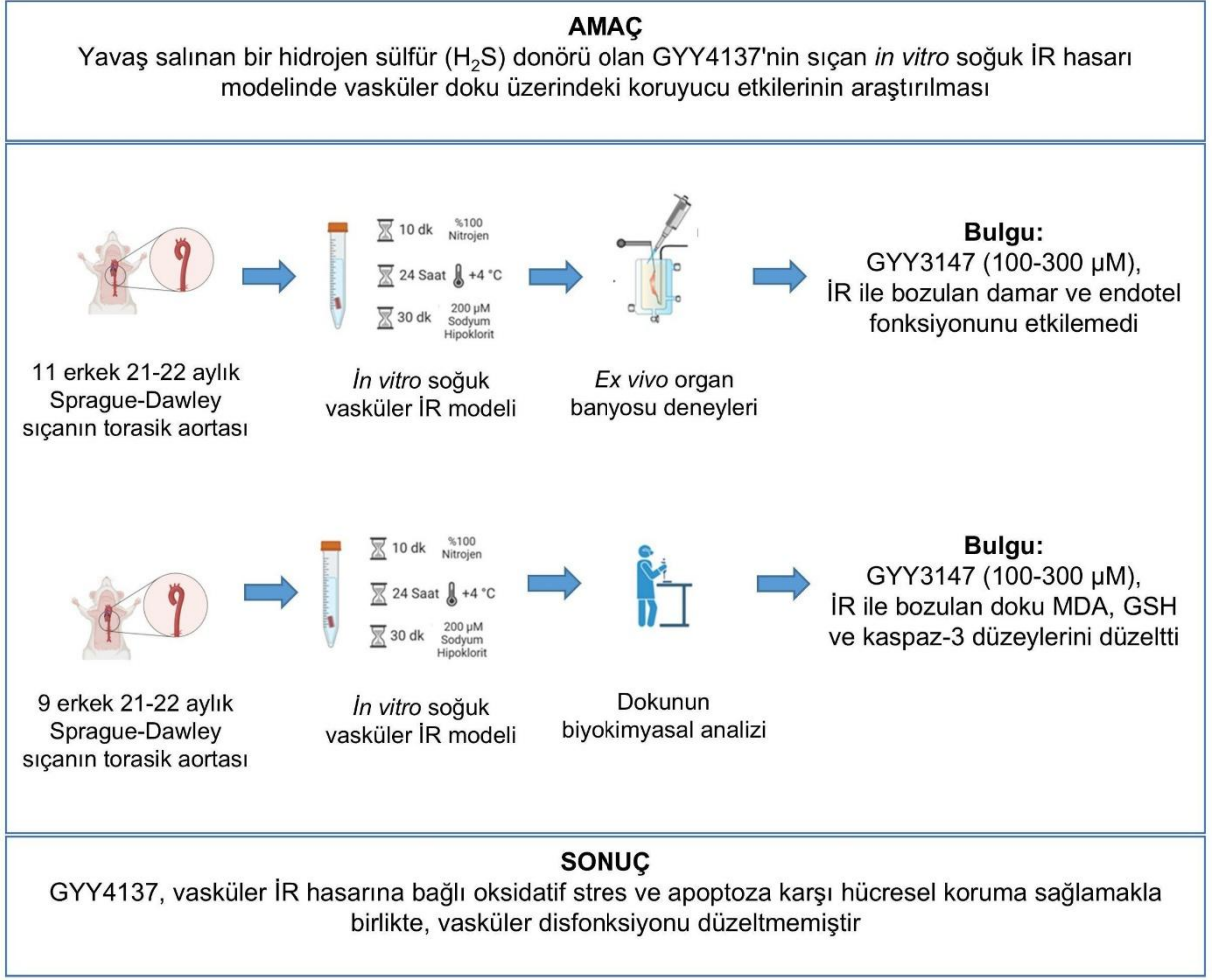
IR injury decreased KCl (80 mM) response (Control 1815 ± 140 mg, IR 842 ± 160 mg, $p = 0.0003$), increased $E_{\max}$ in phenylephrine concentration-response curve (Control 144.1 ± 2.64%, IR 202.3% ± 4.9%, $p < 0.0001$), increased $E_{\max}$ in acetylcholine concentration-response curve (Control 78.4% ± 1.4%, IR 32.6 ± 3.4%, $p < 0.0001$) and decreased pD_2 (Control 7.24 ± 0.05, IR 5.18 ± 0.17, $p < 0.0001$), while sodium nitroprusside concentration-response curve increased $E_{\max}$ (Control 101.4% ± 1.47%, IR 113.6% ± 2.3%, $p = 0.0009$) and decreased pD_2 (Control 8.4 ± 0.03, IR 8.23 ± 0.04, $p = 0.00025$). GYY4137 did not correct these IR-induced functional changes. On the other hand, in biochemical analysis, malondialdehyde level (Control 8.4 ± 0.9 nmol/g, IR 12.6 ± 1.0 nmol/g, $p = 0.02$), which increased with IR, decreased to control level with 100 µM and 300 µM GYY4137 (8.7 ± 0.9 nmol/g, $p = 0.008$ and 7.6 ± 1.1 nmol/g, $p = 0.012$, respectively). Decreased glutathione level (Control 785 ± 61 nmol/g, IR 506 ± 45 nmol/g, $p = 0.012$) returned to normal in the presence of 300 µM GYY4137 (709 ± 45 nmol/g, $p = 0.004$); Increased tissue caspase-3 levels (Control 2.4 ± 1.3 ng/g, IR 8.4 ± 1.2 ng/g, $p = 0.02$) were recovered by 100 µM and 300 µM GYY4137 (2.3 ± 1.3 ng/g, $p = 0.004$ and 3.2 ± 1.1 ng/g, $p = 0.02$, respectively).

These findings suggest that GYY4137 provides cellular protection against oxidative stress and apoptosis following IR injury, but does not significantly improve vascular dysfunction. Further studies should focus on understanding the mechanisms of the presented findings and developing potential prevention and treatment strategies against IR injury.

Keywords: GYY4137, Hydrogen Sulfide, *In Vitro* Techniques; Rat; Ischemia-reperfusion

Project documents, experimental records, raw data, and statistical analysis reports related to the study can be accessed openly at <https://osf.io/23sb6>.

GÖRSEL ÖZET



İR: iskemi-reperfüzyon

MDA: malondialdehit

GSH: glutatyon

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
GÖRSEL ÖZET	vi
KISALTMALAR ve SİMGELER	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Gerekçe	2
1.2. Hipotez ve Amaç	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>İn Vitro</i> Soğuk İR Modeli	4
2.2. İR Hasarı ve Hidrojen Sülfür	5
2.3. Saklama Solüsyonlarında Hidrojen Sülfür	5
3. GEREÇ ve YÖNTEM	7
3.1. Etik Kurul Onayı	7
3.2. <i>İn Vitro</i> Soğuk İskemi-Reperfüzyon Modeli	7
3.3. Hayvanlar ve Deney Grupları	7
3.4. GYY4137 Konsantrasyonu ve Hazırlanması	9
3.5. Cerrahi İşlem ve Aort Halkalarının Hazırlanması	10
3.6. İskemi-Reperfüzyon Protokolü	10
3.7. İzole Organ Banyosu Protokolü	12
3.8. Biyokimyasal Analizler	13
3.9. İstatistiksel Analiz	15
3.9.1. Örneklem Büyüklüğü	15
3.9.2. Veri Analizi	15
4. BULGULAR	17
4.1. Sıçan İzole Aort Preparatında İzometrik Gerim Değişikliği Yanıtlarının Optimizasyonu (Fenilefrin Sataşması)	17
4.2 KCl Yanıtları	18
4.3 Fenilefrin Konsantrasyonuna Bağlı Kasılma Cevapları	19

4.4 Asetilkolin Konsantrasyonuna Bağlı Gevşeme Cevapları	22
4.5 Sodyum Nitroprusiyat Konsantrasyonuna Bağlı Gevşeme Cevapları	25
4.6 MDA, GSH ve Kaspaz-3 Doku Düzeyleri	28
5. TARTIŞMA	31
5.1 İR Hasarının Damar Düz Kası ve Endotel Fonksiyonu Üzerine Etkisi	31
5.2 İR Hasarının Oksidatif Stres ve Apoptoz Belirteçleri Üzerine Etkisi	33
5.3 GYY4137'nin İR ile İlişkili Vasküler Disfonksiyon, Oksidatif Stres ve Apoptoz Üzerine Etkisi	33
5.4 Çalışmanın Kısıtlılıkları	35
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	37
6.1 Sonuç	37
6.2 İleri Çalışmalar İçin Öneriler	37
7. KAYNAKLAR	39

KISALTMALAR ve SIMGELER

ACh:	Asetilkolin
ANOVA:	Tek Yönlü Varyans Analizi
ATP:	Adenozin Trifosfat
EC ₅₀ :	Medyan Etkin Konsantrasyon
E _{maks} :	Maksimum Etki
ERK1:	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen kinaz 1
GA:	Güven Aralığı
GSH:	Glutasyon
H ₂ S:	Hidrojen Sülfür
İR:	İskemi-Reperfüzyon
KCl:	Potasyum Klorür
MAPK:	Mitojenle Aktive olan Protein Kinaz
MDA:	Malondialdehit
mM:	Milimolar
pD ₂ :	EC ₅₀ 'nin negatif logaritması (-logEC ₅₀)
PE:	Fenilefrin
PI-3-Kinaz:	Fosfoinozid 3-kinaz
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
SEM:	Ortalamanın Standart Hatası
SNP:	Sodyum Nitroprusiyat
TUNEL:	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Nick Uç Etiketleme

ŞEKİL LİSTESİ

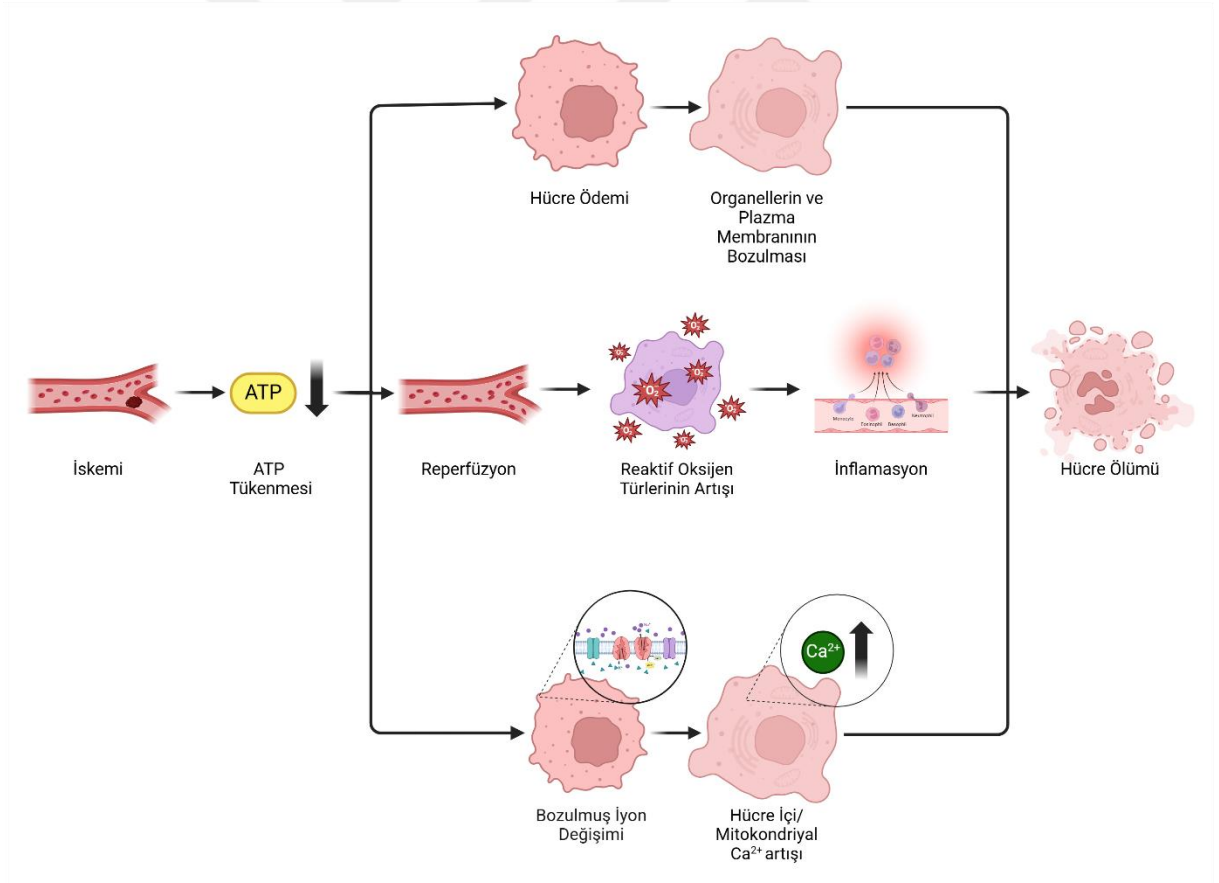
Şekil 1. Damar dokusunun İR hasarının moleküler mekanizması.	1
Şekil 2. Koroner arter bypass cerrahisinde damar greftinin korunması için yaklaşımlar.	2
Şekil 3. Projede uygulanan <i>in vitro</i> soğuk İR protokolü.	4
Şekil 4. Hidrojen sülfürün vasküler İR hasarına karşı koruyucu etki mekanizması.	5
Şekil 5. İzole organ banyosu deneyleri için deneysel gruplara uygulanan İR protokolü.	11
Şekil 6. İzole organ banyosu protokolü.	13
Şekil 7. Biyokimyasal analiz için uygulanan deney protokolü.	14
Şekil 8. Sıçan aort halkalarının fenilefrin uygulamasına verdikleri kasılma cevapları.	17
Şekil 9. Sıçan aort halkalarının KCl uygulamasına verdikleri kasılma cevapları.	18
Şekil 10. Fenilefrin konsantrasyon-cevap eğrileri.	19
Şekil 11. Fenilefrin konsantrasyon-cevap eğrilerine ait E_{max} ve pD_2 değerleri	21
Şekil 12. Asetilkolin konsantrasyon-cevap eğrileri.	22
Şekil 13. Asetilkolin konsantrasyon-cevap eğrilerine ait E_{max} ve pD_2 değerleri	24
Şekil 14. Sodyum nitroprusiyat konsantrasyon-cevap eğrileri.	25
Şekil 15. Sodyum nitroprusiyat konsantrasyon-cevap eğrilerine ait E_{max} ve pD_2 değerleri	27
Şekil 16. Doku malondialdehit, glutatyon ve kaspaz-3 aktiviteleri.	30

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen sıçanların vücut ağırlığı ve yaşı	8
Tablo 2. Deney grupları	9
Tablo 3. Aort halkalarının KCl'e (80 mM) verdikleri net kasılma cevapları	18
Tablo 4. Fenilefrin konsantrasyon-cevap eğrilerine ait pD_2 ve E_{maks} değerleri	20
Tablo 5. Asetilkolin konsantrasyon-cevap eğrilerine ait pD_2 ve E_{maks} değerleri	23
Tablo 6. Sodyum nitroprusiyat konsantrasyon-cevap eğrilerine ait pD_2 ve E_{maks} değerleri	26
Tablo 7. Biyokimyasal olarak ölçülen doku MDA, GSH ve kaspaz-3 aktiviteleri	28

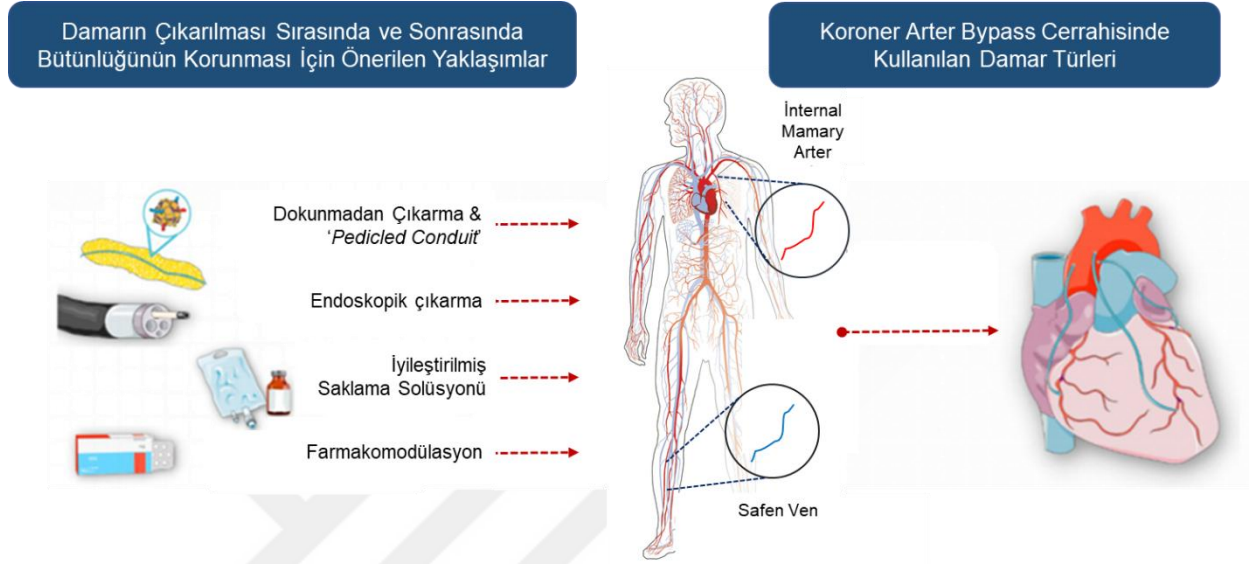
1. GİRİŞ

Koroner arter bypass greft cerrahisi, koroner arter hastalığı ve miyokard iskemisi nedeniyle kalbin bozulan kan dolaşımının düzeltilmesi için yaygın olarak uygulanmaktadır (1). Bu cerrahi sırasında otolog damar grefti olarak sıklıkla kullanılan internal meme arterinin ve safen venin iskemi-reperfüzyon (İR) hasarına maruz kalması, hem kısa hem de uzun dönem cerrahi komplikasyonlara neden olmakta, damar-greft hastalığına neden olarak greftin sağkalımını düşürmektedir (2,3). Kardiyovasküler riskin ve endotel disfonksiyonun arttığı yaşlı popülasyon, otolog damar greftinde oluşan İR hasarının en çok etkilediği hasta grubunu oluşturmaktadır (4–6). Damar dokusunun İR hasarı, hücresel düzeyde ATP tükenmesine bağlı olarak sodyum-potasyum pompasının çalışmaması, hücre içinde kalsiyum birikimi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) açığa çıkması ve inflamasyon sürecinin başlaması gibi mekanizmalar üzerinden damar duvarında ve endotelde hücre ölümüne neden olmaktadır (3,7) (Şekil 1).



Şekil 1. Damar dokusunun İR hasarının moleküler mekanizması (8).

Damar greftinde İR hasarının oluşmasında ve şiddetinde, cerrahi sırasında çıkarılan greftin hedef dokuya implante edilene kadar geçen süre boyunca içinde saklandığı solüsyon belirleyici faktörlerden birisidir (3,9–11). Graftin hasar almaması için gelişen cerrahi teknikler yanında damar saklama (prezervasyon) solüsyonlarının içeriğinin geliştirilmesi de güncel araştırma alanlarındandır (Şekil 2).



Şekil 2. Koroner arter bypass cerrahisinde damar greftinin İR hasarı ve diğer muhtemel hasarlara karşı korunması için, damarın çıkarılması sırasında ve sonrasında önerilen yaklaşımlar (3).

Damar greftine özel saklama solüsyonu için seçenekler sınırlı olup pratikte cerrahın tercihi göre salin, heparinize otolog kan, organ saklama solüsyonları gibi farklı ve standardize olmayan solüsyonlar kullanılmaktadır (10). Damar İR hasarına karşı koruyucu kimyasallarla zenginleştirilmiş damar greftine özel saklama solüsyonlarının geliştirilmesi ihtiyacı devam etmektedir (11). Farklı mekanizmalar üzerinden etki gösteren bazı kimyasalların damar İR hasarına karşı etkinliği preklinik çalışmalarla gösterilmiş olsa da greft saklama solüsyonlarına özel potansiyel madde arayışı devam etmektedir (10–16)(10–15).

1.1. Gerekçe

Organ saklama solüsyonlarına eklenen H₂S donörlerinin solid organların İR hasarına karşı koruyucu etkisi olabileceği gösterilmiş olmasına karşın (17–19), damar grefti saklama solüsyonlarına H₂S donörü eklenmesinin greft İR hasarı üzerine etkisi henüz değerlendirilmemiştir. Bu açıdan potansiyel etkisi olabilecek yavaş salımlı H₂S donörü

GY4137'nin damar grefti saklama solüsyonlarına eklenmesi ya da GYY4137 içeren ve damar greftine özel bir saklama solüsyonunun geliştirilmesi, bu solüsyonların damar dokusunu İR hasarına karşı koruyuculuğunu ve koroner arter bypass cerrahisinin kısa ve muhtemelen uzun vadeli başarısını artırabilir.

1.2. Hipotez ve Amaç

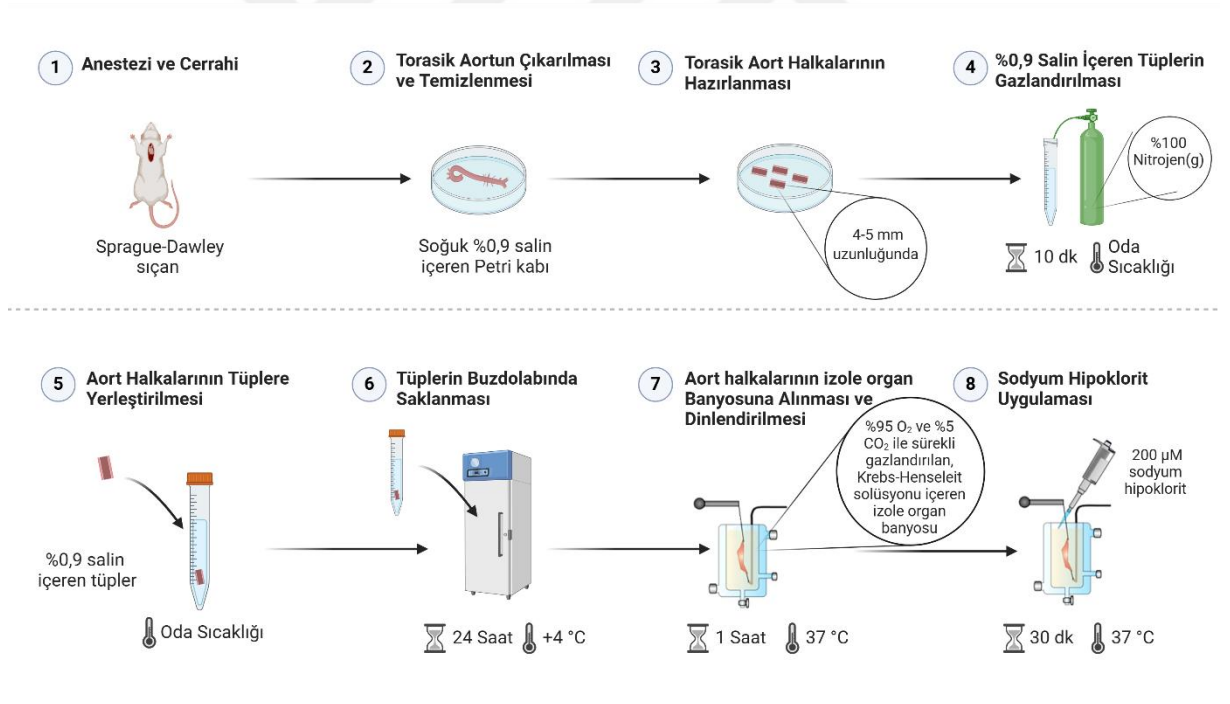
Bu çalışmanın hipotezi “*in vitro* sıçan damar İR hasarı modelinde, yavaş salımlı H₂S donörü olan GYY4137, oksidatif stresi ve apoptozu azaltarak damar düz kasının kasılabilirliği ve endotel fonksiyonları üzerinde koruyucu etki gösterir” şeklindedir.

Çalışmanın amacı, GYY4137'nin damar dokusunda İR hasarını önleme potansiyelini ortaya koymak ve damar koruyucu solüsyonlarda GYY4137'nin kullanımına yönelik ileri deneysel ve klinik çalışmalara dayanak oluşturmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *In Vitro* Soğuk İR Modeli

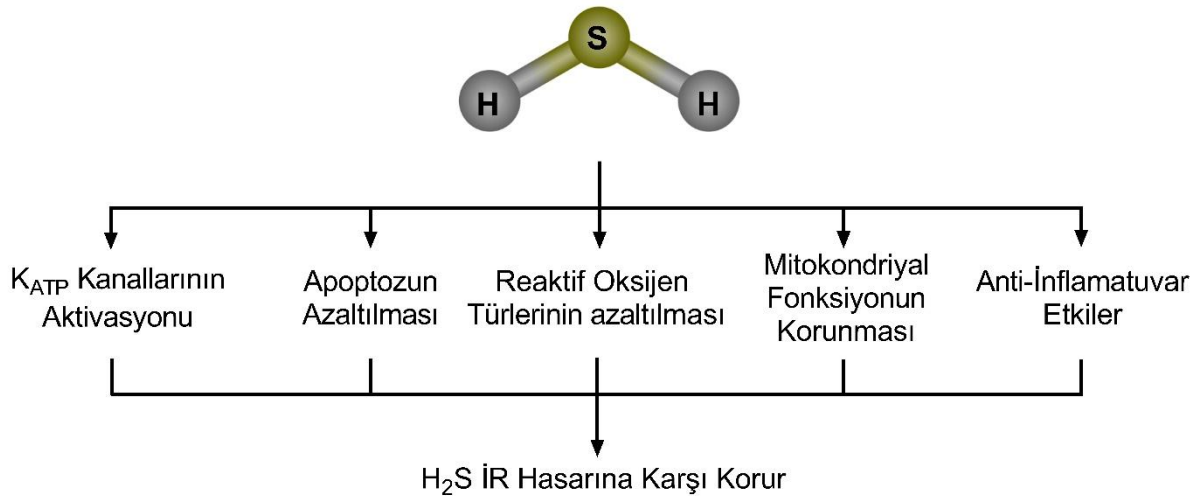
Damar greftinin İR hasarının altında yatan mekanizmaları araştırmak ve bu hasara karşı etkili farmakolojik kimyasalların etkisini değerlendirmek amacıyla literatürde *in vitro* damar İR hasarı modeli sıklıkla kullanılmaktadır (20–22). Bu modelde İR hasarının oluşturulması amacıyla sıçan torasik aortu oksijeni uzaklaştırılmış soğuk ortamda 24 saat saklandıktan sonra (*in vivo* iskemi hasarını taklit etmek için), sodyum hipoklorite maruz bırakılır (*in vivo* reperfüzyon ve yeniden oksijenasyon sırasında oluşan serbest radikal üretimi ve endotel disfonksiyonunu taklit etmek için) (Şekil 3). Kendi laboratuvar koşullarımızda bu modelin uygulanabilirliği ve farklı iskemik koşullarda oluşturulan endotel hasarı, ekibimiz tarafından yakın zamanda değerlendirilmiş ve literatür ile uyumlu olarak *in vitro* soğuk iskemi ve ardından uygulanan reperfüzyon protokolünün endotelial ve kontraktıl disfonksiyon oluşturmak için uygun model olduğu teyit edilmiştir (23).



Şekil 3. Projede uygulanan *in vitro* soğuk İR protokolü.

2.2. İR Hasarı ve Hidrojen Sülfür

Hidrojen sülfür (H_2S), kardiyovasküler sistem üzerinde koruyucu etkileri bilinen endojen bir gazotransmitterdir (24). Vazodilatör, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olan H_2S 'nin, deneysel çalışmalarda damar ve diğer organların İR hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği bildirmiştir (18,19,25,26). H_2S , sarkolemma, iç mitokondriyal membran ve nükleer membranda bulunan ATP'ye duyarlı potasyum kanallarını (K_{ATP}) aktive edebilir (27). Bu kanallar glikoz metabolizmasında rol oynar ve H_2S tarafından uyarılan vazorelaksasyona katkıda bulunur. H_2S , ERK1/2/MAPK ve PI-3-kinaz yollarını aktive ederek anti-apoptotik etkiler gösterir ve kaspaz-3 ve sitokrom C gibi pro-apoptotik proteinlerin inhibisyonuna yol açar. H_2S ayrıca ROS üretimini azaltarak ve mitokondriyal membran potansiyelini ($\Delta\Psi_m$) koruyarak mitokondriyal fonksiyonun korunmasına yardımcı olur (27,28) (Şekil 4). H_2S donörlerinin preklinik soğuk İR modellerinde koruyucu etkilerinin, İR hasarında rol oynayan ROS kaynaklı oksidatif stres, inflamasyon, mikrovasküler disfonksiyon, apoptoz ve diğer potansiyel ancak henüz tanımlanamayan mekanizmaları içeren çok sayıda yolun inhibisyonu yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (29).



Şekil 4. Hidrojen sülfürün (H_2S) vasküler iskemi-reperfüzyon (İR) hasarına karşı koruyucu etkisinin mekanizması.

2.3. Saklama Solüsyonlarında Hidrojen Sülfür

H_2S 'in İR hasarına karşı koruyucu etkisi nedeniyle, organ saklama solüsyonlarına eklenmesi ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır (17,19). Bu çalışmalarda hızlı ve yavaş

salımlı farklı H₂S donörleri denenmiştir. Hızlı salımlı donörlerin etkili olabilmesi için yüksek dozda uygulanmaları gerekmekte, bu durum H₂S'in toksik etkilerini ortaya çıkarabilmektedir (27). Bu nedenle organ saklama solüsyonlarına, yavaş salımlı bir H₂S donörünün eklenmesinin İR hasarına karşı diğer H₂S donörlerine göre daha etkili ve güvenli olacağı öngörülmektedir (17,19). Wang vd. (2016) hücre kültürü üzerinde yaptıkları çalışmada kontrollü ve yavaş H₂S salıveren nanopartiküllerin damar endotel hücrelerini İR hasarına karşı koruduğunu göstermiştir (30). GYY4137 koduyla bilinen “morfolin-4-ium 4-metoksifenil (morfolino) fosfinoditiyoat” deneysel çalışmalarda en sık kullanılan yavaş salımlı H₂S donörüdür (31). Harper vd. (2023) yakın zamanlı çalışmalarında, myeloperoksidaz ve hipokloröz asite maruz kalan domuz koroner arterlerinde GYY4137'nin endotel disfonksiyonuna karşı koruma sağladığını göstermiş (32), GYY4137 gibi yavaş salımlı H₂S donörlerinin, kardiyovasküler hastalıklarda aşırı myeloperoksidaz aktivitesini kontrol etmek için olası bir terapötik seçenek olabileceğini öne sürmüşlerdir. Benzer şekilde GYY4137'nin *in vivo* koşullarda farelerde kardiyak İR hasar modelinde yararlı etkileri Ravani vd. (2023) tarafından gösterilmiştir (33). Ekibimizin yakın dönemde gerçekleştirdiği, farklı H₂S donörlerinin, böbrek İR hasarına karşı etkilerinin değerlendirildiği hayvan çalışmalarının sistematik derlemesi ve meta-analizi, bu hasara karşı etkili olan tek H₂S donörünün GYY4137 olduğunu göstermiştir (34).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Proje no: DA23/26, Karar no: 22/15, Tarih: 21.04.2022). Hayvan deneyleri Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü (USA-NIH) tarafından yayınlanan Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımına ve Bakımına İlişkin Kılavuza (Sekizinci Baskı, The National Academies Press, Washington DC, USA) uygun olarak yapılmıştır.

3.2. *İn Vitro* Soğuk İskemi-Reperfüzyon Modeli

Bu proje Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı işbirliğinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın yöntemi, literatürdeki *in vitro* vasküler İR hasarı modellerine (20–22,35,36) ve kendi laboratuvarımızda ekibimiz tarafından modelin detaylı olarak denendiği ön çalışmaya (23) dayanmaktadır. Özetle bu model, cerrahi koşullarda çıkarılan insan damar greftinde İR hasarına bağlı birkaç saat içinde oluşan endotel disfonksiyonunu taklit etmek için, *in vitro* vasküler İR modelinde sıçan aort dokusunun 24 saat soğuk iskemik ya da hipoksik koşullarda bekletildikten sonra kimyasal olarak reperfüzyon hasarı oluşturulmasına dayanmaktadır (20–22,35,36). Reperfüzyon öncesi iskemik saklama koşulu ile hipoksik saklama koşulunu karşılaştırdığımız ön çalışmamızda, otolog damar greftinin İR hasarını *in vitro* ortamda taklit edecek maksimum endotelyal ve kontraktıl disfonksiyonu elde etmek için, reperfüzyon öncesi iskemik ortamın gerektiğini gösterdik (23). Bu proje, ön çalışmamız ile işlerliğini teyit ettiğimiz *in vitro* vasküler İR modeli üzerinde gerçekleştirildi (Şekil 3).

3.3. Hayvanlar ve Deney Grupları

Damar İR hasarının en sık yaşlı popülasyonda görülmesi nedeniyle çalışmamızda yaşlı sıçanlar kullanıldı. Çalışma için benzer ağırlıktaki (ortalama $\pm$ standart sapma: $378,2 \pm 45,5$ g) 21–22 aylık ($21,7 \pm 0,4$ ay) 20 erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı (Tablo 1). Çalışmamızda sadece erkek Sprague-Dawley sıçanlarının kullanılması, hormonal değişkenleri (örneğin dişilerdeki österus döngüsü) minimize etmek ve sonuçların tutarlılığını artırmak amacıyla tercih edilmiştir. Projeye dahil edilen hayvanların yaşı,

literatüre göre insan yaşı popülasyonuna denk gelen sıçan yaşı dikkate alınarak belirlendi (37).

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen 20 erkek Sprague-Dawley sıçanın başlangıçtaki vücut ağırlığı ve yaşı

Hayvan No.	Vücut Ağırlığı (g)	Yaş (ay)	Hayvan No.	Vücut Ağırlığı (g)	Yaş (ay)
1.	384	22	11.	380	22
2.	405	22	12.	383	22
3.	412	22	13.	288	22
4.	375	22	14.	272	22
5.	374	22	15.	362	21
6.	370	22	16.	410	21
7.	395	22	17.	320	21
8.	378	22	18.	410	21
9.	420	22	19.	406	21
10.	348	22	20.	471	21

Deney hayvanları Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve uyumlanma için standart bakım koşullarında (20–26°C, 40–70% nem, 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü, ad libitum) 1 hafta bekletildikten sonra deneylere başlandı. Çalışmaya dahil edilen 20 sıçandan 11'i organ banyosu deneyleri için, 9'u ise biyokimyasal analizler için kullanıldı. Her bir hayvandan çıkarılan torasik aort halka preparatı şeklinde 4–6 parçaya bölünerek, her bir parça dört deney grubundan birine rastgele atandı (Tablo 2). Rastgele atamanın nedeni, deney gruplarının torasik aort bölümü (segmenti) açısından birbirine benzer olmasını sağlamaktır. Dörtten fazla aort halkası çıkarılması durumunda, kalan aort halkaları, biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere dört grubundan birine rastgele atanır ve aynı protokol uygulandı. Her bir deney grubu, izole organ banyosu deneyleri için 11 farklı hayvandan alınan 11 aort dokusundan, biyokimyasal analizler için ise 9 farklı hayvandan alınan 9 aort dokusundan oluştu.

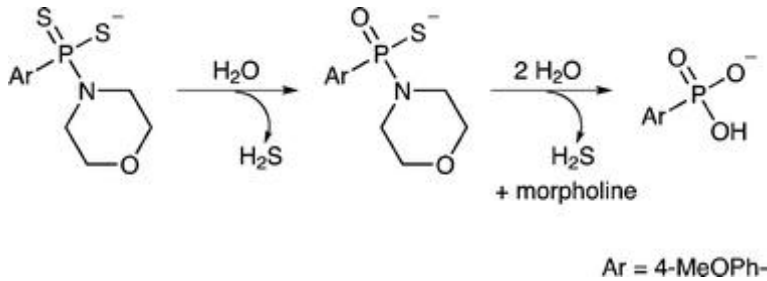
Tablo 2. Deney grupları

Grup No.	Grup Adı	Tanım
Grup 1	Kontrol	Bekletilmeden izole organ banyosu protokolü uygulanan aort halkaları
Grup 2	İR	%0,9 salin içinde bekledikten sonra izole organ banyosu protokolü uygulanan aort halkaları
Grup 3	İR + düşük GYY4137	Düşük konsantrasyon (100 µM) GYY4137 içeren salin içinde bekledikten sonra izole organ banyosu protokolü uygulanan aort halkaları
Grup 4	İR + yüksek GYY4137	Yüksek konsantrasyon (300 µM) GYY4137 içeren salin içinde bekledikten sonra izole organ banyosu protokolü uygulanan aort halkaları

Kontrol grubundaki aort halkaları çıkarıldıktan hemen sonra izole organ banyosuna alınarak damar kasılma ve gevşeme cevapları alındı. İR gruplarına ait aort halkaları ise çıkarıldıktan sonra, İR hasarı oluşturmak amacıyla salin veya salin içinde iki farklı konsantrasyonda GYY4137 içeren tüplerde 24 saat boyunca 4°C sıcaklığındaki buzdolabında saklandı.

3.4. GYY4137 Konsantrasyonu ve Hazırlanması

GY4137 (Sigma-Aldrich, Katalog No. SML2470; St. Louis, MO, ABD) konsantrasyonu literatürdeki hücre kültürü ve diğer *in vitro* çalışmalar esas alınarak belirlendi (38–40). Projede GYY4137'nin suda çözünebilen diklorometan içermeyen sodyum tuzu formu kullanıldı (Kimyasal formül: C₁₁H₁₅NNaO₂PS₂). GYY4137, su ile etkileşime girdiğinde kademeli olarak H₂S gazı açığa çıkaran bir moleküldür (41):



Bu süreçte, su molekülleri GYY4137 yapısındaki sülfür atomlarını kopararak H₂S oluşumuna neden olur (41).

İskemi sürecinde dokuların saklanacağı 5 mL tüplerin hacmi, ve deney sayısı dikkate alınarak 5 mL hacimli 1 mM ve 3 mM'lik GYY4137 çözeltileri hazırlandı. GYY4137'nin suda 2 mg/mL çözünürlüğe sahip olması sayesinde bu konsantrasyonlar kolaylıkla hazırlanabildi. Bu 10 kat konsantre GYY4137 çözeltisinden 500 µL alınarak ayrı ayrı Eppendorf tüplerinde saklandı. Hazırlanan konsantre çözeltiler -20°C'de saklandı; deney öncesinde çözündürüklükten sonra, bu çözeltilerden 500 µL, 4,5 mL %0,9 salin ile karıştırılarak 100 µM ve 300 µM'lik son çözeltiler elde edildi (her Eppendorf tüpü yalnızca bir kez dondurulup çözüldü).

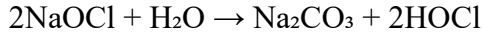
3.5. Cerrahi İşlem ve Aort Halkalarının Hazırlanması

Sıçanlar, intraperitoneal yolla uygulanan 60 mg/kg ketamin ve 7 mg/kg ksilazin ile cerrahi derinliğe uygun genel anestezi altındayken, toraks açılarak aort arkından diyaframa kadar olan torasik aort ekspoze edildi. Torasik aort, çevresindeki yağ ve bağ dokusundan ayrılarak göğüs arka duvarından diseke edilerek serbestleştirildi. Proksimalde aort arkının bitiminden ve distalde diyafram seviyesinden klemp uygulandıktan sonra torasik aort eksize edilerek bir bütün halinde soğuk serum fizyolojik içeren Petri kabına alındı. Sonrasında, endoteli korumaya azami dikkat gösterilerek 4 – 5 mm uzunluğunda aort halkaları kesildi. Bir torasik aortadan 4 – 6 halka elde edildi. İzole organ banyosunda izometrik gerim değişikliği deneylerinin yapılacağı kontrol grubundaki aort halkaları, hemen Krebs-Henseleit solüsyonu ([mM]: NaCl 118,2; KCl 4,7; MgSO₄7H₂O 1,2; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; glukoz 11,1) içeren, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile sürekli gazlandırılıp sıcaklığı 37,4°C'de sabit tutulan organ banyolarına asılarak vasküler kasılma ve gevşeme cevapları alındı.

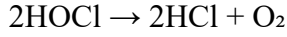
3.6. İskemi-Reperfüzyon Protokolü

İR ve İR + GYY4137 gruplarındaki halkalar, sırasıyla %0,9 salin, %0,9 salin + düşük konsantrasyon GYY4137 ve %0,9 salin + yüksek konsantrasyon GYY4137 içeren deney tüplerine alındı. Solüsyonlardaki oksijeni çıkarmak için %100 nitrojen ile 10 dakika gazlandırıldıktan sonra tüplerin kapakları kapatılarak 24 saat boyunca 4°C'de saklandı. Bu soğuk iskemi süresinin sonunda, 37,4°C'de Krebs-Henseleit solüsyonu içeren ve %95 O₂ gaz karışımı ve %5 CO₂ ile sürekli gazlandırılan organ banyolarına asılan aort halkalarına, *in vivo* reperfüzyon sırasında oluşan serbest radikalleri ve endotelial disfonksiyonu taklit

etmek amacıyla 30 dakika boyunca 200 µM sodyum hipoklorit uygulandı. Sodyum hipoklorit, su ile birleşerek hipokloröz asit oluşturur (42):

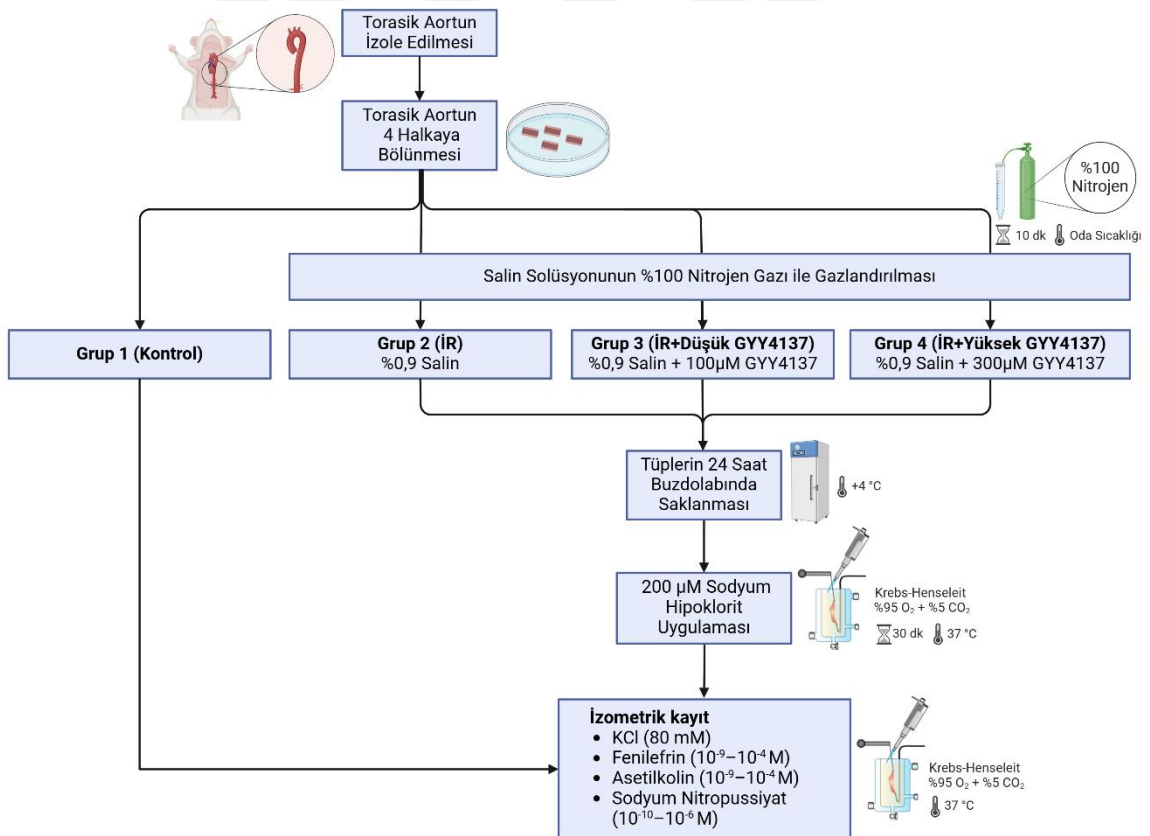


Hipokloröz asit, hızla hidroklorik asit ve serbest oksijen radikallerine dönüşür (42):



Hidroklorik asit ve serbest oksijen radikalleri, hücresel proteinleri bozarak sitotoksik hasara yol açabilir (42).

Reperfüzyon sonrasında banyolar bu maddelerden arındırılmak için yıkanarak (wash-out) taze Krebs-Henseleit solüsyonu ile vasküler izometrik kasılma ve gevşeme cevapları alındı. Deneysel protokol Şekil 5’de özetlenmiştir. Biyokimyasal analiz yapılacak dokular sodyum hipoklorit uygulaması sonrası biyokimya laboratuvarına nakledildi.



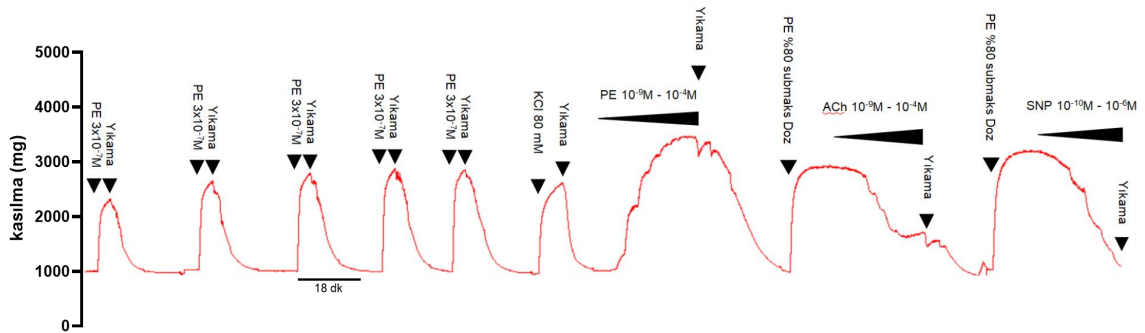
Şekil 5. İzole organ banyosu deneyleri için deneysel gruplara uygulanan İR protokolü (n = 11).

3.7. İzole Organ Banyosu Protokolü

Tüm preparatlar, izole organ banyosunda 1 g gerim altında 60 dakika dinlendirildi ve bu süre boyunca her 15 dakikada bir taze solüsyon ile yıkandı. İzole organ banyosundaki aort preparatlarının banyo içine eklenen maddelere verdiği izometrik kasılma ve gevşeme yanıtları, bilgisayar aracılı bir fizyolojik veri toplama ve kaydetme sistemi (BIOPAC MP100, MAY, Türkiye) kullanılarak kaydedildi.

Dinlenme süresi sonunda sırasıyla aşağıdaki protokoller uygulandı (Şekil 6):

1. Fenilefrin 3×10^{-7} M ile 5 kere uyarılma (sataşma protokolü)
2. KCl (80 mM) kasılma cevabı
3. Fenilefrinin artan konsantrasyonları (10^{-9} – 10^{-4} M) ile oluşan kasılma cevabı (KCl kasılmasının yüzdesi) ve submaksimal kasılma yanıtını (maksimum fenilefrin kasılma yanıtının en az %80'i) oluşturan fenilefrin konsantrasyonunun belirlenmesi
4. Asetilkolinin artan konsantrasyonları (10^{-9} – 10^{-4} M) ile oluşan endotele bağlı gevşeme cevabı, —Submaksimal kasılma yanıtını oluşturan fenilefrin konsantrasyonu ile ön kasılma sonrasında, artan asetilkolin konsantrasyonlarıgevşeme yanıtı (submaksimal fenilefrin ile oluşturulan ön kasılmanın yüzdesi olarak)
5. Sodyum nitroprusiyatın artan konsantrasyonları (10^{-10} – 10^{-6} M) ile oluşan endotelden bağımsız gevşeme cevabı Submaksimal kasılma yanıtını oluşturan fenilefrin konsantrasyonu ile ön kasılma sonrasında, artan sodyum nitroprusiyatın konsantrasyonlarına bağlı gevşeme yanıtı (submaksimal fenilefrin ile oluşturulan ön kasılmanın yüzdesi olarak)



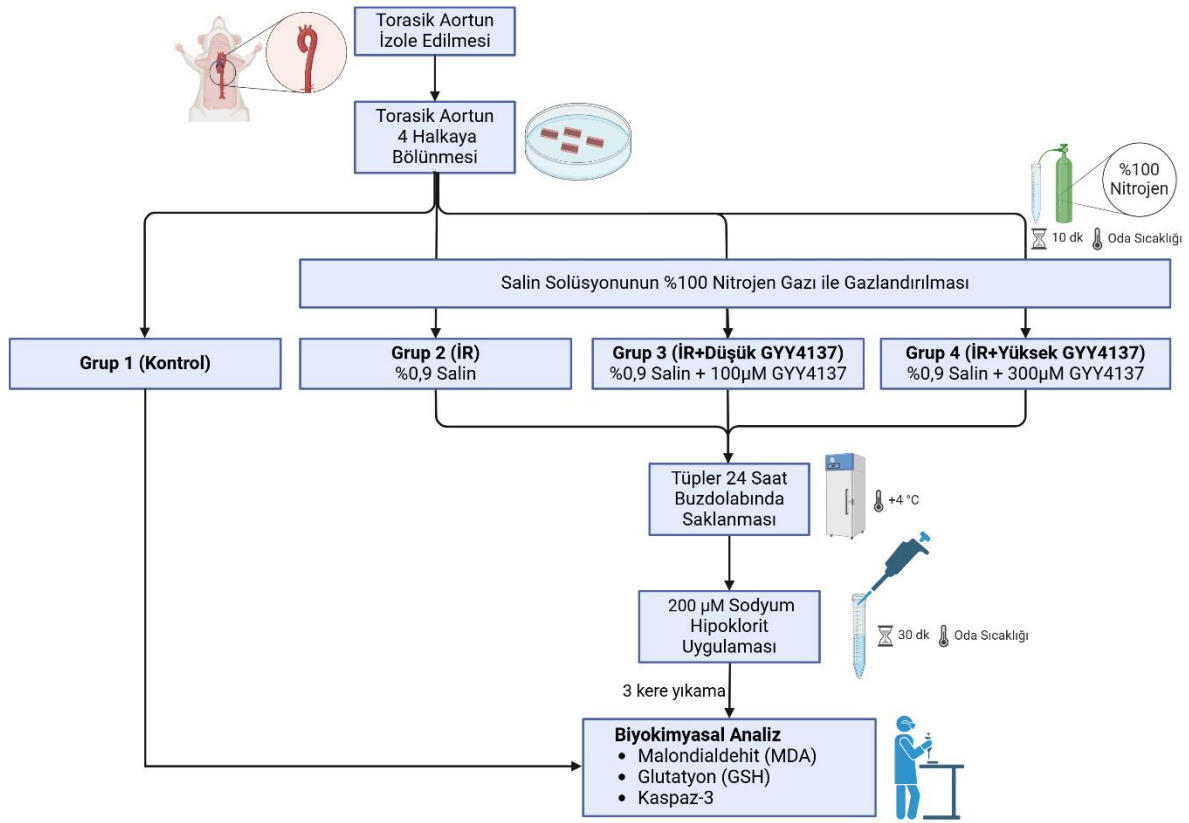
Şekil 6. Sıçan izole aort preparatı ile izole organ banyosu düzeneğinde gerçekleştirilen izometrik gerim değişikliği deneylerinin protokolünü gösteren sıkıştırılmış trase örneği (ACh: asetilkolin, KCl: potasyum klorür, PE: fenilefrin, SNP: sodyum nitroprusiyat).

İzole organ banyosu deneylerine başlamadan önce, ön deneylerimize dayanarak dokular fenilefrin (3×10^{-7} M) ile beş kez uyarıldı. Her bir fenilefrin uygulaması sonrasında dokular en az 3 kez yıkandı ve bazal gerilime dönmeleri sağlandı. Bu uygulamanın amacı, doku yanıtlarının istikrarlı hale gelerek dengelenmesidir. Çünkü İR hasarı oluşturulan dokularda, ardışık fenilefrin uygulamaları ile oluşturulan kasılma yanıtları beşinci uygulama ile plato oluşturarak maksimum düzeyine ulaşmaktadır. Bu şekilde, aort halkalarının yanıtlarının stabil olması ve deneysel sonuçların güvenilirliğinin artırılması sağlandı.

Fenilefrin ile elde edilen izometrik kasılma cevabı, verilerinin sunumunda standart sağlamak amacıyla yanıtlar 80 mM KCl kasılmasının yüzdesi olarak ifade edildi. Erdoğan vd.'nin (2020) belirttiği gibi (43), damar halkaları kullanılarak yapılan izole organ banyosu deneylerinde kasılma cevabının KCl'ye göre yüzdelenmesi reseptör duyarlılığındaki değişiklikleri yansıtırken; doku uzunluğu, çapı veya ağırlığına göre düzeltilen kasılma cevabı reseptör duyarlılığı ile ilişkili değildir. Bu nedenle, elde edilen kasılma cevabı üzerinde doku miktarına göre herhangi bir düzeltme uygulanmadı.

3.8. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler, 9 sıçandan elde edilen aort halkaları üzerinde Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı. Şekil 7'de gösterildiği gibi, bu aort halkalarına çalışma gruplarına uygun olarak İR protokolü uygulandı. İzole organ banyosu deneyleri yapılmaksızın, oksidatif stres belirteci olarak malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) doku düzeyleri ile apoptoz belirteci olarak kaspaz-3 düzeyi belirlendi.



Şekil 7. Biyokimyasal analiz için 9 adet sıçandan alınan aort halkalarına uygulanan deney protokolü.

Dokular, 0,15 M potasyum klorür içinde cam-cam homojenizatör kullanılarak (1/10; w/v) homojenize edildi. MDA düzeyleri, Buege ve Aust'un (1978) yöntemi ile belirlendi (44); bu yöntem, MDA'nın tiyobarbitürik asit ile yaptığı kompleksin kolorimetrik ölçümüne dayanmaktadır. Homojenat örnekleri, 0,13 mM tiyobarbitürik asit ve %7,5 (v/v) trikloroasetik asit içeren çözeltiyle kaynar su banyosunda 15 dakika inkübe edildikten sonra soğutulup, 1500 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatantların absorbansı 535 nm'de ölçüldü. MDA düzeyleri molar ekstinksiyon katsayısı ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı ve nmol/g doku olarak ifade edildi.

GSH düzeyleri, Ellman'ın (1959) sülfidril grup analizi yöntemiyle belirlendi (45). Homojenat örnekleri %1,67 metafosforik asit ile deproteinizasyona tabi tutuldu, ardından 4°C'de 1500g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantın Ellman belirteciyle oluşturduğu renkli kompleksin absorbansı 412 nm'de ölçüldü. GSH düzeyleri, standart eğri kullanılarak hesaplandı ve nmol/g doku olarak ifade edildi. GYY4137'nin GSH düzeylerini etkileme potansiyeli dikkate alınarak, aynı hayvan grubunda çıkarılan aort

halkaları, İR protokolü uygulanmadan 300 μ M GYY4137'ye 1 saat maruz bırakıldı ve GSH düzeyleri belirlendi.

Kaspaz-3 düzeyleri , ticari olarak temin edilen ELISA kitleri (BT LAB, Zhejiang, Çin; Katalog No. E1648Ra) kullanılarak ölçüldü. Her bir örnek için çift çalışma yapıldı ve biyokimyasal değerlendirmeyi yapan araştırmacı deney gruplarına kör bırakıldı.

3.9. İstatistiksel Analiz

3.9.1. Örneklem Büyüklüğü

Deneysel birimin “sıçan” olduğu çalışmamızda, literatüre göre gözlenmesi beklenen geniş etki büyüklüğünü (Cohen's $d = 1,5$), bağımlı çalışma gruplarında 0,05 anlamlılık düzeyinde %80-90 güç ile çift-yönlü test ile belirlemek için gereken örneklem büyüklüğü organ deneyleri için grup başına 11; biyokimyasal analizler için grup başına 9 olarak belirlenmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için p değeri üzerinde Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır. İzole organ banyosu deneyleri sırasında, 300 μ M GYY4137 grubundaki bir aorta halkası, organ askısına takılırken hasar aldığı için ölçüm yapılamamıştır. Bu nedenle, organ banyosu bulguları diğer gruplarda 11 örnek kullanılarak değerlendirilirken, 300 μ M GYY4137 grupta sadece 10 örnek üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Örneklem büyüklüğü, G*power (Versiyon 3.1.9.6, Almanya) paket programında hesaplanmıştır (46).

3.9.2. Veri Analizi

Çalışmada elde edilen veriler, uygun tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma, ortalamanın standart hatası [SEM], aralık, güven aralığı [GA]) ile özetlenerek tablo ve şekillerle sunuldu. Kasılma ve gevşeme için konsantrasyon-cevap eğrilerinden doğrusal olmayan regresyon analizi kullanılarak maksimum etki (E_{maks}) ve maksimum etkinin yarısını oluşturan konsantrasyonun negatif logaritması ($-\log EC_{50}$, pD_2) hesaplandı. KCl cevabı ve konsantrasyon-cevap eğrilerinden elde edilen E_{maks} ve pD_2 değerleri açısından gruplar arasındaki farklar, normal dağılıma uyan veriler için bağımlı gruplar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi kullanılarak değerlendirildi ve ardından çoklu karşılaştırmalar için Dunnett'in post-hoc testi kullanıldı. Normal dağılım, Shapiro-Wilk normallik testi ile değerlendirildi. İki yönlü ANOVA testi kullanılarak, gruplar arasında tekrarlanan fenilefrin sataşmasına ait (faktörler: çalışma grupları ve tekrar sayısı); fenilefrin, asetilkolin ve sodyum nitroprusiyat cevap eğrileri (faktörler: çalışma grupları ve ilaç konsantrasyonu) karşılaştırıldı.

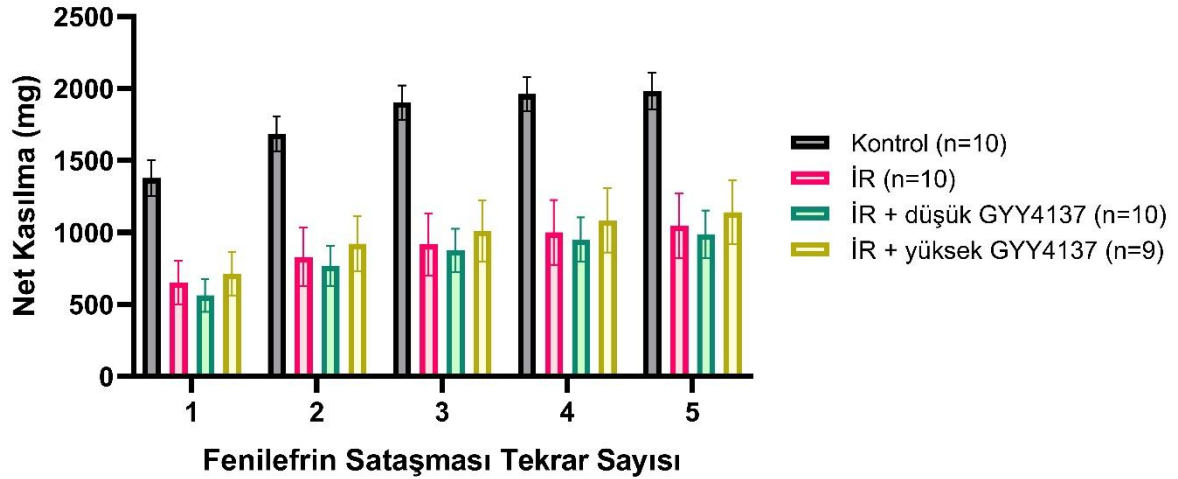
Biyokimyasal analizlerin güvenilir olarak yapılabilmesi için doku miktarını artırmak amacıyla her bir çalışma grubunda 9 hayvandan elde edilen dokular birleştirildi. Bu nedenle her bir biyokimyasal parametre için grup başına 9 hayvana ait tek bir ortalama ölçüm sonucu elde edildi. Öngörülen Cohen's d (1,5) ve örneklem büyüklüğü ($n = 9$) dikkate alınarak gruba özel ve genel standart sapma hesaplandı. Bu veriler kullanılarak gruplararası karşılaştırmalar Friedman's test, ikili post-*hoc* karşılaştırmaları Wilcoxon signed-rank testi ile yapıldı. Biyokimyasal veriler üzerindeki analizler “reshape2” paketi (47) kullanılarak R programlama dili (versiyon 4.3.1, R Core Team, 2024) üzerinde yapıldı (48).

Diğer analizler GraphPad Prism (versiyon 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, A.B.D.) yazılımında yapıldı ve istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Sıçan İzole Aort Preparatında İzometrik Gerim Değişikliği Yanıtlarının Optimizasyonu (Fenilefrin Sataşması)

İzole organ banyosu düzeneğindeki izometrik gerim değişikliği yanıtlarının tutarlılığını ve tekrarlanabilirliğini sağlamak ve varyasyonları minimize etmek amacıyla, submaksimal dozda (3×10^{-7} M) fenilefrin 5 kez ardışık olarak uygulanmıştır (Her uygulama arasında en az 3 kez yıkama yapıldı). Tüm fenilefrin uygulamalarında İR gruplarında elde edilen net kasılmanın Kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az olduğu, tüm gruplarda artan tekrarlar fenilefrin kasılma cevabının arttığı görülmüştür (çalışma grupları için $p = 0,0022$, tekrar sayısı için $p < 0,0001$; Şekil 8). Fenilefrin 5 kez uygulandıktan sonra aort halkalarının net kasılması kontrol grubunda %30,3 (%95 GA: %18,6–%41,9), İR grubunda %43,6 (%31,2–%56,0), İR + düşük GYY4137 (100 μ M) grubunda %48,9 (%35,0–%62,0) ve İR + yüksek GYY4137 (300 μ M) grubunda %35,1 (%24,1–%46,1) artmıştır. Fenilefrin yanıtları kontrol grubunda üçüncü uygulamadan sonra, İR gruplarında ise dördüncü uygulamadan sonra stabilize olmuştur.



Şekil 8. Deney gruplarındaki sıçan izole aort halkalarının tekrarlanan fenilefrin (3×10^{-7} M) sataşmasına verdikleri kasılma cevapları, her uygulamada İR gruplarındaki cevaplar Kontrol gruplarına göre daha az olmuş, tüm gruplarda artan uygulama sayısı ile kasılma cevabı artmıştır (çalışma grupları faktörü için $p = 0,0022$, tekrar sayısı faktörü için $p < 0,0001$, iki yönlü ANOVA). Dokular her kasılmadan sonra en az üç kez yıkılarak bazal gerimine geri dönmeleri sağlanmıştır. Veri noktaları ve hata çubukları ortalama $\pm$ SEM'i temsil etmektedir. İR: İskemi-reperfüzyon.

4.2 KCl Yanıtları

Sıçan aort halkalarının KCl'e (80 mM) kasılma cevapları gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir ($p < 0,0001$; Tablo 3).

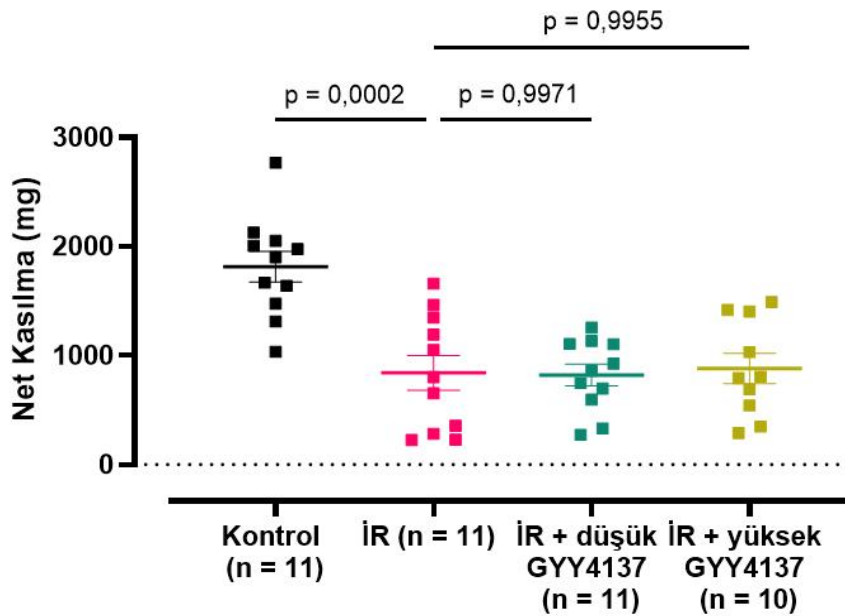
Tablo 3. Çalışma gruplarındaki izole aort halkalarında KCl (80 mM) ile elde edilen kasılma cevapları

	Kontrol (n = 11)	İR (n = 11)	İR + düşük GY4137 (100 µM) (n = 11)	İR + yüksek GY4137 (300 µM) (n = 10)	p değeri ^a
KCl'e (80 mM) net kasılma cevabı (mg)	1815 ± 140	842 ± 160	821 ± 98	881 ± 139	< 0,0001

^aTek yönlü ANOVA

Değerler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur.

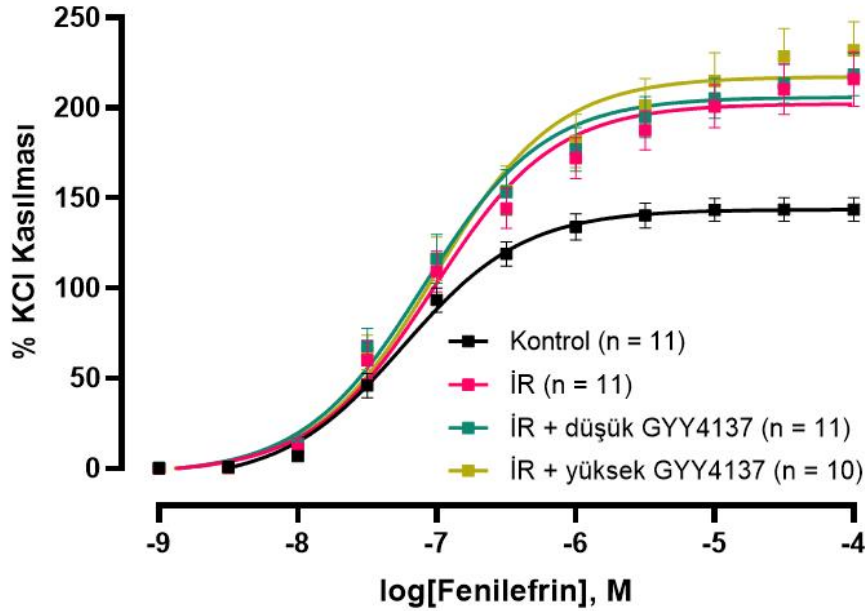
İn vitro soğuk İR modeli, KCl uygulamasına Kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az net kasılma cevabı vermiş ($p = 0,0003$), İR modelinde GY4137'nin düşük ya da yüksek konsantrasyonda uygulanması azalan kasılma cevabını düzeltmemiştir (sırasıyla $p = 0,9971$, $p = 0,9955$; Şekil 9).



Şekil 9. Sıçan izole aort halkalarının KCl (80 mM) uygulamasına verdiği kasılma cevapları gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir ($p < 0,0001$, tek yönlü ANOVA). Deney gruplarının ikili karşılaştırmalarına ilişkin p değerleri şekil üzerinde verilmiştir (Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi). Yatay çizgi ve hata çubukları ortalama ± SEM'i temsil etmektedir; noktalar her bir deneye ait verilerdir. İR: İskemi-reperfüzyon.

4.3 Fenilefrin Konsantrasyonuna Bağlı Kasılma Cevapları

Deney gruplarına ait fenilefrin konsantrasyon-cevap eğrileri istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir ($p < 0,0001$, doğrusal olmayan regresyon analizi; Şekil 10).



Şekil 10. Sıçan izole aort halkalarına ait fenilefrin konsantrasyonuna bağlı kasılma cevapları eğrileri istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir ($p < 0,0001$, doğrusal olmayan regresyon analizi). Veri noktaları ve hata çubukları ortalama $\pm$ SEM'i temsil etmektedir. İR: İskemi-reperfüzyon.

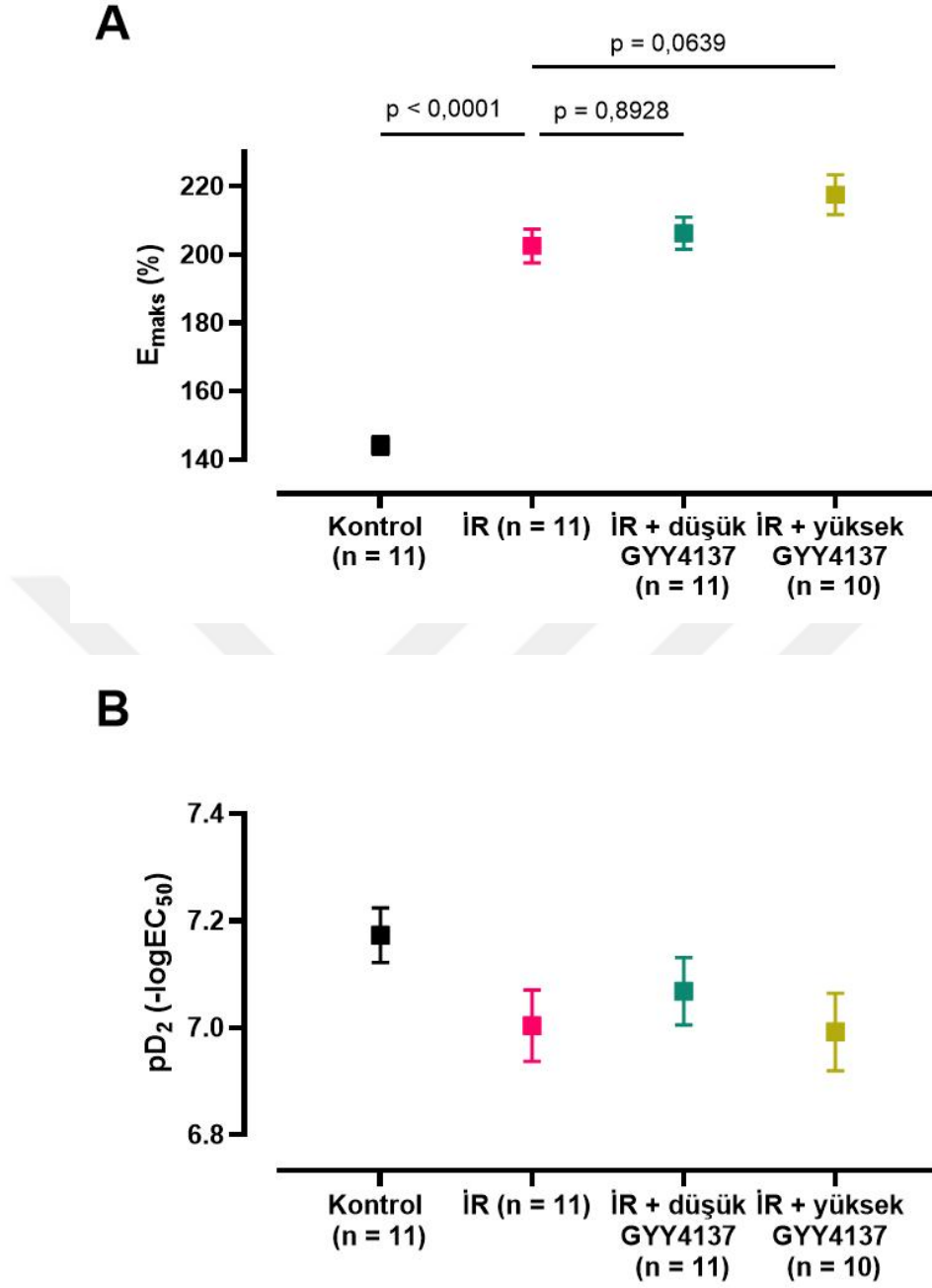
Gruplara ait fenilefrin konsantrasyon-cevap eğrilerinin E_{maks} ve pD_2 değerleri doğrusal olmayan regresyon analizi ile karşılaştırıldığında, pD_2 değerinin gruplar arasında anlamlı fark göstermediği ($p = 0,1652$), ancak E_{maks} değeri açısından grupların anlamlı olarak farklı olduğu ($p < 0,0001$) kaydedilmiştir (Şekil 11, Tablo 4). İR hasarı E_{maks} değerini anlamlı olarak artırmış ($p < 0,0001$, Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi); düşük ve yüksek konsantrasyonda GYY4137 uygulamış olması ise artmış E_{maks} değerini etkilememiştir (sırasıyla $p = 0,8928$, $p = 0,0639$; Şekil 11).

Tablo 4. Gruplara ait fenilefrin konsantrasyon-cevap eğrilerinin doğrusal olmayan regresyon analizinde hesaplanan pD_2 ve E_{maks} değerleri

Fenilefrin Konsantrasyon- Cevap Eğrisi	Kontrol (n = 11)	İR (n = 11)	İR + düşük GY4137 (100 μ M) (n = 11)	İR + yüksek GY4137 (300 μ M) (n = 10)	p değeri ^a
pD_2 (-logEC ₅₀)	7,17 $\pm$ 0,05	7,00 $\pm$ 0,06	7,06 $\pm$ 0,06	6,99 $\pm$ 0,07	0,1652
E_{maks} (%KCl kasılması)	144,15 $\pm$ 2,64	202,25 $\pm$ 4,98	206,33 $\pm$ 4,74	217,63 $\pm$ 5,83	< 0,0001

^aTek yönlü ANOVA

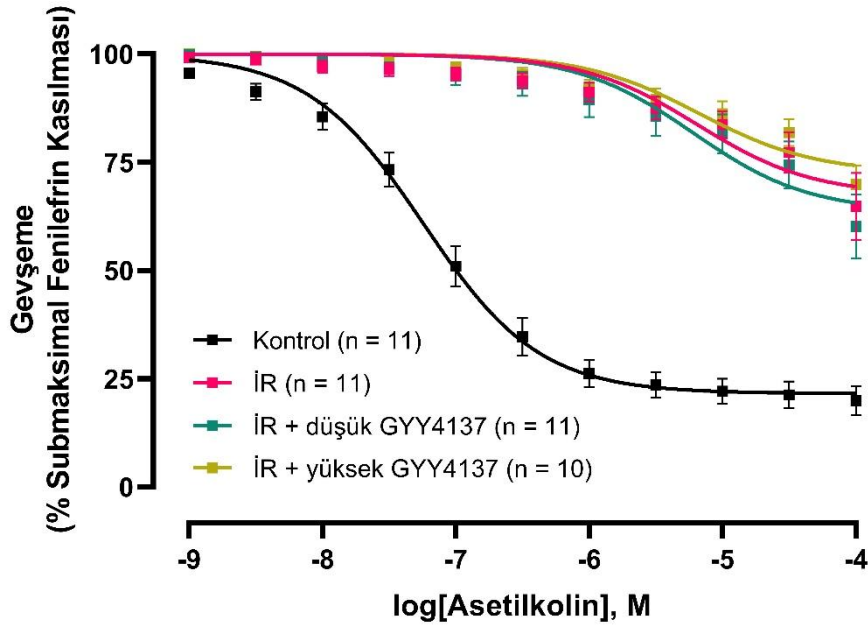
Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur.



Şekil 11. Doğrusal olmayan regresyon kullanılarak analiz edilen fenilefrin konsantrasyon-cevap eğrilerinden elde edilen E_{maks} (A) ve pD_2 (B) değerleri. E_{maks} değerleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterirken ($p < 0,0001$, tek yönlü ANOVA), pD_2 değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p = 0,1652$, tek yönlü ANOVA). E_{maks} değerleri için grupların ikili karşılaştırması, Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi ile yapılmış ve elde edilen p değerleri şekil üzerinde verilmiştir. Veri noktaları ve hata çubukları ortalama $\pm$ SEM'i temsil etmektedir. İR: İskemi-reperfüzyon.

4.4 Asetilkolin Konsantrasyonuna Bağlı Gevşeme Cevapları

Asetilkolin ile oluşan konsantrasyonuna bağlı gevşeme cevapları, deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir ($p < 0.0001$, doğrusal olmayan regresyon analizi; Şekil 12).



Şekil 12. Sıçan izole aort halkalarına ait asetilkolin konsantrasyon-cevap eğrileri istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir ($p < 0.0001$, doğrusal olmayan regresyon analizi). Veri noktaları ve hata çubukları ortalama $\pm$ SEM'i temsil etmektedir. İR: İskemi-reperfüzyon.

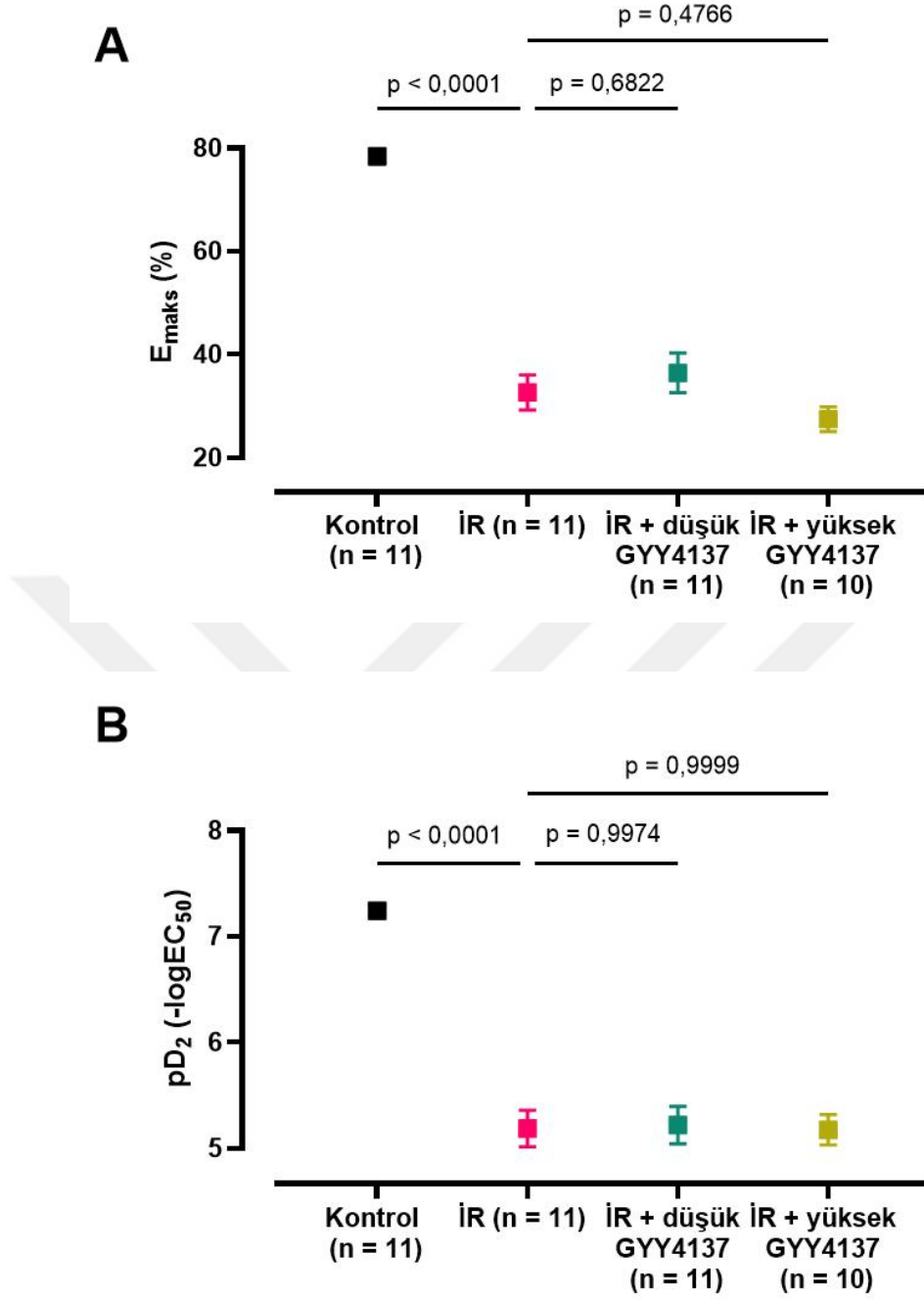
Gruplara ait asetilkolin konsantrasyon-cevap eğrilerinin E_{maks} ve pD_2 değerleri gruplar arasında anlamlı fark göstermiştir (her ikisi için $p < 0.0001$; Tablo 5, Şekil 13). İR hasarı, hem E_{maks} hem de pD_2 değerlerini anlamlı olarak azalmış (her iki parametre için $p < 0.0001$, Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi); ancak düşük ve yüksek konsantrasyonda GYY4137 uygulanmış olması, düşen E_{maks} ve pD_2 değerlerini etkilememiştir (E_{maks} için sırasıyla $p = 0.6822$, $p = 0.4766$; pD_2 için sırasıyla $p = 0.9974$, $p = 0.9999$; Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi; Şekil 13).

Tablo 5. Asetilkolin konsantrasyon-cevap eğrilerinden doğrusal olmayan regresyon analizi ile elde edilen pD_2 ve E_{maks} değerleri

			İR + düşük	İR + yüksek	p value ^a
			GY4137	GY4137	
Asetilkolin			(100 µM)	(300 µM)	
Konsantrasyon-Cevap	Kontrol	İR			
Eğrisi	(n = 11)	(n = 11)	(n = 11)	(n = 10)	
pD_2 (-logEC ₅₀)	7,24 ± 0,05	5,18 ± 0,17	5,21 ± 0,17	5,17 ± 0,14	< 0.0001
E_{maks}					
(% fenilefrin kasılması)	78,40 ± 1,46	32,62 ± 3,40	36,43 ± 3,85	27,47 ± 2,40	< 0.0001

^aTek yönlü ANOVA

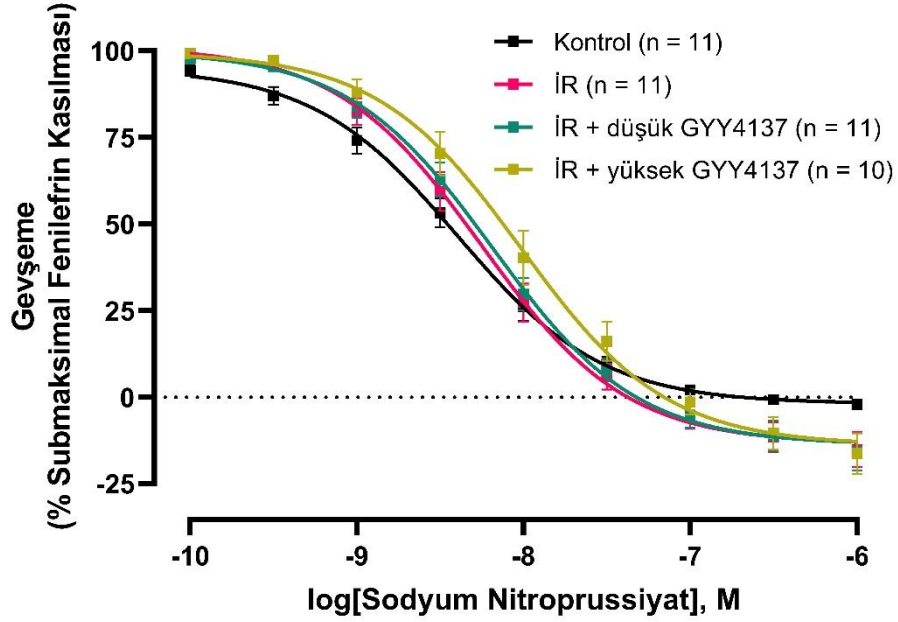
Değerler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur.



Şekil 13. Sıçan izole aort halkalarına ait doğrusal olmayan regresyon kullanılarak analiz edilen asetilkolin konsantrasyon-cevap eğrilerinden elde edilen E_{max} (A) ve pD₂ (B) değerleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir (her ikisi için p < 0,0001, tek yönlü ANOVA). Grupların ikili karşılaştırması, Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi ile yapılmış ve elde edilen p değerleri şekil üzerinde verilmiştir. Veri noktaları ve hata çubukları ortalama ± SEM'i temsil etmektedir. İR: İskemi-reperfüzyon.

4.5 Sodyum Nitroprusiyat Konsantrasyonuna Bağlı Gevşeme Cevapları

Sodyum nitroprusiyat ile oluşan konsantrasyona bağlı gevşeme cevapları, deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir ($p < 0,0001$, doğrusal olmayan regresyon analizi; Şekil 14).



Şekil 14. Sıçan izole aort halkalarına ait sodyum nitroprusiyat konsantrasyon-cevap eğrileri istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir ($p < 0,0001$, doğrusal olmayan regresyon analizi). Veri noktaları ve hata çubukları ortalama $\pm$ SEM'i temsil etmektedir. İR: İskemi-reperfüzyon.

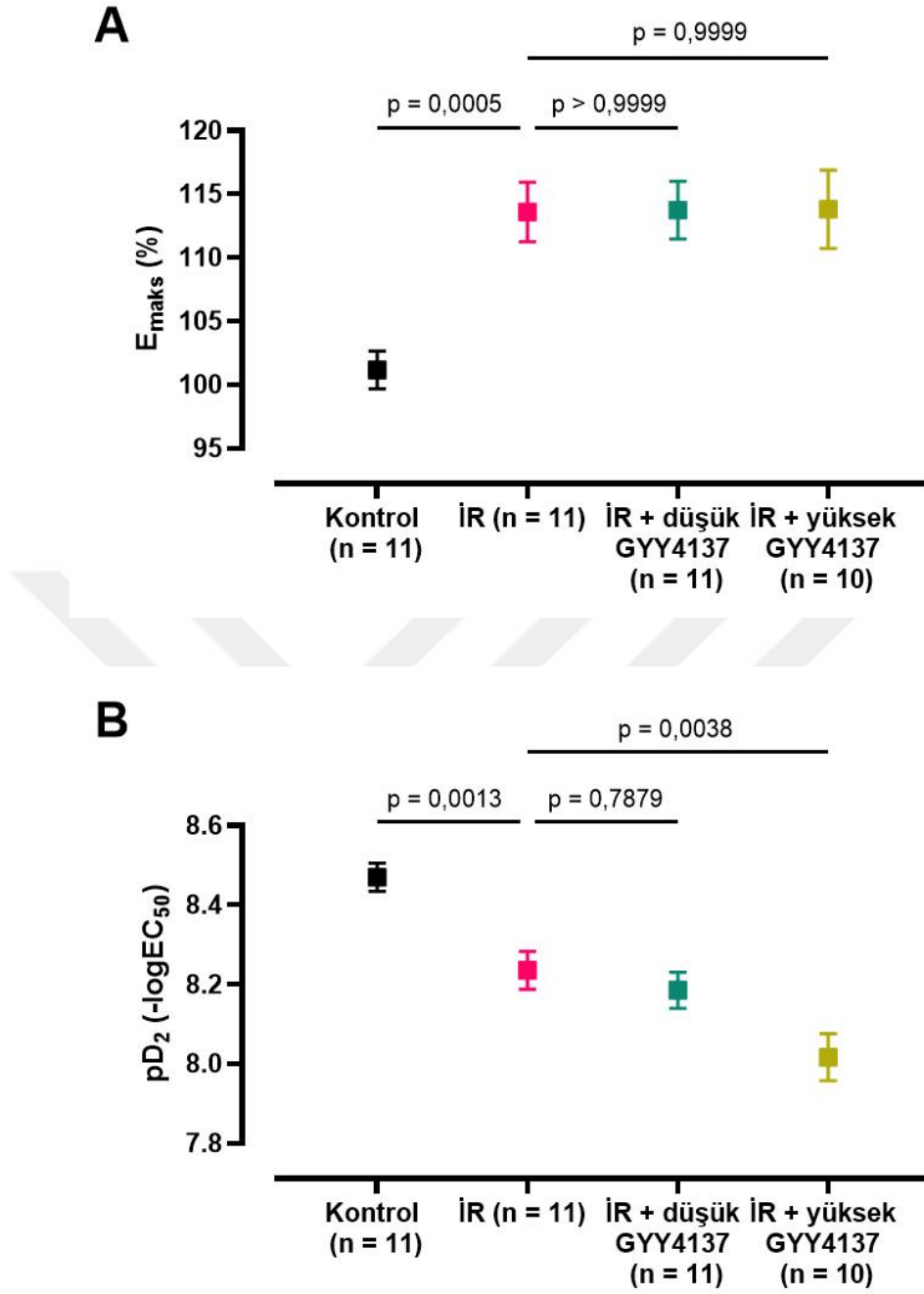
Sodyum nitroprusiyat konsantrasyon-cevap eğrilerinden elde edilen E_{maks} ve pD_2 değerleri gruplar arasında anlamlı bir fark göstermiştir (her iki grup için $p < 0,0001$; Tablo 6, Şekil 15). İR hasarı E_{maks} değerini artırırken ($p = 0,0005$, Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi), pD_2 değerini anlamlı olarak azalmıştır ($p = 0,0013$, Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi) (Şekil 15). Düşük ve yüksek konsantrasyonda GYY4137 ön-uygulaması, artan E_{maks} değerini etkilememiştir (sırasıyla $p > 0,9999$, $p = 0,9999$; Şekil 15). Diğer taraftan düşük konsantrasyonda GYY4137 ön-uygulaması, İR hasarı sonucu düşen pD_2 değerini etkilemezken ($p = 0,7879$, Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi; Şekil 15), yüksek doz GYY4137 ön-uygulaması pD_2 değerini daha da azalmıştır ($p = 0,0038$, Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi; Şekil 15).

Tablo 6. Sodyum nitroprusiyat konsantrasyon-cevap eğrilerinden doğrusal olmayan regresyon analizi ile elde edilen pD_2 ve E_{maks} değerleri

		İR + düşük		İR + yüksek	
		GY4137		GY4137	
		(100 μ M)		(300 μ M)	
Sodyum Nitroprusiyat					
Konsantrasyon-Cevap	Kontrol	İR			
Eğrisi	(n = 11)	(n = 11)	(n = 11)	(n = 10)	p değeri ^a
pD_2 (-logEC ₅₀)	8,46 $\pm$ 0,03	8,23 $\pm$ 0,04	8,18 $\pm$ 0,04	8,01 $\pm$ 0,05	< 0,0001
E_{maks}					
(% fenilefrin kasılması)	101,40 $\pm$ 1,47	113,60 $\pm$ 2,33	113,73 $\pm$ 2,26	113,80 $\pm$ 3,08	< 0,0001

^aTek yönlü ANOVA

Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur.



Şekil 15. Sıçan izole aort halkalarına ait doğrusal olmayan regresyon kullanılarak analiz edilen sodyum nitroprusiyat konsantrasyon-cevap eğrilerinden elde edilen E_{maks} (A) ve pD_2 (B) değerleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir (her ikisi için $p < 0,0001$, tek yönlü ANOVA). Grupların ikili karşılaştırması, Dunnett'in çoklu karşılaştırma test ile yapılmış ve elde edilen p değerleri şekil üzerinde verilmiştir. Veri noktaları ve hata çubukları ortalama $\pm$ SEM'i temsil etmektedir. İR: İskemi-reperfüzyon.

4.6 MDA, GSH ve Kaspaz-3 Doku Düzeyleri

MDA düzeyleri, gruplar arasında anlamlı bir fark göstermiştir ($p = 0,010$, Tablo 7, Şekil 16A). İR hasarı, kontrol grubuna kıyasla MDA seviyelerini artırmış ($p = 0,020$); GYY4137'nin her iki konsantrasyonu da ($100 \mu\text{M}$ ve $300 \mu\text{M}$), İR hasarına bağlı artmış MDA düzeylerini azaltmıştır (sırasıyla $p=0,008$ ve $p=0,012$, Şekil 16A).

Benzer olarak GSH düzeyleri gruplar arasında fark göstermiştir ($p = 0,010$, Tablo 7, Şekil 16B). Şam grubu, İR protokolü uygulanmadan $300 \mu\text{M}$ GYY4137'ye 1 saat maruz bırakıldı ve GSH düzeyleri kontrol grubuna göre değişmemiştir ($p = 0,203$). İR hasarı GSH seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaltmıştır ($p = 0,012$). Düşük doz GYY4137 İR sonrası azalan GSH düzeylerini etkilemezken ($p = 0,301$), yüksek doz GYY4137 İR hasarına bağlı azalan GSH düzeylerini anlamlı olarak düzeltmiştir ($p=0,004$, Şekil 16B).

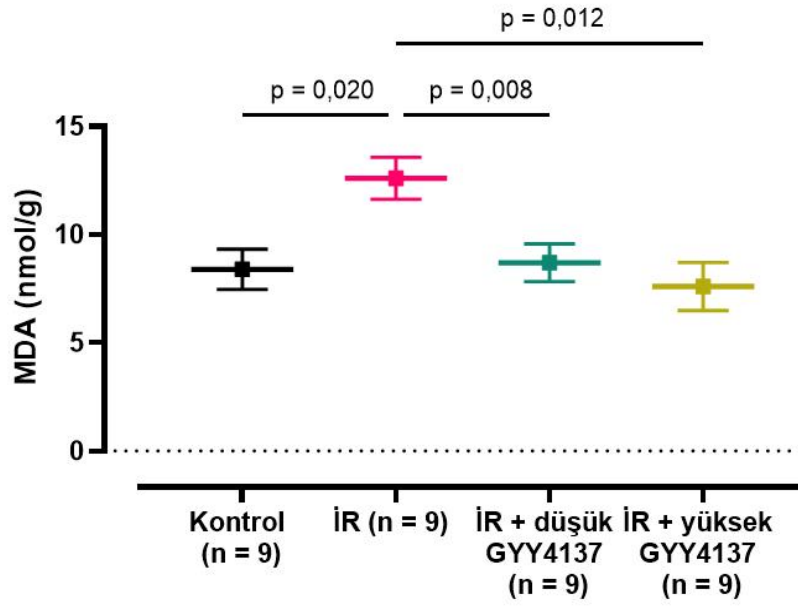
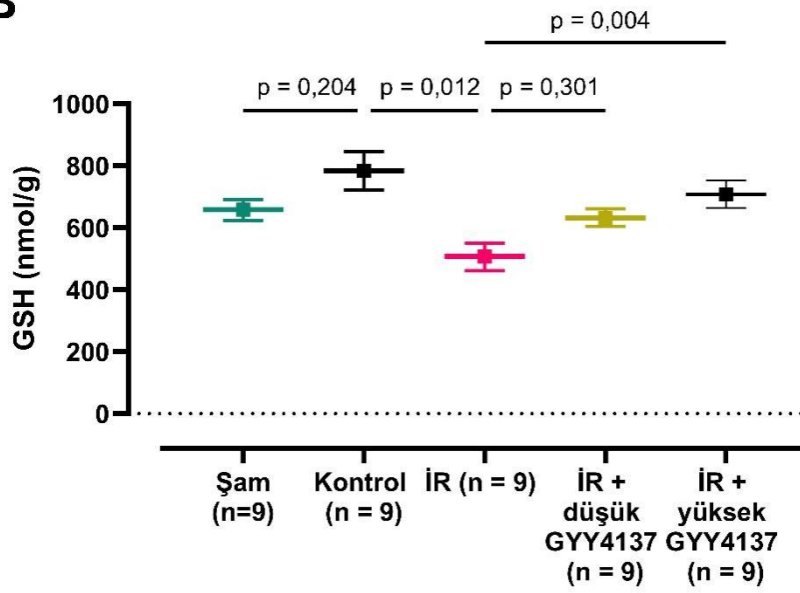
Gruplar arasında kaspaz-3 düzeyleri açısından da anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0,003$, Tablo 7, Şekil 16C). İR hasarı, kontrol grubuna kıyasla kaspaz-3 seviyelerini anlamlı bir şekilde artırmış ($p = 0,020$), bu artış düşük ve yüksek doz GYY4137 ile geri çevrilmiştir (sırasıyla $p = 0,004$ ve $p = 0,020$, Şekil 16C).

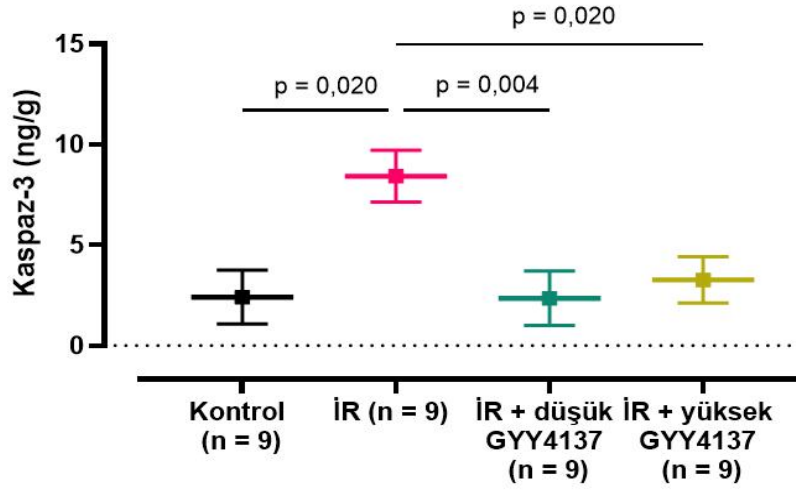
Tablo 7. Deney gruplarındaki torasik aort dokusunda ölçülen malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) ve kaspaz-3 düzeyleri

	Kontrol (n = 9)	İR (n = 9)	İR + düşük GY4137 (100 μM) (n = 9)	İR + yüksek GY4137 (300 μM) (n = 9)	p değeri ^a
MDA (nmol/g)	8,4 $\pm$ 0,9	12,6 $\pm$ 1,0	8,7 $\pm$ 0,9	7,6 $\pm$ 1,1	0,010
GSH (nmol/g)	785 $\pm$ 61	506 $\pm$ 45	633 $\pm$ 28	709 $\pm$ 45	0,001
Kaspaz-3 (ng/g)	2,4 $\pm$ 1,3	8,4 $\pm$ 1,2	2,3 $\pm$ 1,3	3,2 $\pm$ 1,1	0,003

^aTek yönlü ANOVA

Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur.

A**B**

C

Şekil 16. Dokuz sıçandan elde edilen izole torasik aorta preparatlarının birleştirilmesi (harmanlanması) ile elde edilen homojenatlarda ölçülen malondialdehit (MDA) (A) glutatyon (GSH) (B) ve kaspaz-3 (C) düzeyleri deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir (sırasıyla $p = 0,010$, $p = 0,001$ ve $p = 0,003$; tek yönlü ANOVA). Grupların ikili karşılaştırması, Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi ile yapılmış ve elde edilen p değerleri şekil üzerinde verilmiştir. Veri noktaları ve hata çubukları ortalama $\pm$ SEM'i temsil etmektedir. İR: İskemi-reperfüzyon.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, yavaş salımlı bir H₂S donörü olan GYY4137'nin *in vitro* sıçan soğuk vasküler İR modelinde vasküler doku üzerindeki olası koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, GYY4137'nin oksidatif stresi ve apoptozu azaltabilirken, vasküler düzeyde fonksiyonel bozulmayı önlemede sınırlı etkisi olduğunu göstermektedir.

5.1 İR Hasarının Damar Düz Kası ve Endotel Fonksiyonu Üzerine Etkisi

Çalışmamızda kullandığımız soğuk vasküler İR hasarı modeli, insan ve hayvan damarlarının işlevselliği hakkında bilgi sağlayan *in vitro* bir modeldir (20,21,23,49–53). Modelden elde edilen bulguların klinik vasküler İR hasarına translasyonunda kısıtlılıklar olmasına rağmen, bu model bu hasara karşı koruyucu maddelerin potansiyelini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu *in vitro* soğuk iskemi ve sıcak reperfüzyon modelinde, İR hasarının sıçan izole torasik aortunun kasılma yanıtı üzerindeki etkisi, hücre zarını depolarize edici bir madde olan KCl ve α_1 -adrenerjik reseptör agonisti fenilefrin tarafından indüklenen izometrik kasılmalarındaki değişim miktarı ile değerlendirilmiştir. İR hasarının endotele bağımlı ve endotelden bağımsız gevşeme yanıtları üzerindeki etkisi, fenilefrin ile submaksimal olarak önkasılma oluşturulmuş aort dokusunun sırasıyla asetilkoline ve sodyum nitroprusiyata verdiği konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtlarındaki değişiklikler incelenerek değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, bu modeli kullanan önceki çalışmalarda olduğu gibi, İR hasarı KCl yanıtını azaltmıştır (20,21,23,49–53). İR hasarını takiben yüksek KCl (80 mM) uyarımına verilen kasılma yanıtının azalması, İR'nin vasküler düz kas hücrelerine zarar vererek kasılma mekanizmalarını, genel uyarılabilirliğini ve kasılma işlevini bozduğunu düşündürmektedir. Yüksek KCl normalde voltaj kapılı kalsiyum kanalları aracılığıyla depolarizasyona bağlı kalsiyum akışı yoluyla kasılmayı tetiklediğinden, İR'ye bağlı kasılma cevabının azalması muhtemelen kalsiyum kanal disfonksiyonunu, sarkoplazmik retikulumdan azalmış kalsiyum Salı verilmesini, membran proteinlerindeki oksidatif hasarı ve buna bağlı membran depolarizasyonunda bozulmayı yansıtmaktadır (54,55).

İR hasarı uygulanan dokularda fenilefrinin artan konsantrasyonlarına karşı maksimum kasılma cevabı (E_{maks}) artış gösterirken, deneylerden önce doku cevaplarını stabilize etmek için tekrarlı olarak uyguladığımız düşük konsantrasyonda fenilefrine (3×10^{-7} M) karşı kasılma cevabı İR uygulanan dokularda azalmıştır. İR uygulanan dokuların daha geç yanıt

vermesi nedeniyle, ilk kasılma yanıtında azalma gözlemlenmiş olabilir. Ancak gözlem süresi uzatılmış olsaydı, iskemik dokulardaki kasılmaların kontrol grubu seviyelerine ulaşabileceği öngörülebilir. Bu durum, İR hasarı sonrası vasküler tonus regülasyonundaki geçici adaptasyonlar veya endotel disfonksiyonunun neden olduğu yanıt gecikmesiyle ilişkili çeşitli faktörlerden kaynaklanıyor olabilir. Soğuk İR hasarı hem vasküler düz kas hücrelerinin kontraktıl fonksiyonlarını bozarak hem de endotel hücre bütünlüğünü ihlal ederek gecikmiş yanıtına yol açabilir. Diğer taraftan İR hasarı ile sıçan aort dokusunun artan fenilefrin konsantrasyonlarına daha duyarlı hale gelmesi, İR hasarının reaktif oksijen türlerini artırıp endotele zarar vererek, sitozolik kalsiyum düzeylerini yükseltmesi veya kalsiyum kanallarını doğrudan etkileyerek düz kası yüksek fenilefrin konsantrasyonlarına daha duyarlı hale getirmesi ile açıklanabilir (56). Ayrıca İR hasarı, vasküler düz kas içindeki kasılma proteinlerinin fosforilasyonunun değişmesine yol açarak özellikle reperfüzyon aşamasında kalsiyum duyarlılığını artırabilir (57,58). Bu durum, vasküler dokunun daha yüksek fenilefrin konsantrasyonları ile uyarılması durumunda daha yüksek kontraktilite yanıtları ile sonuçlanabilir (58). Elde edilen fenilefrin konsantrasyon-cevap eğrisinde İR sonucunda maksimum kasılma yanıtında (E_{maks}) artış olurken, duyarlılıkta (pD_2) bir değişiklik olmaması dikkat çekicidir. Bu durum vasküler düz kasın fenilefrine karşı maksimum kasılma kapasitesinin arttığını, ancak fenilefrine karşı reseptör duyarlılığının (veya afinitesinin) değişmediğini düşündürmektedir. Bu bulgu, İR'ye bağlı artan fenilefrinin cevabının reseptör duyarlılığındaki artıştan ziyade kasılma mekanizmasında reseptör sonrası spesifik değişikliklerle ilişkili olduğuna işaret etmektedir (56,58,59).

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular literatür ile uyumlu olarak vasküler İR hasarı sonrasında hem endotele bağlı hem de endotelden bağımsız vasküler gevşemenin bozulduğunu göstermektedir (20,21,23,39,50,51,53). İR hasarı asetilkolin konsantrasyon-gevşeme cevabı eğrisinde hem maksimum gevşeme yanıtını (E_{maks}) hem de asetilkoline duyarlılığı (pD_2) anlamlı olarak azaltmıştır. Bu bulgu İR hasarının endotel fonksiyonunu bozulduğunu göstermektedir. Asetilkolin ile indüklenen vazorelaksasyon öncelikle nitrik oksit (NO) gibi endotel kaynaklı faktörlere bağlı olduğundan, hem E_{maks} hem de pD_2 'deki azalma; İR hasarının endotelin bu vazodilatörleri üretme veya salıverme yeteneğini azaltmasına, İR sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin NO biyoyararlanımını düşürmesine ve endotelyal NO sentaz ekspresyonunda ve fonksiyonunda azalmaya bağlı olabilir (13,60).

Endotelden bağımsız gevşeme oluşturan sodyum nitroprusiyata ait konsantrasyon-gevşeme eğrisinde İR hasarı maksimum gevşeme yanıtını (E_{max}) artırırken, duyarlılığı (pD_2) azaltmıştır. Gevşeme mekanizmasının endotelden bağımsız olması, sodyum nitroprusiyat kaynaklı NO'nın doğrudan düz kası gevşetmesine bağlı olması nedeniyle, bu bulgu İR hasarının NO'ye karşı bozulan düz kas yanıtına işaret etmektedir (20,21,23). İR hasarından sonra sodyum nitroprusiyata yanıt olarak azalan pD_2 ile birlikte artan E_{max} , düz kasın yüksek gevşeme kapasitesini korumasına rağmen, duyarlılığın azaldığını göstermektedir. Duyarlılıktaki bu azalma, düz kas gevşeme mekanizmasında oksidatif stresin neden olduğu değişikliklerden kaynaklanırken; artan E_{max} , yüksek sodyum nitroprusiyat konsantrasyonlarında guanilat siklaz veya cGMP'ye bağımlı protein kinaz yollarının kompanseuar up-regülasyonuna bağlı olabilir (61,62).

5.2 İR Hasarının Oksidatif Stres ve Apoptoz Belirteçleri Üzerine Etkisi

Soğuk İR hasarı protokolü uygulanan ve deneysel grupları oluşturulan ayrı bir sıçan torasik aort setinde organ banyosu deneyleri yapılmaksızın dokularda oksidatif stres belirteçleri olan MDA, ve GSH ile apoptoz belirteci olan kaspaz-3 düzeyleri ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucunda İR hasarına maruz bırakılan dokularda MDA düzeyi artış gösterirken, GSH düzeyi düşmüştür. Elde edilen bu bulgular literatür ile uyumlu olarak vasküler İR hasarının oksidatif stresi artırıp, antioksidan savunmayı azaltarak dokuda ciddi oksidatif strese oluşturduğuna işaret etmektedir (20,21,51,63,64). Ayrıca İR hasarına maruz kalan aort halklarında belirgin olarak artmış kaspaz-3 düzeyi kaydedilmiştir. Bu da artan oksidatif stres ve tükenen antioksidan savunmanın mitokondriyal hasara neden olarak ve apoptotik sinyal kaskadını aktive ederek apoptotik süreci artırdığını düşündürmektedir (65,66).

5.3 GYY4137'nin İR ile İlişkili Vasküler Disfonksiyon, Oksidatif Stres ve Apoptoz Üzerine Etkisi

Düşük (100 μ M) ve yüksek (300 μ M) konsantrasyonda GYY4137 uygulanmış torasik aort preparatlarının izole organ banyosu düzeneğinde verdiği yanıtları değerlendirildiğinde, soğuk İR hasarına bağlı endotel ve vasküler disfonksiyona karşı koruyucu etki göstermemiştir. Buna karşın biyokimyasal analizler, GYY4137'nin doku düzeyinde artan oksidatif stres ve apoptozu her iki konsantrasyonda da anlamlı olarak azalttığını göstermiştir. GYY4137'nin İR hasarına bağlı oluşan oksidatif stres ve apoptozu azaltırken,

bozulan vasküler fonksiyonu düzeltmede etkisiz kalması arasındaki tutarsızlık birkaç faktörle açıklanabilir.

İlk olarak biyokimyasal analizler oldukça hassastır ve hemen işlevsel iyileşmelere dönüşmeyebilecek ince moleküler değişiklikleri tespit edebilir. GYY4137 apoptozu ve oksidatif stresi azaltmış olsa da bu değişiklikler deney süremiz içinde fonksiyonel bütünlüğü yeniden sağlamak için yeterli olmayabilir.

İkinci olarak İR hasarının mekanizması oksidatif stres, apoptoz, inflamasyon ve endotel disfonksiyonunu içeren karmaşık bir yapıya sahiptir (67). Modelimizde GYY4137'nin vasküler inflamasyon üzerindeki etkileri değerlendirilmemiştir. GYY4137 antioksidatif ve antiapoptotik etki göstermesine karşın, antiinflamatuvar etkisi fonksiyonel etki için yetersiz kalabilir.

Deneylerimizde kullandığımız hayvan türü olan sıçana özgü olarak fonksiyonel düzelme görülmemiş olabilir. Harper vd. (2023) domuz koroner arterlerinde GYY4137'nin miyeloperoksidaz ve hidrojen peroksit ile 4 saatlik bir inkübasyondan 2 saat sonra uygulandığında 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarında endotelial koruma sağladığını göstermiştir (32).

Son olarak uyguladığımız soğuk İR modeli, saklama süresi ve sıcaklığı, GYY4137 konsantrasyonu biyokimyasal ve fonksiyonel bulgular arasındaki farka neden olmuş olabilir. GYY4137, sodyum hidrosülfür (NaHS) ile karşılaştırıldığında çok daha düşük bir oranda H_2S salmaktadır. Oda sıcaklığında GYY4137'nin salıverdiği H_2S , NaHS'nin yaklaşık %10'u kadardır. Bununla birlikte, GYY4137 yavaş ve uzun süre H_2S salıverir. GYY4137'den salınan H_2S yedi güne kadar başlangıç seviyelerinin üzerinde kalmıştır (39). Çalışmamızda, sıçan torasik aortu 4°C'de 24 saat boyunca GYY4137 ile inkübe edilmiştir. Abramavicius vd. (2021) tarafından gösterildiği gibi, GYY4137'den H_2S salıverilmesi vasküler dokunun varlığından bağımsızdır (68). Ancak GYY4137'den H_2S salıverilmesi sıcaklıktan etkilenir ve düşük sıcaklıklarda (4°C) minimum salınım meydana gelir (70). Bu nedenle, 24 saatlik soğuk iskemi periyodu sırasında serbestleşen H_2S seviyelerinin sürekli olarak düşük olması muhtemeldir. GYY4137'den salıverilen düşük H_2S seviyeleri apoptozu ve oksidatif stresi azaltmış olsa da, fonksiyonel düzelme için yetersiz kalmış olabilir.

Çalışmamızda beklemediğimiz bir diğer bulgu da sodyum nitroprusiyat konsantrasyon-gevşeme eğrisinde İR sonucu azalan duyarlılığı (pD₂'de azalma) GYY4137'nin yüksek konsantrasyonda daha da azaltmasıdır. Bu bulgu GYY4137'nin iskemik koşullar altında NO sinyalizasyonunun bozulmasını kötüleştirebileceğini düşündürmektedir. GYY4137 bu etkiyi endotelial nitrik oksit sentaz gibi enzimleri modüle ederek NO üretimine veya sinyalizasyonuna müdahale ederek gösterebilir (69,70). GYY4137 çözünür guanilil siklazı veya NO yolunun diğer bileşenlerini baskılayarak NO'ya karşı vasküler düz kas duyarlılığında değişikliklere neden olabilir (68). Abramavicius vd. (2021) GYY4137'nin guanilil siklaz aktivitesini modüle eden ve vasküler düz kas hücrelerinde kasılmaya neden olabilen sülfür içeren bir bileşik (XSn) oluşturduğunu bildirmiştir(68). Ayrıca GYY4137'nin kasılmış sıçan mezenterik arterlerini gevşettiği gösterilmiş olsa da, hidrolize formu tam tersi bir etkiye sahiptir (68). Hidrolize GYY4137'nin düşük sıcaklıklarda (4 °C) daha belirgin olabilen vazokonstriktif etkileri, çalışmamızda gözlemlenen bozulmuş gevşemede rol oynayabilir.

5.4 Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmanın dikkate alınması gereken kısıtlılıkları şu şekilde listelenebilir:

- Modelin Kapsamı: Bu çalışmada, İR hasarını incelemek için *in vitro* bir model kurulmuş ve vasküler fonksiyon *ex vivo* olarak değerlendirilmiştir. Bu model gerçek fizyolojik koşulları tam olarak yansıtmayabilir. Örneğin, bu model, İR hasarının sinir ve bağışıklık sistemi tepkileriyle bağlantısını dikkate almamaktadır (71–73). Bu nedenle, bulguların daha doğru yorumlanabilmesi için *in vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
- Saklama Koşulları Farklılıkları: Çalışmada, vasküler İR hasarını simüle etmek amacıyla greft dokuları 4°C'de 24 saat saklanmıştır. Bu, laboratuvar koşullarında sıkça kullanılan bir model olmakla birlikte, klinik pratikte greft damarların saklanma süreleri genellikle daha kısadır. Ayrıca, klinik uygulamada greft damarlar genellikle oda sıcaklığında saklanır; bu koşullar soğuk İR modelinden farklıdır. Bu nedenle, klinik translasyon açısından elde edilen bulguların gerçek cerrahi koşullarındaki saklama koşulları ile test edilmesi önemlidir.
- Klinik Uygulamaya Translasyon: Deney hayvanı çalışmaları, insan biyolojisini modellemek için değerli bilgiler sağlasa da, hayvan dokularının insan dokularıyla birebir aynı özellikleri taşıması, elde edilen bulguların klinik uygulamalara

translasyonunu kısıtlar (74). Elde edilen bulgular ışığında insan dokusu üzerinde çalışmalar planlanmalıdır.

- Mekanizma Bilgisinin Eksikliği: Çalışmamızda, GYY4137'in İR hasarı sonrası vasküler koruyucu etkisine dair bazı biyokimyasal kanıtlar sunulmakla birlikte; rol oynayabilecek diğer moleküler mekanizmalar incelenmemiştir (75).
- Tek Cinsiyet Kullanımı: Çalışmada yalnızca erkek sıçanlardan elde edilen aorta dokuları kullanılmıştır. Bu durum, bulguların dişi bireylerdeki geçerliliğini sorgulamaktadır. İleriki çalışmalarda cinsiyetler arası karşılaştırmalar yapılarak sonuçların genellenebilirliği artırılmalıdır.
- Apoptotik Değerlendirmenin Sınırlılığı: Apoptotik süreçlerin değerlendirilmesinde yalnızca kaspaz-3 aktivitesi ölçülmüştür. Oysa TUNEL (terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick uç etiketleme) gibi yöntemlerle DNA fragmentasyonunun direkt gösterilmesi veya Annexin-V boyaması ile apoptotik hücre membran değişikliklerinin incelenmesi, apoptotik hücre ölümünü daha kapsamlı doğrulayabilirdi. Bu eksiklik, apoptotik indeksin niceliği ve niteliği hakkında sınırlı bilgi sağlamaktadır.
- Hücre İçi Kalsiyum Dinamiğinin İncelenmemesi: İR hasarı sırasında hücre içi kalsiyum ($[Ca^{2+}]_i$) birikimi, kontraktil disfonksiyon ve hücre ölümüne yol açan önemli bir mekanizmadır. Çalışmada $[Ca^{2+}]_i$ seviyelerinin ölçülmemiş olması, GYY4137'nin koruyucu etkilerinin kalsiyum homeostazı üzerinden nasıl modüle edildiğine dair veri eksikliğine neden olmuştur. Floresan bazlı kalsiyum indikatörleri (örn., Fura-2) veya elektrofizyolojik yöntemlerle bu dinamiklerin incelenmelidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1 Sonuç

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular GYY4137'nin *in vitro* damar İR hasarına bağlı oksidatif stres ve apoptozu azaltmakla birlikte, bozulan damar fonksiyonlarını düzeltmede yetersiz kaldığını göstermiştir.

6.2 İleri Çalışmalar İçin Öneriler

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgulara dayanarak ileri çalışmalar için önerilerimiz aşağıda sıralanmıştır:

- GYY4137'nin potansiyel vasküler koruyucu etkileri kardiyovasküler cerrahi için klinik koşulları simüle eden hayvan ve insan modelleri üzerinde değerlendirilmelidir.
- GYY4137'nin konsantrasyonu, uygulama süresi ve ortam sıcaklığını değiştirilerek, endotel fonksiyonunu modüle etmedeki rolü hakkında daha fazla bilgi sağlanmalıdır.
- GYY4137'nin inflamasyon ve vasküler düz kas reaktivitesi gibi İR hasarında kilit rol oynayan yolaklar üzerindeki etkileri araştırılmalı, etki mekanizmasına yönelik mekanistik çalışmalar planlanmalıdır.
- GYY4137'nin NO sinyalizasyonunu veya antioksidan savunmayı hedefleyen diğer ajanlarla birlikte kullanımının vasküler fonksiyonun korunmasındaki etkinliği araştırılmalıdır.
- GYY4137 ve diğer H₂S donörlerinin damar dışındaki düz kas dokuların İR hasarına karşı etkileri araştırılmalıdır.
- İR cinsiyete özgül bir durum olmadığı için dişiler de dahil edilmelidir. Oksidan/antioksidan dengenin kapsamlı değerlendirilmesi için süperoksit dismutaz, katalaz aktiviteleri ve 8-izoprostan gibi lipid peroksidasyon ürünleri ölçülmeli, bu veriler hücresel redoks durumuyla ilişkilendirilmelidir.
- Ekstrinsik (Fas/FasL) ve intrinsik (mitokondriyal) apoptotik mekanizmaların İR hasarındaki rolünü belirlemek için TUNEL boyama, Annexin-V/PI akım sitometrisi gibi yöntemlerle niceliksel ve niteliksel analizler yapılmalıdır.
- İR hasarı sırasında hücre içi kalsiyum ([Ca²⁺]_i) konsantrasyonları floresan probalar (Fura-2/AM) ile ölçülmeli; vasküler düz kas membran potansiyeli ve iyon kanal aktivitesi elektrofizyolojik kayıt yöntemleri (örn., patch-clamp) ile değerlendirilmelidir.

- GYY4137'nin vasküler reseptörler (α_1 -adrenerjik, AT1) üzerindeki etkileri Schild analizi (pA_2) ve yedek reseptör hesaplamaları ile karakterize edilmeli; agonist/antagonist etkileşimleri fonksiyonel deneylerle doğrulanmalıdır.
- Reperfüzyon sürecinde izole organ banyosu deneyler ile biyokimyasal analizler arasındaki sıcaklık farkının ($\sim 15^\circ\text{C}$) sonuçlara olası etkisi minimize edilmeli ve tüm deneylerde termostatik kontrol sağlanarak sıcaklık stabilitesi garanti altına alınmalıdır.



7. KAYNAKLAR

1. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, Byrne RA, Collet JP, Falk V, Head SJ, Jüni P, Kastrati A, Koller A, Kristensen SD, Niebauer J, Richter DJ, Seferovic PM, Sibbing D, Stefanini GG, Windecker S, Yadav R, Zembala MO; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/EACTS guidelines on myocardial revascularization. *EuroIntervention* 14(14):1435-1534, 2019.
2. Harskamp RE, Lopes RD, Baisden CE, de Winter RJ, Alexander JH. Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery. *Ann Surg* 257(5):824-833, 2013.
3. Ladak SS, McQueen LW, Layton GR, Aujla H, Adebayo A, Zakkar M. The role of endothelial cells in the onset, development and modulation of vein graft disease. *Cells* 11(19):3066, 2022.
4. Rodgers JL, Jones J, Bolleddu SI, Vanthenapalli S, Rodgers LE, Shah K, Karia K, Panguluri SK. Cardiovascular risks associated with gender and aging. *J Cardiovasc Dev Dis* 6(2):19, 2019.
5. Saemann L, Naujoks P, Hartrumpf L, Pohl S, Simm A, Szabó G. Sex-specific protection of endothelial function after vascular ischemia/reperfusion injury by the senomorphic agent ruxolitinib. *Int J Mol Sci* 24(14):11727, 2023.
6. Toda N. Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation. *Pharmacol Ther* 133(2):159-176, 2012.
7. Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, Évora P, Castro-E-Silva O. Ischemia/reperfusion injury revisited: an overview of the latest pharmacological strategies. *Int J Mol Sci* 20(20):5034, 2019.
8. Lv S, Wang Z, Wang J, Wang H. Exogenous hydrogen sulfide plays an important role through regulating autophagy in ischemia/reperfusion injury. *Front Mol Biosci* 8:681676, 2021.
9. Ben Ali W, Bouhout I, Perrault LP. The effect of storage solutions, gene therapy, and antiproliferative agents on endothelial function and saphenous vein graft patency. *J Card Surg* 33(5):235-242, 2018.
10. Layton GR, Ladak SS, Abbasciano R, McQueen LW, George SJ, Murphy GJ, Zakkar M. The role of preservation solutions upon saphenous vein endothelial integrity and function: systematic review and UK practice survey. *Cells* 12(5):815, 2023.
11. Pachuk CJ, Rushton-Smith SK, Emmert MY. Intraoperative storage of saphenous vein grafts in coronary artery bypass grafting. *Expert Rev Med Devices* 16(11):989-997, 2019.
12. Caliskan E, Sandner S, Misfeld M, Aramendi J, Salzberg SP, Choi YH, Satishchandran V, Iyer G, Perrault LP, Böning A, Emmert MY. A novel endothelial damage inhibitor for the treatment of vascular conduits in coronary artery bypass grafting: protocol and rationale for the European, multicentre, prospective, observational DuraGraft registry. *J Cardiothorac Surg* 14(1):174, 2019.

13. Caliskan E, de Souza DR, Böning A, Liakopoulos OJ, Choi YH, Pepper J. Saphenous vein grafts in contemporary coronary artery bypass graft surgery. *Nat Rev Cardiol* 17(3):155-169, 2020.
14. Haime M, McLean RR, Kurgansky KE, Emmert MY, Kosik N, Nelson C. Relationship between intra-operative vein graft treatment with DuraGraft® or saline and clinical outcomes after coronary artery bypass grafting. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 16(12):963-970, 2018.
15. Kiss A, Szabo PL, Dostal C, Arnold Z, Geisler D, Crailsheim I, Folkmann S, Grabenwöger M, Podesser BK, Winkler B. Specific graft treatment solution enhances vascular endothelial function. *Rev Cardiovasc Med* 23(11):368, 2022.
16. Papakonstantinou NA, Sykaras AG, Vourlakou C, Goudevenos J, Papadopoulos G, Apostolakis E. Cardioplegic storage solution: Is it the guardian of saphenous vein graft endothelium? *J Card Surg* 35(5):996-1003, 2020.
17. Cui N, Luo H, Zhao Y. Protective effect of GYY4137, a water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule, on intestinal ischemia-reperfusion. *Mol Med Rep* 2020.
18. Lobb I, Davison M, Carter D, Liu W, Haig A, Gunaratnam L, Sener A. Hydrogen sulfide treatment mitigates renal allograft ischemia-reperfusion injury during cold storage and improves early transplant kidney function and survival following allogeneic renal transplantation. *J Urol* 194(6):1806-1815, 2015.
19. Sun X, Wang W, Dai J, Huang J, Shi M, Chu X. Donor heart preservation with a novel long-term and slow-releasing hydrogen sulfide system. *Nitric Oxide* 81:1-10, 2018.
20. Korkmaz-Icöz S, Ballikaya B, Soethoff J, Kraft P, Sayour AA, Radovits T, Loganathan S, Karck M, Szabó G, Veres G. Graft preservation solution DuraGraft® alleviates vascular dysfunction following in vitro ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmaceuticals (Basel)* 14(10):1028, 2021.
21. Korkmaz-Icöz S, Kocer C, Sayour AA, Kraft P, Benker MI, Abulizi S, Georgevici AI, Brlecic P, Radovits T, Loganathan S, Karck M, Szabó G. The sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor canagliflozin alleviates endothelial dysfunction following in vitro vascular ischemia/reperfusion injury in rats. *Int J Mol Sci* 22(15):7774, 2021.
22. Saemann L, Wernstedt L, Pohl S, Stiller M, Willsch J, Hofmann B. Impact of age on endothelial function of saphenous vein grafts in coronary artery bypass grafting. *J Clin Med* 12(17):5454, 2023.
23. Orhan HG, Teimoori A, Demirtaş E, Zeynalova N, Efe OE, Emre Aydıngöz S. Effects of hypoxia versus ischemia on vascular functions of isolated rat thoracic aorta: revisiting the in vitro vascular ischemia/reperfusion model. *Kardiochir Torakochirurgia Pol* 20(3):173-178, 2023.
24. Martelli A, Testai L, Citi V, Marino A, Pugliesi I, Barresi E, Nesi G, Rapposelli S, Taliani S, Da Settimo F, Breschi MC, Calderone V. Arylthioamides as H₂S donors: L-cysteine-activated releasing properties and vascular effects in vitro and in vivo. *ACS Med Chem Lett* 4(10):904-908, 2013.

25. Issa K, Kimmoun A, Collin S, Ganster F, Fremont-Orlowski S, Asfar P, Mertes PM, Levy B. Compared effects of inhibition and exogenous administration of hydrogen sulphide in ischemia-reperfusion injury. *Crit Care* 17(4):R129, 2013.
26. McFarlane L, Nelson P, Dugbartey GJ, Sener A. Pre-treatment of transplant donors with hydrogen sulfide to protect against warm and cold ischemia-reperfusion injury in kidney and other transplantable solid organs. *Int J Mol Sci* 24(4):3518, 2023.
27. Wu D, Wang J, Li H, Xue M, Ji A, Li Y. Role of hydrogen sulfide in ischemia-reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev* 2015:186908, 2015.
28. Jha S, Calvert JW, Duranski MR, Ramachandran A, Lefer DJ. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(2):H801-H806, 2008.
29. Dugbartey GJ, Juriasingani S, Zhang MY, Sener A. H₂S donor molecules against cold ischemia-reperfusion injury in preclinical models of solid organ transplantation. *Pharmacol Res* 172:105842, 2021.
30. Wang W, Sun X, Zhang H, Yang C, Liu Y, Yang W, Guo C, Wang C. Controlled release hydrogen sulfide delivery system based on mesoporous silica nanoparticles protects graft endothelium from ischemia-reperfusion injury. *Int J Nanomedicine* 11:3255-3263, 2016.
31. Rose P, Dymock BW, Moore PK. GYY4137, a novel water-soluble, H₂S-releasing molecule. *Methods Enzymol* 143-167, 2015.
32. Harper A, Chapel M, Hodgson G, Malinowski K, Yates I, Garle M, Ralevic V. GYY4137, a hydrogen sulfide donor, protects against endothelial dysfunction in porcine coronary arteries exposed to myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Vascul Pharmacol* 152:107199, 2023.
33. Ravani S, Chatzianastasiou A, Papapetropoulos A. Using mechanism-based combinations of H₂S-donors to maximize the cardioprotective action of H₂S. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 397(3):1853-1864, 2024.
34. Emre Aydingöz S, Teimoori A, Orhan HG, Efe OE, Kibaroglu S, Erdem ŞR. Effect of hydrogen sulfide on ischemia-reperfusion injury of kidney: A systematic review and meta-analysis of in vivo animal studies. *Eur J Pharmacol* 943:175564, 2023.
35. McLaughlin DK, Hoffmann C, Sasaki M, Li F, Ma J, Cui X, Sutliff RL, Brewster LP. Comparison of arterial storage conditions for delayed arterial ring testing. *JVS Vasc Sci* 4:100122, 2023.
36. Radovits T, Lin LN, Zotkina J, Koch A, Rauen U, Köhler G, Karck M, Szabó G. Endothelial dysfunction after long-term cold storage in HTK organ preservation solutions: effects of iron chelators and N- α -acetyl-L-histidine. *J Heart Lung Transplant* 27(2):208-216, 2008.
37. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med* 4(6), 2013.

38. Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Zaid A, Giannogonas P, Cantalupo A, Dhayade S, Karalis KP, Wang R, Feil R, Cirino G. cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation. *PLoS One* 7(12):e53319, 2012.
39. Lee ZW, Zhou J, Chen CS, Zhao Y, Tan CH, Li L, Moore PK, Deng LW. The slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in vivo. *PLoS One* 6(6):e21077, 2011.
40. Nin DS, Idres SB, Song ZJ, Moore PK, Deng LW. Biological effects of morpholin-4-ium 4 methoxyphenyl (morpholino) phosphinodithioate and other phosphorothioate-based hydrogen sulfide donors. *Antioxid Redox Signal* 32(2):145-158, 2020.
41. Alexander BE, Coles SJ, Fox BC, Khan TF, Maliszewski J, Perry A, Pitak MB, Whiteman M, Wood ME. Investigating the generation of hydrogen sulfide from the phosphonamidodithioate slow-release donor GYY4137. *MedChemComm* 6(9):1649-1655, 2015.
42. Slaughter RJ, Watts M, Vale JA, Grieve JR, Schep LJ. The clinical toxicology of sodium hypochlorite. *Clin Toxicol* 57(5):303-311, 2019.
43. Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Yesilyurt ZE, Ozturk N, Muderrisoglu AE, Michel MC. Normalization of organ bath contraction data for tissue specimen size: does one approach fit all? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 393(2):243-251, 2020.
44. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-310, 1978.
45. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82(1):70-77, 1959.
46. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39(2):175-191, 2007.
47. Wickham H. Reshaping data with the reshape package. *J Stat Softw* 21(12), 2007.
48. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2024.
49. Ballikaya B, Soethoff J, Kraft P, Sayour A, Radovits T, Loganathan S, Karck M, Veres G, Szabó G, Korkmaz-Icöz S. Arterial graft preservation with an endothelial damage inhibitor reduces vascular dysfunction in a rat model of in vitro ischemia/reperfusion injury. *Arch Cardiovasc Dis Suppl* 14(2):170, 2022.
50. Korkmaz-Icöz S, Sistori G, Loganathan S, Sayour AA, Brlecic P, Radovits T, Brune M, Karck M, Szabó G. Bone marrow culture-derived conditioned medium recovers endothelial function of vascular grafts following in vitro ischemia/reperfusion injury in diabetic rats. *Stem Cells Int* 2022:7019088, 2022.
51. Korkmaz-Icöz S, Sun X, Li S, Brlecic P, Loganathan S, Ruppert M, Sayour AA, Radovits T, Karck M, Szabó G. Conditioned medium from mesenchymal stem cells

- alleviates endothelial dysfunction of vascular grafts submitted to ischemia/reperfusion injury in 15-month-old rats. *Cells* 10(5):1231, 2021.
52. Lopez-Menendez J, Castro-Pinto M, Fajardo E, Miguelena J, Martín M, Muñoz R, Rodríguez-Roda J. Vein graft preservation with an endothelial damage inhibitor in isolated coronary artery bypass surgery: an observational propensity score-matched analysis. *J Thorac Dis* 15(10):5549-5558, 2023.
 53. Teimoori A, Orhan HG, Demirtaş E, Zeynalova N, Efe OE, Emre Aydingöz S. Effect of taurine on vascular dysfunction in an in vitro ischemia-reperfusion model of rat thoracic aorta. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2024.
 54. Khalil RA, van Breemen C. Sustained contraction of vascular smooth muscle: calcium influx or C-kinase activation? *J Pharmacol Exp Ther* 244(2):537-542, 1988.
 55. Liu SP, Mogavero LJ, Levin RM. Correlation of calcium-activated ATPase activity, lipid peroxidation, and the contractile response of rabbit corporal smooth muscle treated with in vitro ischemia. *Gen Pharmacol* 32(3):345-349, 1999.
 56. Szadujkis-Szadurska K, Szadujkis-Szadurski R, Szadujkis-Szadurski L, Grzešk G, Słupski M, Matusiak G, Gajdus M, Glaza I. The role of calcium in modulating the reactivity of the smooth muscle cells during ischemia/reperfusion. Part 1. *Postepy Hig Med Dosw* 64:188-194, 2010.
 57. Grzešk E, Darwish N, Stolarek W, Wiciński M, Malinowski B, Burdziński I, Grzešk G. Effect of reperfusion on vascular smooth muscle reactivity in three contraction models. *Microvasc Res* 121:24-29, 2019.
 58. Ohla J, Wiciński M, Słupski M, Zabrzyński J, Malinowski B. Cyclic AMP but not calmodulin as a potential vasoconstrictor in simulated reperfusion. *Int J Mol Sci* 24(12):10355, 2023.
 59. Cipolla MJ, Chan SL, Sweet J, Tavares MJ, Gokina N, Brayden JE. Postischemic reperfusion causes smooth muscle calcium sensitization and vasoconstriction of parenchymal arterioles. *Stroke* 45(8):2425-2430, 2014.
 60. Berna N, Arnould T, Remacle J, Michiels C. Hypoxia-induced increase in intracellular calcium concentration in endothelial cells: role of the Na⁺-glucose cotransporter. *J Cell Biochem* 84(1):115-131, 2001.
 61. Qi XL, Nguyen TL, Andries L, Sys SU, Rouleau JL. Vascular endothelial dysfunction contributes to myocardial depression in ischemia-reperfusion in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 76(1):35-45, 1998.
 62. Tsai MH, Jiang MJ. Reactive oxygen species are involved in regulating alpha₁-adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction. *J Biomed Sci* 17(1):67, 2010.
 63. Lian S, Loganathan S, Mayer T, Kraft P, Sayour AA, Georgevici AI, Veres G, Karck M, Szabó G, Korkmaz-Icöz S. In a rat model of bypass DuraGraft ameliorates endothelial dysfunction of arterial grafts. *Sci Rep* 14(1):15174, 2024.

64. Ozer MK, Parlakpınar H, Cigremis Y, Ucar M, Vardi N, Acet A. Ischemia-reperfusion leads to depletion of glutathione content and augmentation of malondialdehyde production in the rat heart from overproduction of oxidants: Can caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protect the heart? *Mol Cell Biochem* 273(1-2):169-175, 2005.
65. Coppola S, Ghibelli L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochem Soc Trans* 28(2):56-61, 2000.
66. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7(3):153-163, 2000.
67. Chazelas P, Steichen C, Favreau F, Trouillas P, Hannaert P, Thuillier R, Giraud S, Hauet T, Guillard J. Oxidative stress evaluation in ischemia reperfusion models: Characteristics, limits and perspectives. *Int J Mol Sci* 22(5):2366, 2021.
68. Abramavicius S, Petersen AG, Renaltan NS, Prat-Duran J, Torregrossa R, Stankevicius E, Whiteman M, Simonsen U. GYY4137 and sodium hydrogen sulfide relaxations are inhibited by L-cysteine and KV7 channel blockers in rat small mesenteric arteries. *Front Pharmacol* 12:613989, 2021.
69. Drucker NA, Jensen AR, Te Winkel JP, Markel TA. Hydrogen sulfide donor GYY4137 acts through endothelial nitric oxide to protect intestine in murine models of necrotizing enterocolitis and intestinal ischemia. *J Surg Res* 234:294-302, 2019.
70. Kloesch B, Steiner G, Mayer B, Schmidt K. Hydrogen sulfide inhibits endothelial nitric oxide formation and receptor ligand-mediated Ca^{2+} release in endothelial and smooth muscle cells. *Pharmacol Rep* 68(1):37-43, 2016.
71. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 70(1):71-86, 2004.
72. Slegtenhorst BR, Dor FJ, Rodriguez H, Voskuil FJ, Tullius SG. Ischemia/reperfusion injury and its consequences on immunity and inflammation. *Curr Transplant Rep* 1(3):147-154, 2014.
73. Tang Q, Dong C, Sun Q. Immune response associated with ischemia and reperfusion injury during organ transplantation. *Inflamm Res* 71(12):1463-1476, 2022.
74. Leenaars CHC, Kouwenaar C, Stafleu FR, Bleich A, Ritskes-Hoitinga M, De Vries RBM, Meijboom FLB. Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates. *J Transl Med* 17(1):223, 2019.
75. Zhang M, Liu Q, Meng H, Duan H, Liu X, Wu J, Gao F, Wang S, Tan R, Yuan J. Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther* 9(1):12, 2024.