

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ
ANABİLİM DALI

**LOX-1'in VASKÜLOJENİK EREKTİL
DİSFONKSİYONDAKİ YERİ ve RESVERATROLÜN
KORPUS KAVERNOZUMDA LOX-1 ve eNOS
EKSPRESYONU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

DR. OZAN BOZKURT

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2008

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ
ANABİLİM DALI

**LOX-1'in VASKÜLOJENİK EREKTİL
DİSFONKSİYONDAKİ YERİ ve RESVERATROLÜN
KORPUS KAVERNOZUMDA LOX-1 ve eNOS
EKSPRESYONU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. OZAN BOZKURT

TEZ SORUMLUSU: DOÇ. DR. AYKUT KEFİ

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım sayın hocalarım başta Prof. Dr. Adil Esen ve Prof. Dr. İlhan Çelebi olmak üzere, Prof. Dr. Murat Sade, Prof. Dr. Ziya Kırkalı, Prof. Dr. Uğur Mungan, Doç. Dr. Güven Aslan, Doç. Dr. Aykut Kefi ve Öğr. Gör. Uzm. Dr. Ömer Demir'e teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında her aşamada büyük desteklerini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan hocalarım Prof. Dr. Adil Esen, Doç. Dr. Aykut Kefi, Yard. Doç. Dr. Nergis Murat, Öğr. Gör. Uzm. Dr. Ömer Demir ve asistan arkadaşım Dr. Sinem Evcim'e ayrıca teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince yaptığım işten büyük keyif almamı sağlayan ve eğitimim boyunca uyum içinde çalıştığım başta dönem arkadaşlarım Dr. Asif Cahangirov, Dr. Hatice Sıçramaz ve abim Öğr. Gör. Uzm. Dr. Ömer Demir olmak üzere ; Uzm. Dr. Bora İrer, Uzm. Dr. Hikmet Köseoğlu, Uzm. Dr. Sertaç Çimen, Uzm. Dr. İsmail Özdemir, Uzm. Dr. Ahmet Cihan, Dr. Bilgin Öztürk, Dr. Ruhi Güngör, Dr. Elnur Mammadov, Dr. Önder Çınar ve Dr. Onur Kizer'e ve klinik, poliklinik ve ameliyathane hemşireleri ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Benim bugünlere gelmemde yaptıkları fedakarlıklar yadsınamaz annem Fatma Bozkurt, babam Ali İhsan Bozkurt ve kardeşim Özge Bozkurt'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Uzmanlık eğitimim boyunca her zaman maddi ve manevi desteği ile yanımda olan ve zor zamanlarımda desteğini esirgemeyen sevgili eşim Dr. Eylem Seçkin Bozkurt'a en büyük teşekkürler.....

Dr. Ozan Bozkurt

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| 1. Tablo, Resim ve Şekil listesi | 5 |
| 2. Kısaltmalar | 6 |
| 3. Özet | 8 |
| 4. Özet (İngilizce)..... | 9 |
| 5. Giriş ve Amaç | 10 |
| 6. Genel Bilgiler | 12 |
| 7. Gereç ve Yöntemler..... | 47 |
| 8. Bulgular | 54 |
| 9. Tartışma | 62 |
| 10. Sonuç ve Öneriler | 65 |
| 11. Kaynaklar | 66 |

TABLO, RESİM ve ŞEKİLLER

Tablo 1. Penisi oluşturan yapıların fonksiyonu

Tablo 2. ED patofizyolojisinde rol oynayan faktörler

Tablo 3. Psikojenik ED tipleri

Tablo 4. ED'li hastalarda tedavi yaklaşımı

Tablo 5. Endotelyopatiler

Tablo 6. LOX-1 ekspresyonunda artışa yol açan in vitro ve in vivo durumlar

Tablo 7. RNA konsantrasyonları

Tablo 8. Çalışma sonunda plazma kolesterol seviyeleri

Tablo 9. Çalışma başlangıcı ve sonunda hayvan ağırlıkları

Tablo 10. Tavşan GAPDH, LOX-1 ve eNOS primer mRNA dizaynları

Tablo 11. Üç grupta LOX-1 ve GAPDH mutlak mRNA ekspresyon düzeyleri

Tablo 12. Üç grupta eNOS ve GAPDH mutlak mRNA ekspresyon düzeyleri

Şekil 1. Penisi oluşturan anatomik yapılar

Şekil 2. Penisin arteriyel yapısı

Şekil 3. Penisin nöral innervasyonu ve vasküler yapısı

Şekil 4. Cinsel uyarı sonrası kavernozaal yapılarda görülen genişleme

Şekil 5: L-arjinin / nitrik oksit / guanilat siklaz / cGMP yolağı

Şekil 6. LOX-1 molekül yapısı

Şekil 7. LOX-1 homodimer yapısı

Şekil 8. LOX-1 aracılı endotelyal disfonksiyon

Şekil 9. Ox-LDL ile LOX-1 etkileşimi sonucu oluşan endotelyal disfonksiyon ve ateroskleroz

Şekil 10. Çalışma protokolü

Şekil 11. Aort ve korpus kavernozaumda LOX-1 ve eNOS ekspresyonları

Şekil 12. Üç grupta LOX-1 amplifikasyon eğrileri

Şekil 13. Üç grupta LOX-1 mRNA ekspresyonlarının agaroz jel görüntüleri

Şekil 14. Üç grupta eNOS amplifikasyon eğrileri

Şekil 15. Üç grupta eNOS mRNA ekspresyonlarının agaroz jel görüntüleri

Resim 1. Çalışmaya alınan tavşanların barınma koşulları

Resim 2. Sakrifikasyon işlemi

Resim 3. Korpus kavernozaum diseksiyonu

KISALTMALAR

- ADMA : Asimetrik dimetilarjinin
ART : Androjen replasman tedavisi
ATP : Adenozin trifosfat
cAMP : Siklik adenozin monofosfat
cGMP : Siklik guanozin monofosfat
CGRP : Kalsitonin gen bağımlı peptid
COX : Siklooksijenaz
DM : Diabetes mellitus
ED : Eretil disfonksiyon
EDRF : Endotel kaynaklı gevşetici faktör
ELAM : Endotelyal lökosit adezyon molekülü
eNOS : Endoteyal nitrik oksit sentaz
ET-1 : Endotelin-1
GAPDH : Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz
HDL : Yüksek molekül ağırlıklı lipoprotein
HIV : İnsan immün yetmezlik virüsü
ICAM : İntraselüler adezyon molekülü
ICP : İntrakavernozal basınç
iNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KK : Korpus kavernozum
LDL : Düşük molekül ağırlıklı lipoprotein
LOX : Lipoksijenaz
LOX-1 : Lektin benzeri Ox-LDL reseptörü-1
MAP : Sistemik arter basıncı
MAPK : Mitojen aktive edici protein kinaz
MMAS : Massachusetts Erkek Yaşlanma Çalışması
MCP-1 : Monosit kemoatraktan protein-1
MHC-II : Major histokompatibilite kompleks-2
MLC : Miyozin hafif zincir
MMP : Matriks metalloproteinaz

MPOA : Medial preoptik alan
NA : Noradrenalin
NANC : Nonadrenerjik nonkolinerjik
NF κ B : Nükleer faktör-kappa B
NMMA : N-mono-metil-L-arjinin
NO : Nitrik oksit
NOS : Nitrik oksit sentaz
nNOS : Nöronal nitrik oksit sentaz
Ox-LDL : Okside düşük molekül ağırlıklı lipoprotein
PAF-1 : Trombosit aktive edici faktör-1
PAI-1 : Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
PBS : Phosphate buffer saline
PDE : Fosfodiesteraz
PGE1: Prostaglandin E1
PGH2: Prostaglandin H2
PGI2 : Prostatiklin
PKB : Protein kinaz B
PKC : Protein kinaz C
PKG : Protein kinaz G
PTK : Protein tirozin kinaz
ROS : Reaktif oksijen ürünleri
RTPCR : Real time polimeraz zincir reaksiyonu
sGC : Soluble guanilat siklaz
SLE : Sistemik lupus eritematozus
TNF- α : Tümör nekroz faktörü alfa
t-PA : Doku plazminojen aktivatörü
VCAM : Vasküler hücre adezyon molekülleri
VDKH : Vasküler düz kas hücreleri
VIP : Vazointestinal polipeptid

LOX-1'in VASKÜLOJENİK EREKTİL DİSFONKSİYONDAKİ YERİ ve RESVERATROLÜN KORPUS KAVERNOZUMDA LOX-1 ve eNOS EKSPRESYONU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

Dr. Ozan Bozkurt

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji AD, İnciraltı, İzmir

AMAÇ

Hiperlipidemi özellikle Ox-LDL aracılığı ile endotel disfonksiyonuna yol açan bir durumdur. LOX-1 Ox-LDL'nin endotel disfonksiyonuna neden olan etkilerinden sorumlu ana reseptördür. Çalışmamızda vaskülojenik ED'de korpus kavernozumda LOX-1 ve eNOS ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler ve resveratrolün bu moleküller üzerine olan etkileri değerlendirildi.

YÖNTEM

Çalışmada 21 adet Yeni Zelanda türü erkek tavşan kullanıldı. Her grupta 7 tavşan olmak üzere kontrol, hiperkolesterolemi ve resveratrol grupları oluşturuldu. Altı hafta süreyle kontrol grubu normal yem, hiperkolesterolemi ve resveratrol grupları %2'lik kolesterol diyeti ile beslendi. Resveratrol grubuna 4 mg/kg/gün dozunda resveratrol verildi. Çalışma sonunda plazma kolesterol düzeyleri ve korpus kavernozumda LOX-1 ve eNOS ekspresyon düzeyleri değerlendirildi.

BULGULAR

Hiperkolesterolemi grubu total, LDL ve HDL kolesterol seviyeleri kontrol grubuna göre belirgin olarak artış gösterdi ($p<0,001$). Resveratrol grubunda total ve LDL kolesteroldeki artışın düzeldiği ($p<0,01$), HDL kolesterol seviyesinde bir düzelme olmadığı ($p>0,05$) saptandı. Üç grupta LOX-1 mRNA ekspresyon düzeyleri arasında farklılık saptanmadı ($p=0,488$). eNOS mRNA ekspresyonu hiperkolesterolemi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldı ($p=0,011$). Resveratrol grubunda eNOS mRNA ekspresyon düzeyinde hiperkolesterolemi grubuna göre belirgin artış olduğu saptandı ($p<0,001$).

SONUÇ

Çalışmamız resveratrolün hiperkolesterolemiyi düzeltmede etkili bir ajan olduğunu bir kez daha ortaya koymaktadır. Bununla birlikte resveratrolün vaskülojenik ED'de eNOS ekspresyonunu arttırdığını ilk kez bu çalışma ile gösterdik. Resveratrolün ED tedavisinde önerilebilmesi için korpus kavernozumdaki olumlu etkilerini destekleyecek ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Yine bu çalışma ile korpus kavernozumda LOX-1 ekspresyonu ilk kez gösterildi ve bulgularımız ışığında LOX-1'in vaskülojenik ED'de bir rolü olmadığını düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler : Hiperkolesterolemi, erektil disfonksiyon, LOX-1, eNOS, resveratrol

ROLE OF LOX-1 IN VASCULOGENIC ERECTILE DYSFUNCTION AND EFFECTS OF RESVERATROL ON LOX-1 AND eNOS EXPRESSION IN CORPUS CAVERNOSUM

Dr. Ozan Bozkurt

Dokuz Eylul University School of Medicine, Department of Urology, Inciralti, Izmir

OBJECTIVE

Hyperlipidemia causes endothelial dysfunction especially via Ox-LDL. LOX-1 is the main receptor type for the effects of Ox-LDL in endothelial dysfunction. Alterations of cavernosal LOX-1 and eNOS expressions in vasculogenic ED and effects of resveratrol on these two molecules were evaluated in this study.

METHODS

21 New Zealand white male rabbits were used in this study. Rabbits were separated into three groups as control, hypercholesterolemia and resveratrol groups with 7 rabbits in each group. Rabbits were fed with normal dietary intake for control group and 2% cholesterol diet for hypercholesterolemia and resveratrol groups through six weeks. Resveratrol 4 mg/kg/day was put in the drinking water of resveratrol group. Plasma cholesterol levels and cavernosal LOX-1 and eNOS expression levels were measured at the end of the study.

RESULTS

Total, LDL and HDL cholesterol levels increased significantly in the hypercholesterolemia group when compared with control group ($p < 0.001$). The rise in total and LDL cholesterol levels improved significantly in the resveratrol group ($p < 0.01$) whilst no change in HDL cholesterol levels were observed ($p > 0.05$). There was no difference in LOX-1 mRNA expression levels between three groups ($p = 0.488$). eNOS mRNA expression levels decreased significantly in hypercholesterolemia group when compared with control group ($p = 0.011$). A significant increase for eNOS mRNA expression levels was observed in resveratrol group when compared with hypercholesterolemia group ($p < 0.001$)

CONCLUSION

Our study agrees with the previous studies showing that resveratrol improves hypercholesterolemia. We determined for the first time that resveratrol increases eNOS expression in vasculogenic ED. Further studies supporting the beneficial effects of resveratrol in corpus cavernosum are needed to suggest resveratrol use in medical therapy of ED. To our knowledge the present study is the first to show LOX-1 expression in corpus cavernosum and LOX-1 does not seem to play a role in vasculogenic ED.

Key words : Hypercholesterolemia, erectile dysfunction, LOX-1, eNOS, resveratrol

GİRİŞ VE AMAÇ

Erektile disfonksiyon (ED); tatmin edici seksüel performans için yeterli ereksiyonun başlatılamaması ve/veya sürdürülememesi olarak tanımlanır. Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda tüm dünyada yaygın olarak görüldüğü ve yaş ilerledikçe görülme sıklığının arttığı bildirilmektedir (1,2,3). Hayatı tehdit edici bir durum olmasa da hasta ve partnerinin psikososyal durumları ve yaşam kalitesi üzerinde olumsuz etkileri vardır.

Erektile disfonksiyon için risk faktörlerine bakıldığında obezite, diabetes mellitus, hiperkolesterolemi, egzersiz alışkanlığının olmaması ve metabolik sendrom gibi aterosklerotik kalp hastalığı sürecinde rol oynayan risk faktörlerinin bir çoğunun erektile disfonksiyon içinde anlamlı riskler oluşturduğu bilinmektedir ve bu nedenle her iki durumdada benzer patofizyolojik mekanizmaların rol oynadığı düşüncesi günümüze kadar yapılmış birçok moleküler çalışmanın dayanak noktasını oluşturmaktadır. Son zamanlarda erektile disfonksiyon ve ateroskleroz gelişimi açısından en çok kabul gören patofizyolojik olay endotelial disfonksiyondur (4). Endotelial fonksiyonun regülasyonunda anahtar molekül nitrik oksid (NO) olarak bilinmektedir. NO endotel hücrelerinde L-argininden endotelial NO sentaz (eNOS) enzimi ile sentezlenir ve damar duvarı düz kasında gevşeme sağlar. Bu molekülün bioaktivitesinde herhangi bir nedenle azalma olması da endotelial disfonksiyon olarak tanımlanır. Endotelial disfonksiyon sonucunda damar duvarında aterosklerotik sürece katkıda bulunan proinflatuar, proliferatif ve prokoagulan değişiklikler ve vazokonstriksiyona eğilim gözlenir (5).

Yapılan çalışmalar endotel hücrelerinin aterosklerozun erken evrelerinde okside olmuş düşük molekül ağırlıklı lipoprotein (Ox-LDL) tarafından etkilendiğini ve Ox-LDL'nin endotel hücrelerinde reseptör aracılı yollarla aktivasyon ve ilerleyen süreçte endotel hücrelerinde disfonksiyon meydana getirdiğini göstermiştir. Ox-LDL'nin bu etkilerinden sorumlu ana reseptör tipi ise endotelial LOX-1 (lektin benzeri Ox-LDL reseptörü-1)'dir. LOX-1 ekspresyonu ilk olarak 1997'de Sawamura ve ark. tarafından bovin aortik endotelial hücrelerinde gösterilmiş olup, Ox-LDL'nin endotel hücrelerine bağlanması, internalizasyonu ve degradasyonundan sorumlu olduğu bildirilmiştir (6). Bunu takip eden çalışmalarda da Mehta ve ark. tarafından insan koroner arter hücre kültürlerinde LOX-1 ekspresyonu gösterilmiştir (7). LOX-1; Ox-LDL'nin NO

salınımında azalma (8), MCP-1 sekresyonu (9), reaktif oksijen ürünlerinin oluşması (10) ve apoptozis (11) gibi proaterojenik etkilerinde önemli role sahiptir.

Eretil disfonksiyonun patofizyolojisinde, özellikle vaskülojenik erektil disfonksiyonda endotel disfonksiyonunun rolü son zamanlarda yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (12,13). Aterosklerozda görülen endotelyal disfonksiyonda ve proaterojenik süreçte önemli rolü olan LOX-1 reseptörünün ekspresyonu insanlarda endotelyal disfonksiyonun en sık gözlemlendiği çeşitli dokularda gösterilmiş olmasına rağmen erektil disfonksiyon patogenezinde moleküler olayların süregeldiği korpus kavernozum endotel hücrelerinde henüz gösterilmemiştir. Bu çalışma ile vaskülojenik erektil disfonksiyon modelinde korpus kavernozum endotel hücrelerinde LOX-1 reseptör ekspresyonu gösterilerek bu reseptörün ED patofizyolojisindeki rolü belirlenmek istendi.

Resveratrol çok çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik etkileri olan bir polifenoldür. Kırmızı üzüm, kırmızı şarap, kırmızı üzüm suyu ve polygonum cuspidatum bitki kökünden ekstrakte edilmektedir. Çok çeşitli etkilerinden olan antiproliferatif özelliğinden dolayı kanseri önleyici bir molekül olarak tekrar gündemdedir (14). Kalp sağlığı dolayısıyla endotelyal fonksiyonlar üzerindeki etkisindeki en önemli mekanizma NO biyoyararlanımını arttırmasıdır, bunu da eNOS, iNOS ekspresyonunda artışa yol açarak sağlar (15). Bunun dışında da kalp sağlığı üzerine olumlu etkisinde rol oynayan birçok faktör mevcuttur (16).

Bu çalışmadaki amacımız, proaterojenik süreçteki endotelyal disfonksiyonda önemli role sahip LOX-1 (lectin benzeri Ox-LDL reseptörü-1) reseptör ekspresyonunun, benzer fizyopatolojik süreçlerin gözlemlendiği vaskülojenik erektil disfonksiyonda korpus kavernozum endotel hücrelerinde ekspresyonunun ve bu süreçte rol oynayıp oynamadığının gösterilmesidir. Resveratrolün daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda endotelyal fonksiyonlar üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. Androloji laboratuvarımızda yapılan bir doktora tezi çalışmasında da resveratrolün çeşitli büyük damarlarda ve korpus kavernozumda hiperkolesteroleminin endotelyal fonksiyonlar üzerine olan olumsuz etkilerinden korunmada rolü olduğu gösterilmiştir. Aynı deneysel modelde bu sefer resveratrolün moleküler düzeyde eNOS ve LOX-1 ekspresyonu üzerine olan etkileri değerlendirilecektir.

GENEL BİLGİLER

Eretil disfonksiyonun ilk tanımı İÖ 2000 yıllarına kadar gider ve Mısır Papirüslerinde yazılıdır. Şimdiki tanımıyla ED, cinsel aktivite için yeterli ereksiyonun sağlanamaması ve/veya sürdürülememesi durumunun süreklilik kazanması biçiminde tanımlanır (17,18). Eretil fizyoloji hakkındaki güncel bilgilerin çoğu 1980'ler ve 1990'lar da elde edilmiştir. Arteriyel ve venöz kan akımını regüle eden düz kasların rolüne ek olarak, tunika albugineanın üç boyutlu yapısı ve onun venöz oklüzyondaki rolü ortaya konmuştur. Sinirsel kontrolün anlaşılmasında önemli bir aşama da NO'in başlıca nörotransmitter olduğunun ve fosfodiesterazların (PDEs) penisi flask duruma döndürdüğünün belirlenmesidir. Düz kas tonusunun ayarlanmasında endotelin rolü ve hücreler arasındaki bağlantı noktaları "gap junctions" yoluyla oluşan ilişkiler de ortaya konmuştur. Düz kas, endotel ve fibroelastik çatıda diyabet, ateroskleroz ve yaşlanma ile oluşan değişikliklerin patofizyolojisinde belirlenmiştir.

Eretil disfonksiyon prevalansı:

Eretil disfonksiyon insidansı yaşla birlikte artmaktadır. ED prevalansına ilişkin en kapsamlı ve güvenilir verileri Feldman ve arkadaşları tarafından 1987 ile 1989 yılları arasında yapılan Massachusetts Erkek Yaşlanma Çalışması (MMAS) sağlamıştır (1). Çalışma sonucunda, Boston-Massachusetts bölgesinde rastgele seçilen 11 şehir ve kasabada, yaşları 40-70 arasında değişen 1290 erkekte uygulanan bir anket sonucunda ED prevalansı %52 olarak bildirilmiştir. Bu hastaların %9,6'sında şiddetli ED, %25,2'sinde orta, %17,2'sinde ise hafif şiddette ED saptanmıştır (1). Bu grubun 1995 ile 1997 tarihlerinde yaptığı araştırma sonuçları 1987 ile 1989'da yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında komplet eretil disfonksiyon oranının %5,1'den %15'e yükseldiği, orta derecede disfonksiyonun %17'den %34'e yükseldiği, hafif disfonksiyonun ise %17 civarında sabit kaldığı görülmüştür. Ülkemizde ise ED prevalansı ile ilgili bilgiler oldukça yenidir. Akkuş ve arkadaşlarının yaptığı epidemiyoloji çalışmasına göre ülkemizde 40-70 yaş arası erkeklerde ED prevalansı % 69,2'dir (hafif % 33,2, orta % 27,5 ve şiddetli % 8,5) ve şiddeti yaş ile birlikte artış göstermektedir (19).

Penisin fonksiyonel anatomisi:

Penis, gevşek bir cilt ve ciltaltı dokusu ile sarılı bir çift KK ile uretrayı içeren bir adet korpus spongiosumdan oluşan eretil bir organdır. Penis boyutu ereksiyon ve flask durumuna

göre değişmektedir. Bir çalışmada penis flask durumunda pubopenil bileşkedeki eksternal meaya kadar 8,8 cm, gerilmiş olarak 12,4 cm, ereksiyonda 12,9 cm ölçülmüştür (20). Penisini oluşturan yapıların fonksiyonu Tablo 1’de gösterilmiştir.

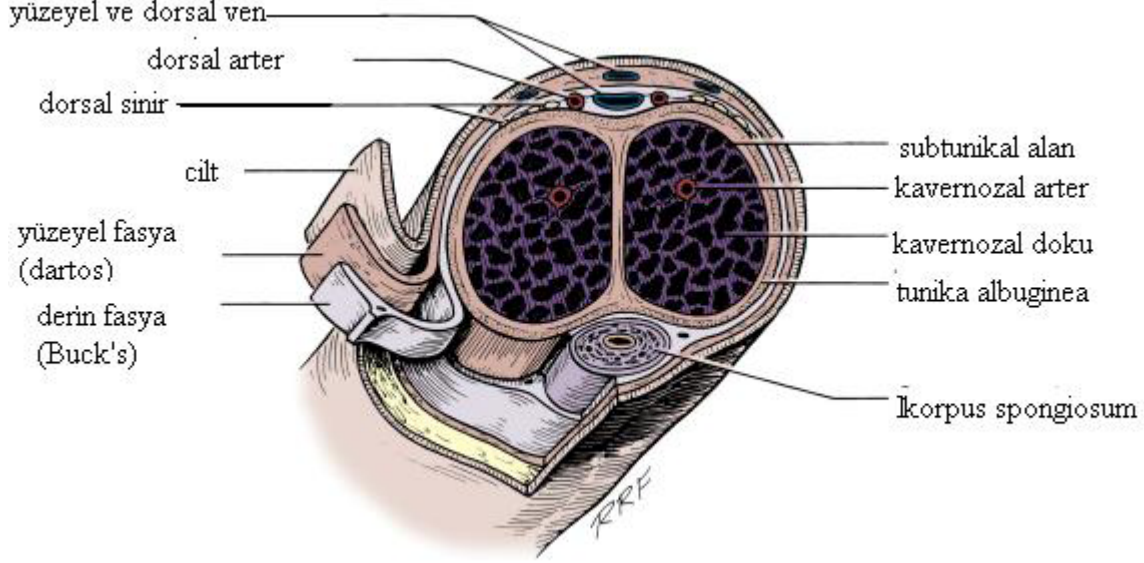
| | |
|-----------------------|---|
| Korpus kavernozumlar | Korpus spongiozum ve glansı destekler. |
| Tunika albuginea | Eretil dokuyu sarar ve korur, kavernöz cisimlerin sertliğini sağlar, venaokluziv mekanizmaya katılır. |
| Düz kas | Sinüzoidlere kan girişini ve çıkışını sağlar. |
| İskionkavernöz kaslar | Ereksiyonu hızlandırmak için kanı distale pompalar. Rijit ereksiyon fazında ek penil sertlik sağlar. |
| Bulbokavernöz kaslar | Semenin atılmasına yardımcı olarak bulber üretrayı sıkıştırır. |
| Korpus spongiozum | Semenin üretradan atılmasına izin veren basınçta, dar bir boşluk sağlar. |
| Glans | Penisin kadın organlarındaki etkisini azaltan bir yastık görevi görür. |

Tablo 1: Penisini oluşturan yapıların fonksiyonu

Kavernöz cisimler: Sinüslerin oluşturduğu vasküler bir yapıdır. Derin penil kavernozaal arter ve devamı olan rezistans heliksin arterlerden kan temin ederler. Trabeküller, emisser venülleri kavernozaal vene bağlayan subtunikaal venler ile drene olurlar. Histolojik olarak, KK’lar öncelikle trabeküler düz kaslar (%40-50), endotel, sinirler ve fibroblast gibi bağ dokularından (%45-50) oluşur. Korpus kavernozumlar tunika albuginea ile sarılmış bir çift süngersi silindirlere oluşur. Proksimal uçları, krural, iskion-pubis kollarının alt yüzeyinden köken alan iki yapı halindedir, ancak pubik arkusun altında birleşerek glansa kadar yapışık olarak devam ederler. Korpus kavernozumlar tunika albuginea, septum, intrakavernöz septalar, intrakavernöz fibröz çatı, periarteriyel ve perinöral fibröz kılıflar tarafından desteklenir (Şekil 1).

Korpus spongiozum ve glans penis: Korpus spongiozum iki kavernöz cisim birlikte çevreleyen Buck fasyası ile kavernöz cisimlerden ayrılan bir yapıdır (Şekil 1). Korpus spongiozumun distale doğru uzantısı glans penisini oluşturur ve KK’ların distal uçlarını şapka gibi kapatır. Korpus spongiozumun içinden üretra geçer. Korpus spongiozumun proksimal tarafı daha

kalın olup urogenital diyafragma bağlıdır, üretranın bulbus kısmını içerir ve kruslar arasında kalan bu bölüme penis bulbusu ismi de verilir (21).



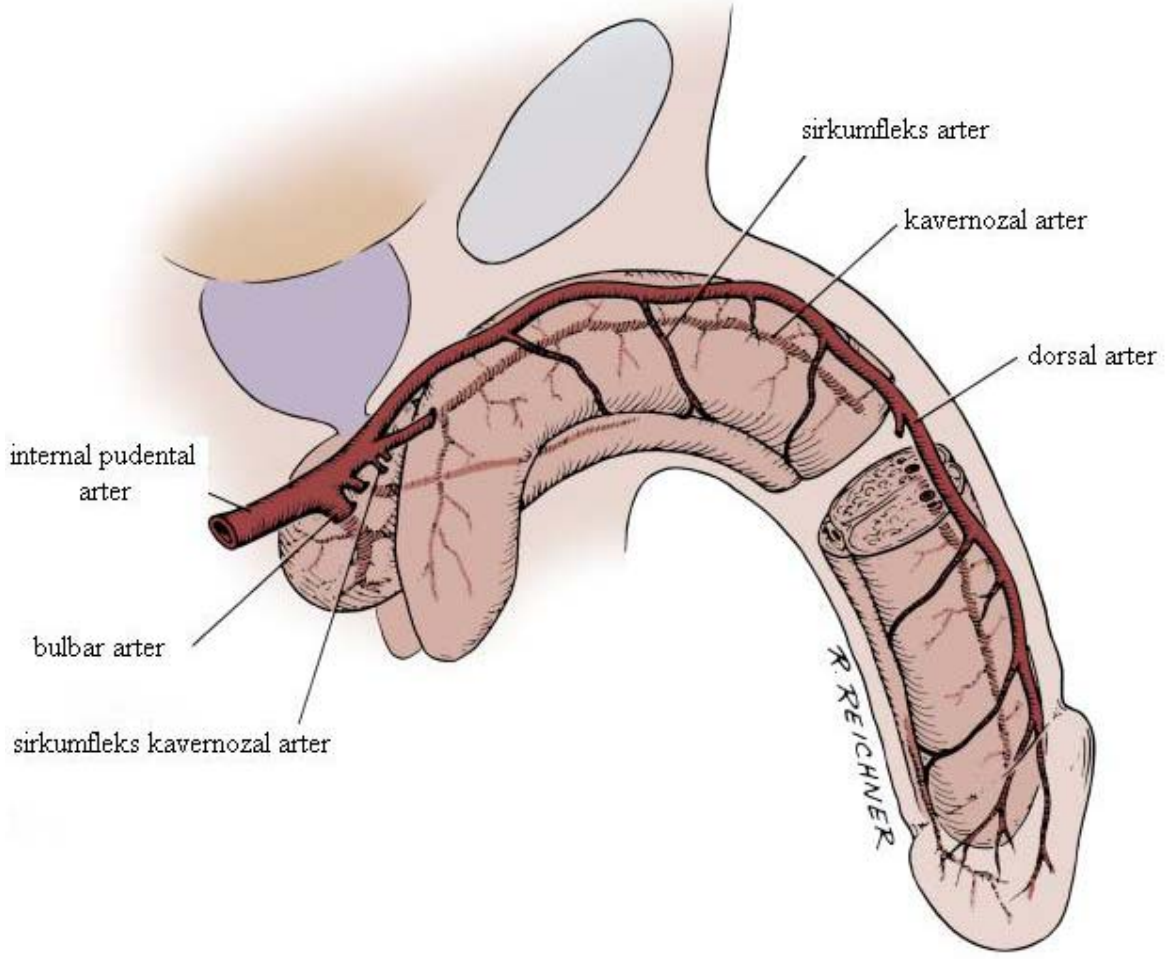
Şekil 1: Penisi oluşturan anatomik yapılar (From Devine CJ Jr, Angermeier KW: *Anatomy of the penis and male perineum. AUA Update Series 1994;13:10-23.*)

Tunika Albuginea: İçte sirküler ve dışta longitudinal olmak üzere kavernöz cisimleri saran çok tabakalı bir dokudur (22,23). Septum, iki kavernöz cismi ayıran geçirgen bir yapı olup tunika albugineanın sirküler iç tabakası ile devam eder. İç tabakadan septuma uzanan intrakavernozal bantlar erektil dokuya asıl desteği sağlayan septumu güçlendirir. Distal penis içindeki intrakavernozal destek yapılar saat 5 ve 7 pozisyonunda ve bu desteklerden farklı yönlere uzanan minör destek yapılar ise saat 2 ve 6 pozisyonuna uzanarak KK'ü çaprazladıktan sonra tunika ile birleşirler (23). Kavernöz cisimler arasında uzanan ve süngersi cisimin yerleştiği saat 6 hizasında tunika albugineayı saran longitudinal tabaka bulunmaz. Tunika albuginea, elastin lifler ile içiçe girmiş biçimde fibriler kollajenden oluşmuştur. Kollajen tunikaya asıl sertliğini veren yapıdır. Elastin içeriği tunika albugineanın kompliyansını ve gergin haldeki penis uzunluğunun belirlenmesini sağlar (23). Emitter venler iç ve dış tabakalar arasında kısa bir mesafe seyrederek, sıklıkla dış tabaka liflerini oblik olarak delerler. Bununla birlikte, KK'a ilave kan akımı sağlayan kavernöz arter ve dorsal arterin dalları daha direkt bir yol izler ve periarteriyel yumuşak doku kılıfı ile çevrilidirler. Bu kılıf ereksiyon sırasında arterlerin tunika albuginea tarafından

sıkıştırılmasını önler. Dış tunikal tabaka ereksiyon sırasında emisser venlerin sıkıştırılmasında rol oynayan bir tabakadır (24).

Penisin vasküler yapısı:

Arteriyel Dolaşım: Penisin arteriyel kan akımı internal iliak arterden çıkan internal pudental arter ile sağlanır (25,27). Bununla birlikte eksternal iliak, obturator, vezikal ve femoral arterlerden aksesuar arterler gelebilir (26). İnternal pudental arter bulboüretal, dorsal ve kavernozaal arterlere ayrılır (Şekil 2). Bulboüretal arterler glansı ve üretrayı besler. Kavernozaal arterler iki kururanın birleştiği noktadan kavernoza cisme girerler. Kavernozaal arterler distalde trabekülleri besleyen helisin arterlere dönüşür. Dorsal penil arter ikiye dallanarak peniste saat 11 ve 1 pozisyonunda dorsal sinirler boyunca yayılır ve peniste yüzeysel yapıları ve kavernoza cismi besleyen sirkumfleks arteri oluşturur. Aynı zamanda pelvik bölge arterleri arasında zengin damar anastomozları bulunabilir ve normalden farklı olarak heriki korporal oluşum tek taraflı beslenebilir (25,27).



Şekil 2: Penisin arteriyel yapısı (*Campbell Urology; ninth edition*)

Venöz drenaj: Üç korpusun venöz drenajı, hemen tunika albugineanın altındaki periferik sinüzoidlerden kaynaklanan ince venüllerden başlar. Bu venüller tunika ve periferik sinüzoidlerin arasındaki trabekülalar içinde seyreder ve emisser venler olarak çıkmadan önce subtunikal venüler pleksusu yaparlar. Tunika albugineanın dışında venöz drenaj aşağıdaki gibidir.

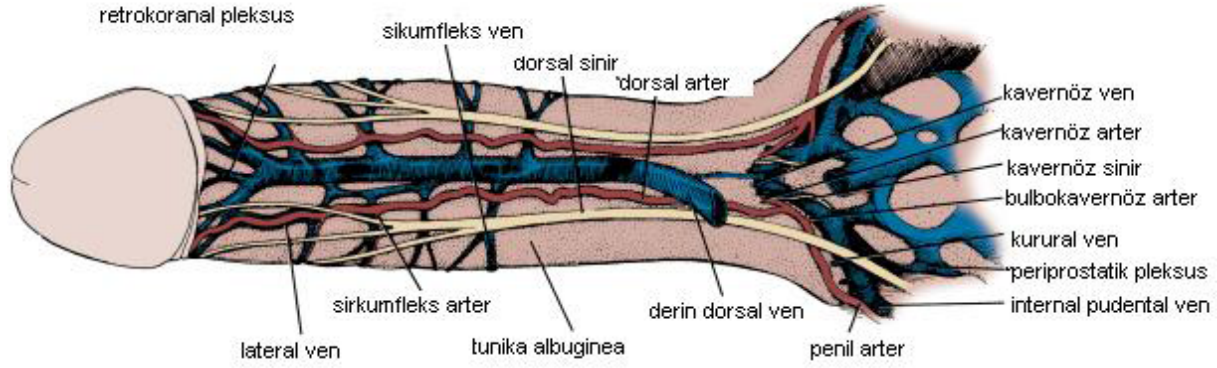
1. Cilt ve ciltaltı dokusu: Multipl yüzeysel venler cilt altında seyrederek penis köküne yaklaşıncaya birleşerek tek veya çift yüzeysel dorsal veni yapar, daha sonra safen venlere dökülür. Nadiren yüzeysel dorsal ven KK'ların bir bölümünü de drene edebilir.
2. Pendülöz penis: KK'un ve spongiozumun emisser venleri dorsalde derin dorsal, lateralde sirkumfleks ve ventralde ise periüretal venlere dökülür. Koronal sulkustan başlayarak,

derin dorsal ven glans penisin, korpus spongiosumun ve KK'ların distal üçte ikisinin başlıca venöz drenajını sağlar. Genellikle tek bazen ise birden fazla derin dorsal ven, periprostatik venöz pleksusa dökülmek üzere simfizis pubis arkasından yukarı doğru seyreder.

3. İnfrapubik penis: Proksimal KK'ları drene eden emisser venler kavernoza ve krural venleri oluşturmak üzere birleşirler. Bu venler bulböz üretradan gelen periüretral venlerle birleşerek internal pudental venleri oluştururlar.

Üç sistemin venleri birbiriyle değişen oranda ilişkilidir. Venöz sistemlerin sayısı, dağılım ve sonlanmadaki değişkenliği sıklıkla (25,27).

Penisin nöral innervasyonu: Penis, otonomik (sempatik ve parasempatik) ve somatik (duyusal ve motor) sinirlerle innerve edilir. Parasempatik pregangliyonik sinirler ise 2. ve 4. sakral vertebradan çıkarak pelvik ve hipogastrik pleksusa yayılır. Bu pleksus pregangliyonik ve postgangliyonik liflerin penise doğru iletilmesini sağlar. Kavernoza sinirinin çıkış noktası pelvik pleksustur. Prostat kapsülüne kadar pelvik fasya boyunca ilerler ve prostatın posterolateraline uzanır. Kavernoza sinir dalları membranöz üretranın distalinde süngersi cismin tunika albugineasını penetre eder. Diğer dallar, pudental arter ve kavernoza venler boyunca kavernoza cisimlerin kururasına girer. Geri kalan iki dal penisin distal kısımlarını uyararak üzere dorsal sinire doğru yayılır (Şekil 3). Sempatik pregangliyonik lifler 9. torasik ve 4. lomber vertebraların pregangliyonik nöronlarından köken alırlar. Bu nöronlar, spinal kord seviyesinde sempatik zincir nöronları ile devam ederek süperior hipogastrik pleksusa yayılırlar. Bu pleksus sağ ve sol hipogastrik sinirlere ayrılırlar. Bu uzantılardan biri daha sonra pelvik pleksus ile birleşir. Penis, glans ve diğer perineal ve inguinal alanlardaki duyusal reseptörlerden köken alan uyarılar dorsal penil sinirlerle taşınır. Bu sinir, diğer pelvisin sinirlerindeki bünyesinde toplayarak internal pudental siniri oluşturur ve 2., 3. ve 4. sakral vertebranın dorsal köküne çıkar. Sonuç olarak dorsal penil ve diğer duyusal sinirler sakral spinal korda pudental sinirle iletilmiş olur. İkinci, 3. ve 4. sakral vertebradan çıkan penisin motor innervasyonu, bulbokavernoza ve iskiyokavernoza kaslara sakral ve pudental sinirlerle iletilir. İskiyokavernoza kas kontraksiyonu ile rijit ereksiyon safhasında kavernoza cismi baskılayarak sıkıştırır. Bulbokavernoza kas ise ritmik kontraksiyon ile ejakülasyon esnasında semen atımını sağlar (25,27).

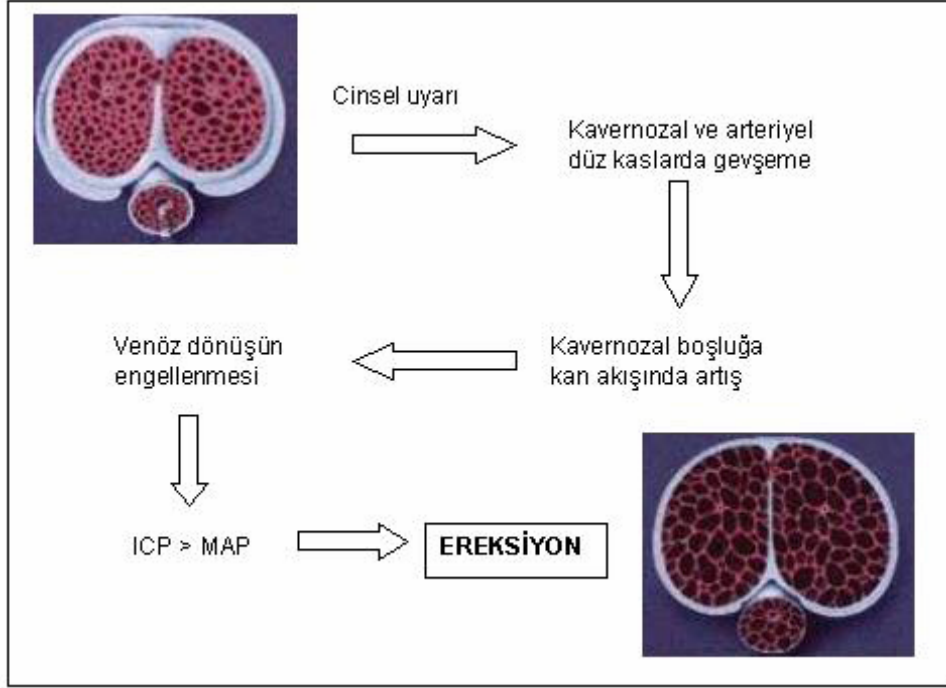


Şekil 3: Penisin nöral inervasyonu ve vasküler yapısı (From Hinman F Jr: *Atlas of Urological Anatomy*. Philadelphia, WB Saunders, 1993, p 445.)

Ereksiyonun fizyolojisi:

Penil ereksiyon, arteriyel akımda artma, sinüzoidal düz kaslarda gevşeme, venöz dönüşte azalma ile karakterize, nöromediatörler, çizgili ve düz kaslar ile tunika albugineanın koordine çalışması sonucu ortaya çıkan kompleks bir olaydır (28). Son 20 yılda yapılan fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalar KK trabeküler düz kas yapısının penis içinde önemli bir yapı olduğunu ve penil ereksiyonun ve detümesansın kontrolünde rol aldığını göstermiştir (29,30). Penil ereksiyon, KK ve korpus spongiosum düz kas liflerinde gevşeme ve penil arteriyel dilatasyon sonrası penise kan dolması sonucu oluşur (17). Ereksiyonu başlatan uyaran geldiğinde sinüzoidal düz kaslar gevşer, sinüzoidlerin kompliyansı artar, arteriyel direnç azalır ve penil kan akımı artar. Penil kan akımının artması ereksiyon oluşmasında primer hemodinamik olay olarak kabul edilir. Genel bir ifade ile ereksiyonun oluşumu esas olarak iki olayın entegrasyonu ile sağlanır;

- I. Arteriyel ve kavernozaal düz kas relaksasyonu ile sinüzoidlere olan kan akımının artışı (31,32),
- II. Kanla dolan sinüzoidlerle tunica albuginea arasında yer alan emisser venlerin basıyla kapanıp sinüzoidler içindeki göllenmenin artması (Şekil 4).



Şekil 4: Cinsel uyarı sonrası kavernozal yapıda görülen genişleme.
ICP: Kavernozal yapılardaki basınç, MAP: Sistemik kan basıncı

Bu temelden yola çıkılarak penis ereksiyon sırasında meydana gelen değişiklikler altı fazda ele alınabilir:

1. İstirahat (Flaccid) fazı: İnsan KK'unda sempatik uyarı ile açığa çıkan noradrenalin (NA), düz kas tonusunun modülasyonunda rol oynayan majör nörotransmitterdir (33). Detümesans ve penisin istirahat hali büyük oranda, sempatik sinir terminallerinden salınan NA'nın, korporal düz kaslardaki postsinaptik yerleşimli alfa reseptörleri aktive etmesi sonucu oluşur (34). Noradrenalin ile artan düz kas tonusu penise olan kan akımının düşük düzeyde kalmasına yol açar (34). Sempatik deşarj ile düz kaslar tonik olarak kontrakte halde kalırlar ve yalnızca nutrisyonel amaçlı arteriyel kan akımına izin verilir.

2. Latent faz: Seksüel uyarı ile kavernöz sinir uçlarından nörotransmitter salınımı olur. Uyarıların penisi besleyen arter ve kavernozal düz kaslardaki reseptörlere ulaşması, ereksiyon mekanizmasını tetikler (35). Hem diastolik hem de sistolik fazda arter ve arteriyollerin dilatasyonu ile kavernöz arter kan akımı artar. Peniste yavaş bir uzama ve dolma başlar. Yoğun

kan akımı genişleyen sinüzoidler tarafından hapsedilir. Tunica albuginea ile periferik sinüzoidler arasında subtunikal ven pleksuslarının kompresyonu, venöz akımını azaltır.

3. Tümesans fazı: Tam ereksiyon gelişinceye kadar intrakavernozal basınç artmaya devam eder. Penis hızla genişler ve tam kapasiteye ulaşıncaya kadar uzamaya devam eder (36).

4. Tam ereksiyon fazı: İntrakavernozal basınç artarak sistolik basınca yaklaşır. Pudental arterdeki kan akımı, tümesans fazındakinden daha az, fakat istirahat fazındakinden daha fazladır.

5. Rijid ereksiyon fazı: Pudental sinirden kaynaklanan uyarı ile iskiokavernoz kasta oluşan istemli kasılma sonucunda kavernoöz cisim içindeki basınç sistolik basınçtan daha yüksek değerlere ulaşır.

6. Detümesans fazı:

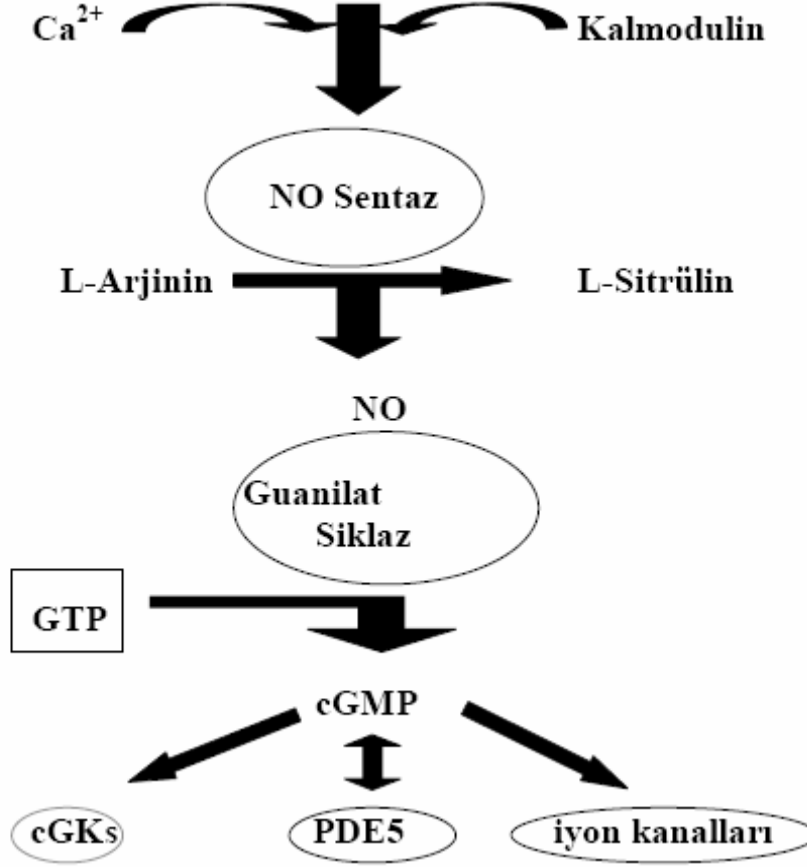
a. İnisiyal detümesans: Ejakülasyon veya stimülasyonun bitmesinden sonra istirahat fazındaki gibi kavernoöz cisim içinde tekrar sempatik sinirlerden salınan NA'nin hakimiyeti başlar. Sempatik sistemde artan aktivite, helisin arter tonusunun artmasına ve trabeküler düz kaslarda kasılmaya yol açar

b. Yavaş detümesans: Arteriyel akım azalarak bazal düzeylere ulaştığında, venöz kanallar yavaşça yeniden açılır. İntrakavernozal basınçta da orta derecede bir azalma vardır.

c. Hızlı detümesans: İntrakavernozal basınç hızla düşer ve veno-oklusiv mekanizma inaktif hale gelir. Arteriyel akımın da uyarı öncesi haline dönmesiyle penis flak hale yeniden döner.

Penil ereksiyon oluşumunda, temel olarak santral ve periferik sistemler tarafından düzenlenen, birçok santral ve periferik nörotransmitter ve biyokimyasal sinyaller yer alır (25, 37). Ereksiyonu başlatan ve devamında rol oynayan nörotransmitterler arasında NO, dopamin, asetilkolin, vazointestinal polipeptid (VIP), prostaglandin E1 ve Calsitonin Gen Related Peptid (CGRP) proteini bulunur (38). Penisin detümesans durumundan ise NA, endotelinler, kontraktıl prostaglandinler ve nöropeptid Y sorumludur. Periferal olarak kasıcı ve gevşetici faktörler arasındaki denge KK düz kasının kasılma derecesini kontrol eder (39). Penil ereksiyon için gerekli olan kavernoöz düz kas gevşemesinde NO/siklik guanizin monofosfat (cGMP), VIP/siklik adenozin monofosfat (cAMP) gibi pek çok yolak rol oynar (40,41). Lokal olarak endotelial hücreler ve kavernoöz damarların nonadrenerjiknonkolinerjik (NANC) uyarılması ile oluşan NO'nun KK gevşemesinde ve penil ereksiyonda ana mediyatör olduğu kabul edilmektedir

(40,42). NO'nun sentezi ve çözünebilir guanilat siklaza bağlanması erektil süreç için gereklidir. Bu yolakta farmakolojik aracılık eden pek çok basamak vardır (Şekil 5).



Şekil 5: L-arjinin / nitrik oksit / guanilat siklaz / cGMP

Nitrik oksid, L-arjiniinden NOS aracılığıyla sentezlenir. Korpus kavernozumda endotel ve sinir inervasyon noktaları NO'nun esas olarak salgılandığı yerlerdir. NO sentezinden sorumlu olan NOS'un birden fazla izoformu vardır; eNOS, nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) (43). Nöronal NOS; NANC sinir uçları, dorsal penil sinir dalları ve derin dorsal arter adventisyasındaki sinir pleksuslarından, eNOS ise kavernozaal endotelden ve intrakavernozaal helisin arterlerden salgılanır (43,44). İndüklenebilir NOS ise inflamatuvar mediyatörlerin ve bakteriyel ürünlerin indüksiyonunu takiben farklı hücrelerden izole edilebilir ancak iNOS peniste eksprese olmaz (45).

Seksüel uyarı sonrası NANC sinirlerin uyarılması NOS salınımına neden olur. Salınan NO arteriyel ve kavernozaal düz kas yapısına diffüze olur (43,46,47). NO düz kasta cGMP seviyesini arttırarak soluble guanilat siklazı (sGC) aktive eder. Soluble guanilat siklaz cGMP bağımlı protein kinaz G (PKG)'yi aktive eder. Aktive PKG, Ca²⁺ kanal aktivitesini ve hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunu azaltır. Azalan (Ca²⁺), Ca²⁺ bağımlı K⁺ kanallarını açılmasını sağlayarak düz kas hücresinde hiperpolarizasyona neden olur (48). Protein kinaz G aynı zamanda diğere proteinleri fosforilleyerek Ca²⁺ konsantrasyonunu etkiler veya miyozin hafif zincirin (MLC) fosforilasyon durumunu değıştirir. Hepsi birden NO bağımlı KK düz kas gevşemesine neden olur (Şekil 5) (48,49).

Eretil disfonksiyonun patofizyolojisi:

Normal eretil fonksiyon, birçok düzenleyici sistemin varlığı ve koordinasyonunu, ayrıca fizyolojik, hormonal, nörolojik, vasküler ve kavernozaal faktörlerin etkileşimini gerektirir. Bu faktörlerin herhangi birinde oluşan değışiklikler ED'nun oluşması için yeterli olmasına karşılık; birçok vakada bu etkenlerin değışiklikleri kombine bir şekilde bulunmaktadır (Tablo 2) (50).

| |
|---|
| Vaskülojenik |
| - Kardiyovasküler hastalıklar |
| - Hipertansiyon |
| - Diabetes mellitus |
| - Hiperlipidemi |
| - Sigara |
| -Major cerrahi veya radyoterapi (pelvik veya retroperitonyum) |
| Nörojenik |
| - <i>Santral</i> |
| - Multipl skleroz |
| - Multipl atrofi |
| - Tümör |
| - İnme |
| - Disk hastalıkları |
| - Spinal kord hastalıkları |
| - <i>Periferik</i> |
| - Diabetes mellitus |
| - Alkolizm |
| - Üremi |
| -Polinöropati |
| - Pelvik veya retroperitonyum cerrahisi |
| Anatomik |
| - Peyronie hastalığı |
| - Penil kurvatur |
| - Mikropenis |
| - Hipospadyas, epispadyas |
| Hormonal |
| - Hipogonadizm |
| - Hiperprolaktinemi |
| - Hiper veya hipotiroidi |
| - Cushing hastalığı |
| İlaçlar |
| - Antihipertansifler |
| - Antipsikotikler |
| - Antidepresanlar |
| - Antihistaminikler |
| - Antiandrojenler |
| - Bağımlılık yapan maddeler (eroïn, kokain, kodein) |
| Psikojenik |
| - Generalize tip |
| - Durumsal tip |

Tablo 2: ED patofizyolojisinde rol oynayan faktörler

Vaskülojenik erektil disfonksiyon:

Hipogastrik-kavernöz-helisin arter dallanmasında aterosklerotik ya da travmatik tıkanıklık yapan arteriyel hastalıklar, sinüzoidal boşluklara perfüzyon basıncını ve arteriyel kan akımını azaltarak, maksimum ereksiyona kadar geçen zamanı uzatır ve erekte penisin rijiditesini azaltır. Arteriyojenik ED'lu hastaların birçoğunda, penil perfüzyonun azalması yaygın aterosklerotik sürecin bir parçasıdır. Arteriye yetmezlikle birlikte görülebilen yaygın risk faktörleri aterosklerotik koroner arter hastalığı, hipertansiyon, hiperlipidemi, diabetes mellitus, sigara, perineal veya pelvik künt travma, pelvik radyasyondur. Koroner arter hastalığı ve ED'nun başlangıç yaşı ve insidansı arasında paralellik olduğu saptanmıştır. Diyabetik ve yaşlı erkeklerin kavernöz arterlerinde intimal proliferasyon, kalsifikasyon ve lümen stenozu ile birlikte fibrotik lezyon insidansının yüksek olduğu bildirilmiştir (51). Tavşan modelinde, iliak arterler balon ile deendotelize edilerek ve tavşanlar bol kolesterolü diyet ile beslenerek iliak arterde oluşturulan proksimal ateroskleroz sonrası vaskülojenik ED geliştirilmiştir. ED hem iliak damarlardaki azalmış kan akımı, hem de trabeküler düz kaslarda azalmış genişleyebilme özelliğine bağlı venookluzif disfonksiyon ile açıklanmaktadır (52,53,54). Yapılan diğer tavşan modellerinde ateroskleroz ve hiperkolesteroleminin azalmış NOS aktivitesi, artmış tromboksan A2 ve prostaglandin üretimi ile birlikte olduğu ve elektrik stimülasyonuna yanıt olarak, düz kas gevşemesinde bozukluk olduğu gösterilmiştir. Hiperkolesterolemideki bu bozulmuş NO bağımlı düz kas gevşemesi, serbest oksijen radikallerinin salınımına, N-mono-metil-L-arjinin (NMMA) ve asimetric dimetilarjinin (ADMA) gibi NOS inhibitörlerinin artışına bağlanmaktadır. Yapılan ultrastrüktürel çalışmalar, kolesterol ağırlıklı beslenmiş tavşanlarda KK'da erken dönemde aterosklerotik değişikliklerin başladığını göstermektedir. Bu değişiklikler ED'un primer sebebi olmakla birlikte, aterosklerotik lezyonların ilerlemesine ve daha kompleks hale gelmesine neden olmaktadır (55).

Nörojenik erektil disfonksiyon:

Seksüel fonksiyonda rol alan santral sinir ağı veya periferik sinirlerdeki herhangi bir yaralanma, ED'ye sebep olabilir. Bu ED formu 'nörojenik impotans' olarak adlandırılır. ED'nun %10-19 oranında nörojenik kökenli olduğu tahmin edilmektedir (56,57). Medial preoptik alan

(MPOA), paraventriküler nükleus ve hipokampus penil ereksiyon ve seksüel dürtü için önemli integrasyon merkezleri olarak görülür. Bu bölgeleri etkileyen Parkinson hastalığı, inme, ensefalit ya da temporal lob epilepsisi gibi patolojik durumlar sıklıkla ED ile birlikte dir. Spinal kord travmalı hastalarda erektil fonksiyonun derecesi büyük ölçüde spinal lezyonun niteliği, yeri ve yaygınlığına bağlıdır. Spinal kordun üst motor nöron komplet lezyonlarında refleks ereksiyon %95 oranında korunurken, alt motor nöron komplet lezyonlarında ise sadece %25 oranında ereksiyon sağlanabilir. Spinal kordu etkileyen tümör, transvers myelit, multipl skleroz, spina bifida, sringomyeli, disk hernisi gibi nedenler ED'a yol açabilmektedir (58,59).

Beyine lokal bilgileri ileten ve refleks ereksiyonun afferent koluna katkıda bulunan duyu sal sinirlerin veya trabeküler düz kasların gevşemesi arteriyel dilatasyonu sağlayan otonomik sinirlerin zarar görmesi sonucu ED gelişebilir. Ağır metaller, organik bileşikler, bazı toksinler ve organik bileşikler, DM, alkolizm, üremi, hipotiroidizm, Lepra, HIV, viral enfeksiyonlar, SLE, hemokromatozis periferik sinirleri etkileyerek ED'a neden olurlar (27).

Endokrinolojik erektil disfonksiyon:

ED'u olan hastalarda hipogonadizm nadir rastlanan bir durum değildir. Androjenlerin libido ve seksüel davranışa etkileri iyi bilinmektedir (60). Ganata ve ark.(1997) erkeklerde testosteron seviyesi ile nokturnal ereksiyon arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve nokturnal ereksiyon için, eşik değerin 200 ng/dl civarında olduğunu bildirmişlerdir (61). Androjenlerin etki mekanizmasını ortaya koymak için yapılan hayvan çalışmalarında, kastrasyon sonrası arteriyel akımın azaldığı, venöz kaçak oluştuğu, penis düz kaslarında alfa adrenerjik reseptörlerinin ve apoptozisin arttığı, KK'daki düz kas içeriğinin, kavernoöz sinir uyarısının ve nNOS aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (62,63). Hipotalamohipofizer aksı etkileyen tümör, konjenital anomaliler, travma, cerrahi gibi nedenler ED'a neden olabilir. Hipofiz adenomu veya ilaçlara bağlı olarak gelişen hiperprolaktinemide libido azalması, ED, galaktore, jinekomasti ve infertilite gibi semptomlar oluşabilir. Ayrıca yüksek prolaktin seviyeleri gonadotropin salgılatıcı hormon sekresyonunu baskılayarak testosteron seviyesinin azalmasına neden olabilir.

ED hem hipertiroidi hem de hipotiroidi ile birlikte görülebilir. Hipertiroidide sıklıkla dolaşımdaki östrojen seviyesi artışına bağlı olduğu düşünülmektedir. Hipotiroidide düşük testosteron salınımı ve yüksek prolaktin seviyesi ED'a katkıda bulunur. Diyabet her ne kadar en

yaygın endokrinolojik hastalık ise de, hormon eksikliğinden ziyade, daha çok vasküler, endotelyal, nörolojik ve psikolojik komplikasyonları nedeniyle ED'a yol açmaktadır.

Psikojenik erektil disfonksiyon:

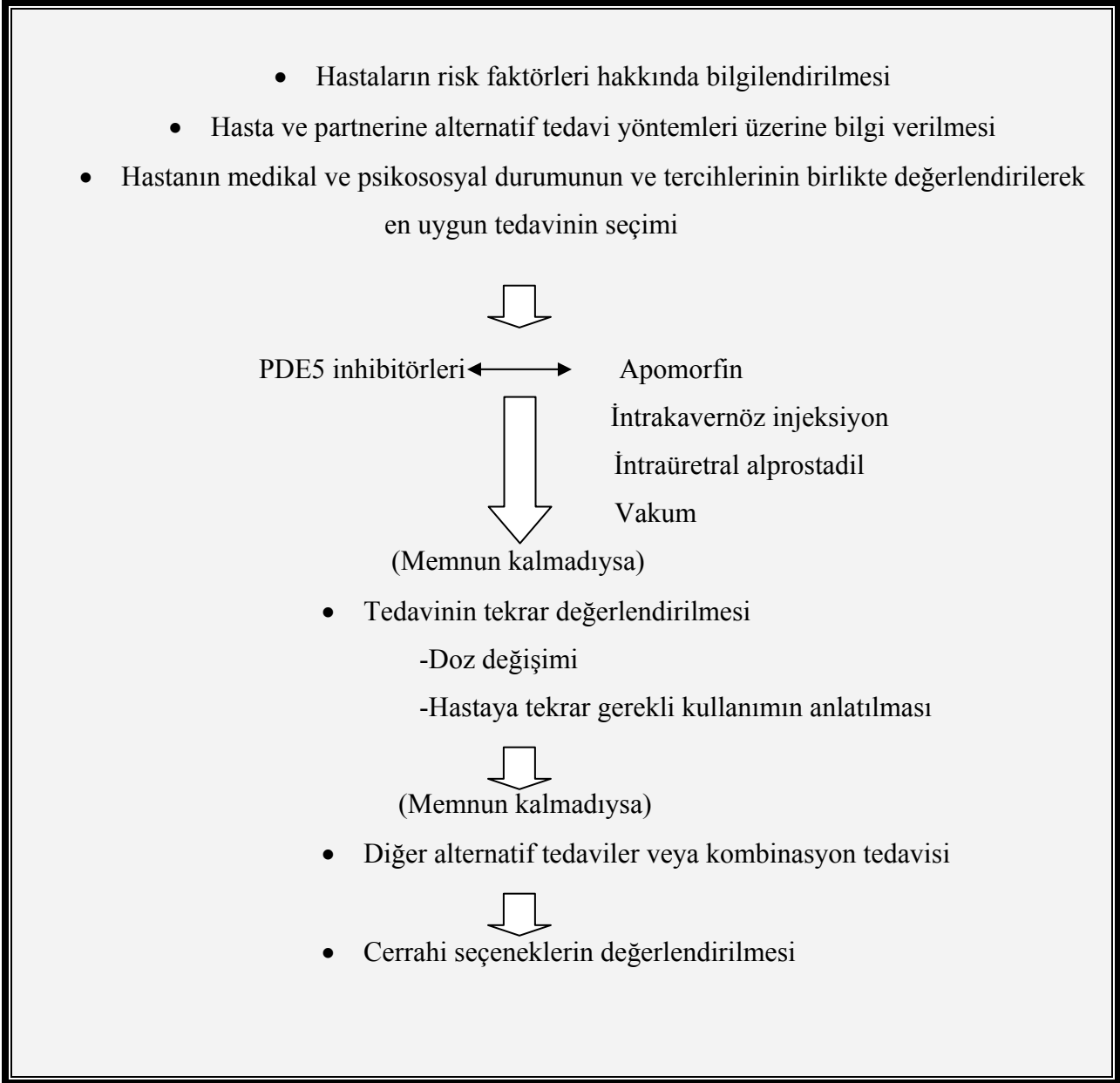
Seksüel davranışlar ve penil ereksiyon, hipotalamus, limbik sistem, serebral korteks tarafından kontrol edilir. Bundan dolayı uyarıcı ya da inhibe edici mesajlar ereksiyonu kolaylaştırmak yada engellemek için spinal ereksiyon merkezlerine aktarılabilir. Psikojenik ED tipleri Tablo 3'de verilmiştir. Psikojenik disfonksiyonda ereksiyonun inhibisyonunu açıklayan iki olası mekanizma ileri sürülmektedir: Bunlardan ilki, normal suprasakral inhibisyonun aşırılığı şeklinde beynin spinal ereksiyon merkezini inhibe ederek, penis düz kas tonusunu arttırarak, ereksiyon için gerekli gevşemeyi engelleyen aşırı sempatik deşarj ya da yükselmiş periferik katekolamin seviyeleri; diğer teori ise, erkeklerde seksüel cevap merkezi sinir sistemi içindeki uyarıcı ve engelleyici uyarılar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu dengenin bozulması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir (50).

| I. Jeneralize tip | II. Durumsal tip |
|--|---|
| A. Jeneralize cevapsızlık | A. Partnerle ilişkili |
| 1. Seksüel uyarılmanın primer yokluğu | 1. İlişkiye özel uyarılma yokluğu |
| 2. Seksüel uyarılmada yaşlanmaya bağlı düşme | 2. Seksüel obje tercihine bağlı uyarılma yokluğu |
| B. Jeneralize inhibisyon | 3. Partner anlaşmazlığına ya da tehdidine bağlı yüksek santral inhibisyon |
| 1. Kronik seksüel mahramiyet hastalığı | B. Performansla ilişkili |
| | 1. Diğer seksüel disfonksiyonlarla birlikte |
| | 2. Durumsal performans anksiyetesi |
| | C. Psikolojik stres ya da denge ile ilişki |
| | 1. Negatif mood durumu ile birliktelik |

Tablo 3: Psikojenik ED tipleri

Erektile disfonksiyonunun tedavisi:

Amaç sadece rijit bir ereksiyon sağlamak değil aynı zamanda tatminkar bir cinsel yaşam oluşturmaadır. ED'lu hastalarda tedavi yaklaşımı Tablo 4'deki gibi olmalıdır (64).



Tablo 4: ED'li hastalarda tedavi yaklaşımı

1. Farmakolojik Tedavi:

Farmakolojik tedaviler, merkezi, periferik veya her iki şekilde etkili olabilirler. Bu tedavide iki grup ilaç vardır (65).

1. Merkezi sinir sistem üzerine etkili olanlar

- Apomorfin
- Yohimbin

2. Periferik etkili ilaçlar

Oral

- PDE5 inhibitörleri (sildenafil, tadalafil, vardenafil)
- Apomorfin
- Yohimbin

Intrakavernozal ve topikal

- Fentolamin
- PGE1
- Papaverin

PDE5 inhibitörleri

PDE inhibitörleri vücutta tüm vasküler dokularda bulunur. İnsan KK dokusunda pek çok tipte PDE izoenzimi saptanmıştır. Ancak penisteki primer etkin form tip 5'tir. PDE5 enzimi ikinci haberci olan cAMP ve cGMP yıkımını sağlar. Bu nedenle PDE5, penil aktivitede son derece önemli bir rol oynamaktadır. PDE5 enzimini inhibe eden ilaçlar, seksüel uyarı olduğunda cGMP yıkımını önleyerek NO'nin düz kas üzerindeki doğal etkisini artırır ve dolayısıyla ereksiyonu kolaylaştırır. PDE5 enzimi, penis KK düz kasları dışında, vasküler düz kasta, gastrointestinal sistemde, trombositlerde, böbrek ve santral sinir sisteminde bulunurlar. Bu nedenle PDE5 inhibitörleri baş ağrısı, yüzde kızarma, nazal konjesyon, dispepsi gibi yan etkilere neden olabilmektedir. Bununla beraber diğer PDE izoenzimlerinin inhibisyonuna bağlı olarakta gözde ışığa duyarlılık, mavi görme, myalji, sırt ağrısı gibi istenmeyen etkiler de gözlenmektedir.

Her üç PDE5 inhibitörlerinin etki başlangıç süresi ve etki sürekliliği bakımından bazı farklılıklar bulunmaktadır. Ortalama 15-30 dakika içinde etkili olmaya başlarlar. Bu etkinlik

sildenafil ve vardenafilde ortalama 5 saat, tadalafilde ise 24-36 saat arasında devam edebilmektedir.

Nitrat kullanan hastalarda PDE5 inhibitörlerinin kullanılması kesin kontrendikedir, çünkü kullanımlarında nitratların hipotansif etkilerini güçlendirici etkileri vardır, kan basıncı tehlikeli düzeylere düşebilir. Alfa blokör kullanan hastalarda alfa blokör tipine bağlı olarak dikkatli kullanımı şarttır. CYP 3A4 inhibitörleri (eritromisin, ketokonazol, simetidin gibi) kullanan hastalarda PDE5 inhibitörleri mümkün olan en düşük dozda verilmelidir.

Apomorfın

Hipotalamusta yer alan D2 dopaminerjik reseptörleri üzerine merkezi olarak etki eden bir ajandır. Sertleşme sorunu olan erkeklerin tedavisinde sublingual olarak kullanılmaktadır. Etki süresi 20 dakikadan azdır. Hafif orta şiddette bulantı, uyuşma, esneme ve ender olarak vazovagal senkop gibi yan etkiler görülebilmektedir. Postural hipotansiyon öyküsü olanlarda dikkatli kullanılması gerekmektedir.

Yohimbin

ED tedavisindeki başarısı üzerine önemli bir istatistiksel bilgi mevcut değildir. Santral ve periferik seksüel davranışı uyaran bir alfa 2 adrenerjik antagonisttir. Baş ağrısı, gastrointestinal intolerans, ajitasyon, anksiyete, kan basıncı artışı gibi yan etkiler görülebilmektedir. Nitrat kullananlarda kontrendikedir.

Androjen replasman tedavisi (ART)

Hipogonadizm ilerleyen yaşla ortaya çıkan, plazma androjen seviyesinde düşüşle kendini gösteren klinik ve biyokimyasal bir sendromdur. Çok sayıda organ sistemlerini etkileyebilir ve cinsel fonksiyonlar başta olmak üzere yaşam kalitesinde önemli düşüslere yol açar. Cinsel fonksiyon bozukluğuyla başvuran, hipogonadizm semptomları olan ve serum testosteron seviyesi düşük veya alt sınırdaki hastalarda androjen tedavisine başlanmalıdır. ART tipik olarak kronik veya yaşam boyu verilmesi gereken bir tedavi olduğundan, hastaların düzenli takibi büyük önem taşımaktadır. Anormal karaciğer fonksiyonları, hiperlipidemi, polisitemi, prostat ve meme kanseri, mesane boynu obstrüksiyonları, agresif davranış ve uyku apnesi olanlarda kontrendikedir.

Intrakavernozal Enjeksiyon Tedavisi

Intrakavernozal enjeksiyonla tedaviye ilk kez 1982 yılında papaverinle başlanmıştır. Birçok hekim tarafından hem teşhis hem de tedavide yaygın olarak kullanılsa da daha az invaziv tedavi alternatiflerinin çıkmasıyla ilk basamak tedavi olarak kullanımı azalmıştır.

Prostaglandin E1(PGE1)

Düz kas hücrelerinin yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlerle adenilet siklaz enzimini aktive eder. Bu enzim adenozin trifosfatı (ATP) siklik adenozin monofosfata çevirir. cAMP hücre içi kalsiyum miktarını azaltarak düz kas gevşemesine neden olur. Bu tedavi yöntemi etkin ve kolay tolere edilebilmektedir.

Papaverin

PDE enziminin selektif olmayan blokörüdür. Hem cAMP hem de cGMP yıkımını inhibe ederek sitoplazmik kalsiyum miktarını düşürür ve bu yolla düz kas relaksasyonuna neden olur. Çoğunlukla oral tedaviye yanıt vermeyen olgularda kullanılmaktadır.

Fentolamin

Alfa 1 ve alfa 2 adrenerjik reseptörleri inhibe eden ve bu yolla NA aksiyonunu inhibe eden bir ajandır. Genellikle papaverin veya PGE1 kombinasyonlarıyla kullanıldığında daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

Intraüretral- intrameatal tedaviler

Alprostadil, PGE1'in sentetik formu olup aktif bileşeni korpus spongiosum ve KK arasındaki venöz kanallar aracılığıyla etki eder. Ereksiyon oluşturmak için kavernoöz düz kaslarda gevşemeyi başlatır. Ereksiyon 15-30 dakika içinde başlar, 30-60 dakika kadar etkisi sürmektedir. Etkinliği PDE5 inhibitörleri ve intrakavernöz enjeksiyon tedavisine kıyasla daha düşüktür. Avantajı enjeksiyon gerektirmemesidir. En sık yan etkileri penil ağrı ve üretral yaralanmadır.

Vakum Cihazları

Penis etrafında vakum etkisi oluşturarak kanın korporal boşluklara toplanmasını sağlayan invaziv olmayan bir yöntemdir. Vakum cihazları özellikle daha stabil ilişki içinde olan yaşlı

erkeklerde ve diğer tedavi yöntemlerinin etkili olmadığı durumlarda yararlıdır. Belli oranda peniste rahatsızlık ve soğukluk hissi gibi yan etkiler görülebilmektedir. Hastaların %10-15'inde peniste morluk gözlenebilmektedir.

2.Cerrahi tedavi

Vasküler cerrahiler

1. Penil revaskülarizasyon
2. Ven bağlama operasyonları
3. Veno-oklüzyon + arteryel yetmezlik operasyonları

Penil protezler

1. Bükülebilir
2. Şişirilebilir

Endotelin fonksiyonu:

Normal endotel bütün damar düz kaslarında bulunan, damar duvarını kaplayan ince bir epitel tabakasıdır. Vazodilatatör ve vasokonstriktör substratların yapımında etkili olarak, vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan en küçük endokrin organdır (66). Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar, endotelin dokularla kan arasında seçici bir bariyer oluşturmaktan başka homeostazda da çok önemli işlevleri olan bir doku niteliğini taşıdığını göstermiştir. Endotel hücreleri salgıladıkları mediatörler ile koagülasyonu, fibrinolizisi, damar tonusunu, dolayısıyla kan akışı ve kan basıncını etkileyip çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynayan aktif hücrelerdir (67,68,69) .

Endotelyum hücre fonksiyonları beş bölüm altında özetlenebilir.

1. Kontrol edilemeyen makro moleküllü protein ve lipoproteinlerin çevre dokuya infiltrasyonuna karşı seçici bariyer görevi görmesi.
2. Dolaşımda bulunan lipoproteinlerin metabolizmasına katılıp subendotelyal bölgeye geçecek lipoproteinlerin tabiatına karar vermek
3. Trombosit agregasyonu ve trombozisi önlemek
4. İmmünkompetan hücrelerle birlikte savunma mekanizmalarına katılmak
5. Gevşetici ve kasıcı maddeler salarak vasküler tonusun düzenlenmesine katkıda bulunmak

Endotel bu fonksiyonlarını aşağıdaki gibi çok sayıda salgıladığı maddeler aracılığıyla sağlamaktadır (67,68).

1- Vasokonstriktörler

- Anjiotensin konverting enzim
- Endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3)
- Anjiotensin II
- Tromboksan A2
- Asetil kolin, araşidonik asit, PGH2, trombin, nikotin

2- Vasodilatatörler

- Nitrik oksit (NO=EDRF)
- Adrenomedüllin
- Endotel bağımlı hiperpolarizn faktörler
- Prostasiklin (PGI2)
- Bradikinin, asetilkolin, serotonin, histamin, substans P

3- Antitrombotik (hemostaz) maddeler

- Trombomodülin
- Doku plazminojen aktivatör (t-PA)
- Plazminojen aktivatör inhibitörü tip I (PAI-1)

4- Büyüme modülatör / mediatörleri

a) Büyüme promotörleri

- Heparin sülfat
- TGF- β
- NO
- Bradikinin
- Prostasiklin

b) Büyüme inhibitörleri

- PDGF
- FGF
- IGF-1
- IL-1
- Endotelin
- Anjiotensin II

5- İnflamatuar mediatörler

Adezyon molekülleri;

- Endotelial Lökosit Adezyon Molekülü (ELAM)

- İntraselüler Adezyon Molekülü (ICAM)
 - Vasküler Hücre Adezyon Molekülleri (VCAM)
- Antijenler;*
- Major histokompatibilite kompleks-2 (MHCII)

Vasküler Tonusun Endotelium Tarafından Düzenlenmesi:

Vasküler tonusun düzenlenmesi, endotelin en önemli görevi olarak bilinmektedir. Bu görevi birçok kasıcı ve gevşetici ajan salımı ile sürdürür. Bu faktörler arasındaki denge endotelin fonksiyonel veya disfonksiyonel durumunu belirler.

Vazodilatasyon Oluşturan Faktörler

Endotel hücreleri tarafından salınan ana gevşetici faktör NO'dur. NO, L-arjininin L-sitruiline oksidasyonu sırasında NOS enzimi tarafından oluşturulan serbest radikaldir (70). Bu enzimin nNOS, iNOS ve eNOS olmak üzere 3 alt tipi vardır. Endotelium hücreleri esas olarak eNOS eksprese ederler ve buna bağlı olarak devamlı bir biçimde sistemik ve pulmoner dolaşıma düşük miktarlarda NO salıverirler (71). Endotelium hücrelerinde NO bir defa salındıktan sonra düz kas hücrelerinde bulunan "Hem" in prostetik grubu ile etkileşir. Bu ise guanilat siklaz aktivasyonuna ve cGMP üretiminde artışa neden olur. Artmış cGMP hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda azalmaya ve buna bağlı olarak ise vasküler düz kas hücrelerinde (VDKH) gevşemeye neden olur (72). Prostaglandin ve endotel bağımlı hiperpolarizan faktör (EDHF), endotelium tarafından salgılanan ve damar tonusunun düzenlenmesi üzerine etkili diğer vazodilatör ajanlardır. Prostaglandinler endotelium tarafından humoral ve hemodinamik yanıt olarak üretilirler (73). Araşidonik asidi substrat olarak kullanılarak siklooksijenaz (COX) enzimi aracılığı ile sentezlenirler. Prostaglandinler gevşetici etkilerini adenilat siklaz stimülasyonuna bağlı olarak VDKH'de hücre içi cAMP konsantrasyonunu arttırarak gösterirler (73,74). Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ise gevşetici etkisini hücre membranında potasyum geçirgenliğini arttırarak gösterir (75).

Vazokonstriksiyon Oluşturan Faktörler

Normal vasküler tonusun devamlılığı için endotelium hücreleri endotelinler, tromboksan A_2 ve prostaglandin H gibi birçok kasıcı mediyatör salgılar. Bunların içerisinde Endotelin-1 (ET-1)

endotelyum hücreleri tarafından salınan en güçlü kasıcı ajandır (76). Trombin, adrenalin, Anjiotensin II, hipoksi ve artmış gerilim stresi gibi uyarılara yanıt olarak üretilir (77). VDKH' de spesifik reseptörlerine bağlanarak hücre içerisindeki kalsiyum konsantrasyonunun artışına sebep olur ve NO'in etkisini antagonize eder. İlginç olarak sağlam endotelyumda ET-1, NO ve prostasiklin üretimini stimüle ederek ve vazokonstriktör etkiyi ayarlayarak kendi sentezini azaltır (78).

Endotel hücreleri tarafından sentezlenen tromboksan A₂ ve prostaglandin H₂ VDKH'lerindeki ve trombositlerdeki tromboksan reseptörlerini aktive ederler. Bu faktörler de NO'in ve prostasiklinin etkilerine ters bir etki oluşturarak VDKH'de kasılmaya neden olurlar. Bununla beraber bu maddelerin koroner arter üzerine olan etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Trombosit aktive edici (PAF-1)'de endotelyum hücrelerinden humoral ve hemodinamik uyarılar sonucunda sentezlenen ve salınan vazomotor tonus ayarlayıcı başka bir kasıcı ajandır. Son olarak endotelyum anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) eksprese eder ve bu da anjiotensin I'den Anjiotensin II dönüşümüne neden olarak direkt ET-1 salınımına neden olur.

Sonuç olarak vazokonstriktif ve vazodilatör ajanların arasındaki bu ilişki sağlıklı endotelin vasküler tonus üzerine olan etkisini belirler. Bu denge üzerinde herhangi bir değişiklik endotelial disfonksiyon gelişimine neden olur.

Enflamasyon ve Trombozisin Endotelyum Tarafından Düzenlenmesi:

Vasküler tonusun devamlılığının sağlanması dışında, normal endotelyum anti-proliferatif ve anti-enflamatuvar özelliklere de sahiptir. Endotelyum bağımlı vazodilatör olan NO; lökositlerin endotelyum duvarına adezyonunu (79,80), vasküler düz kas hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonunu inhibe eder (81,82) ve endotelyum hücrelerinin proliferasyonunu stimüle eder (83). Bunun yanında NO trombosit agregasyonunun inhibisyonu ve trombosit deagregasyonunun stimülasyonunu sağlar (84).

Prostasiklinler; bir diğer endotelyum bağımlı gevşetici ajanlardır. Bu ajanlar, NO ile sinerjistik olarak etkileşir veya NO'e sinerjistik olarak etki ederler, trombosit

agregasyon ve adezyonunu inhibe ederler (74). Bunun yanında sağlıklı endotelyum hücrelerinin yüzeyleri negatif yüklü olarak heparanlar ile sarılmıştır ve kontakt inhibisyon sağlarlar (85). Endotelyum hücreleri doku plasminojen aktivatörleri (tPA), trombin inaktivatörleri ve trombomodülin gibi antikoagülan faktörler sentezlerler (86). Sonuç olarak lökositler vasküler yüzeye tutunamaz ve hücre proliferasyonunu sıkıca kontrol ederler (87). Bunlar endotelial disfonksiyon ve ateroskleroz karşısında görev alan savunma sistemleridir.

Endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz:

Damar endoteli kan damarlarının iç yüzeyini kaplayan bir yapıdır. Yıllarca; kan ve interstisyum arasında geçirgenliği sağlayan yarı geçirgen bir yapı olarak düşünülmüştür. Endotel hücresinin korunması ve normal fonksiyonunun devam etmesi tedavi yönünden büyük önem taşımaktadır. Birçok hastalıkların nedeni ve seyrinde endotel hücre fonksiyonlarında patolojik dönüşümler olmaktadır. Bu dönüşümlerde aterojenik, hemorajik, protrombojenik ve vazospastik olaylara neden olmaktadır. Günümüzde aşağıdaki patolojiler “endotelopatiler” olarak tanımlanmaktadır. Endotel hastalıkları olarak da isimlendirilmektedir. Bu endotel hastalıkları aşağıdaki Tablo 5’de verilmiştir (88).

| | |
|---------------------------------|---------------------------|
| -Ateroskleroz | - Diabetes mellitus |
| -Primer pulmoner hipertansiyon | -Reperfüzyon hasarı |
| -Toksemi | -Vaskulit |
| -Enfeksiyonlar | -Hemolitik üremik sendrom |
| -Amiloidoz | -Kawasaki hastalığı |
| -SLE | -Romatoid artrit |
| -Transplantasyon endotelopatisi | -Von Willebrand Hastalığı |
| -DİC | -AİDS |

Tablo 5: Endotelopatiler

Travma ve birçok patolojik faktörlere bağlı olarak oluşan endotelyum aktivasyonu, kendi düzenleyici fonksiyonlarında değişiklikler oluşmasına neden olur. Endotelyum vasküler

hemostazın sağlanmasında yetersiz hale gelir. Bu olay ise gevşetici ve kasıcı ajanlar, prokoagülan ve antikoagülan mediyatörler, hücre büyümesi uyarıcıları ve inhibe edicileri arasında sırası ile oluşan dengesizliğe neden olarak endotelial disfonksiyon olarak tanımlanan olaya neden olur.

Endotelial Disfonksiyona Bağlı Vasküler Tonus Azalması:

Vasküler tonus kaybı endotelial disfonksiyon oluşumunda ilk ortaya çıkan olaydır. Kasıcı ajanların artması ve gevşetici ajanların azalması ile karakterize bir olaydır. Birçok çalışma NO'nin kullanılabilir miktarında azalma ve endotelial disfonksiyon arasında güçlü bir ilişki olduğunu bildirmiştir (89,90). Bu olay eNOS'in aktivitesinde azalmaya veya NO'nin indirgenmesindeki artışa bağlı olabilir. NO kan damarlarındaki endotelium bağımlı gevşemeden temel olarak sorumlu olduğu için, ateroskleroz sırasında bu gevşetici etkinin bozulması koroner ve periferik arterlerde gevşeme yanıtlarında ciddi azalmaların oluşmasına neden olmaktadır (91,92).

Vazodilatör NO'nin kaybına ek olarak, ET-1 gibi vazokonstriktör faktörlerin üretiminde artış da endotelium hasarı ile ilişkilidir (93,94). Bu olay ise NO kaybında daha fazla artışa neden olmakta ve damar yapısının kontrolsüz kasılması ile sonuçlanmaktadır. İlerleyen dönemlerde ise hipertansiyona ve koroner kalp hastalıkları, ED, periferik arter hastalıkları gibi hastalıklara neden olmaktadır.

Ateroskleroz patogeneğinde NO çok önemli bir yere sahiptir. Dış uyarılara yanıt olarak oluşan endoteliumun NO üretiminde azalma aterosklerozun başlangıcı olarak değerlendirilmektedir (95). Bu nedenle aterosklerozun önlenmesi için asıl önlenmesi gereken basamağın endotelial disfonksiyon basamağı olduğu ileri sürülmektedir.

Enflamasyon ve Tromboziste Kontrol Kaybı:

Endotelial fonksiyonun kaybı normal antikoagülan savunma mekanizmasında bozukluk ile sonuçlanır. NO azalması, anormal heparanlar, lokal trombin aktivasyonu, PAF-1 ve trombomodülin lokal koagülasyona katkıda bulunurlar (96). Benzer olarak artmış tPA inhibisyonu ve doku PAF-1'inin azalması pıhtı lizisinde azalmaya neden olur (97,98). Trombin aktivasyonu, membrana bağlı trombosit adezyon molekülleri, kollajen maruziyeti, doku faktörlerinin üretiminde artış ve NO azalması trombosit adezyon ve agregasyonuna neden olur (99,100).

Endotelial disfonksiyon gelişmesine aracılık eden birçok risk faktörü ve patolojik uyarılar aynı zamanda damar duvarının anormal çalışmasına neden olur. Bu olay ise sinyal kaskadı sonucu adezyon ve enflamasyonun tetiklenmesini sağlar ve damar duvarındaki VDKH'lerinin, fibroblastların ve matriksin anormal büyümesi ile sonuçlanır. Bu süreç ise intimal kalınlaşma ve plak formasyonuna ilerler (101).

Endotelial Disfonksiyonda Oksidatif Stresin Rolü:

Endotelial disfonksiyon gelişimi bazı fizyolojik belirleyicilerin azalması ile ilişkilidir. Oksidatif stres veya reaktif oksijen türleri (ROS) endotelial disfonksiyon gelişimindeki ana unsurlardan biridir. Hücre içi ROS oluşumundaki mekanizma NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz, lipoksijenaz (LOX), sitokrom p450, monooksijenaz ve COX gibi çoklu enzim sistemlerini içerir (102,103). Damar yapısında ROS oluşması NO azalmasına ve peroksinitrit oluşumuna neden olur (104). Böylece NOS'ın normalde NO üreten oksijenaz kısmı yerine ROS üreten redüktaz aktivitesi görmesine yol açar. Bu olay ise pozitif geri-bildirim yolu ile daha yüksek miktarda ROS üretimi ile sonuçlanır (105). Peroksinitrit LDL moleküllerinin oksidasyonunda önemli bir mediyatördür (106). Okside-LDL (Ox-LDL) oluşumundan sonra endotelial disfonksiyonu arttırabilir ve ateroskleroz patogeneziye katkıda bulunabilir. Yapılmış olan çalışmalar LDL partiküllerinin yoğunluğunun, Ox-LDL düzeyinin, bireylerde LDL'nin oksidasyona olan eğilimini ve Ox-LDL' e karşı oluşan otoantikörlerin miktarının endotelial disfonksiyon ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (107). Ox-LDL, NO üretimini birçok farklı mekanizma ile etkileyebilir.

- a. Ox-LDL, endotelial hücrelerine agonistler tarafından stimule edilmiş olan arjinin transportunu inhibe edebilir.
- b. Ox-LDL, eNOS ekspresyonunu hem mRNA hem de protein düzeylerinde inhibe ederek NO üretimini direkt olarak inhibe edebilir (108).
- c. Ox-LDL, ADMA miktarlarını arttırabilir. ADMA NOS'ın kompetitif inhibitörüdür ve L-arjinin ile substrat düzeyinde yarışarak NO üretimini azaltabilir (109,110).

NO üretiminin azalmasına bağlı olarak Ox-LDL trombin oluşumuna ve trombosit agregasyonunun artmasına neden olur (111). Ek olarak Ox-LDL prostasiklinler ve ET-1 gibi diğer endotelial ürünler arasındaki dengenin bozulmasına neden olarak trombosit agregasyonuna neden olur (102,112). Bunun sonucunda Ox-LDL'nin oluşması moleküler mekanizmalar aracılığı ile endotelial disfonksiyona neden olur.

Ox-LDL'nin ateroskleroz gelişimi üzerine etkisi olan günümüzde ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır. Ox-LDL endotelial hücreleri, makrofajlar ve VDKH'leri gibi damarsal içeriği aktive eder. Aynı zamanda monositler için kemotaktik uyarıları aktive ederek onları makrofajlar haline çevirir. Bu makrofajlar Ox-LDL'yi yakalayıcı reseptörleri (SR) (CD-36, SR-A, SR-PSOX) aracılığı ile alırlar ve "köpük hücreleri"ne dönüşürler. Bu hücreler ise ateroskleroz için anahtar özelliğindedirler (113).

ROS ve onun modifiye hedef biyomolekülleri (ör: Ox-LDL) gerçek ikincil mesajcı moleküller olarak adlandırılırlar. Bunlar nükleer transkripsiyon faktörlerinin artışı, kalsiyum sinyali, protein kinaz ve protein fosfataz yollarının modülasyonu gibi birçok önemli sinyal transdüksiyon kaskadının düzenlenmesinde rol alırlar (114,115).

Mitojen aktive protein kinaz (MAPK), nükleer faktör-kappa B (NFκB) ve aktivatör protein-1 gibi redoks duyarlı nükleer transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel aktivitelerini artırır ve fosforile eder (102). Bu nükleer faktörlerin aktivasyonu ise adezyon ve makrofaj ve lökositlerin endotele yapışmasını kontrol eden proteinleri kodlayan genlerde upregülasyona neden olur.

Monosit Kemotaktik Protein -1 (MCP-1)'in artmış olan üretimi mononükleer fagositlerin toplanmasına, intrasellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1)'in ekspresyonunda artışa ve E-selektin ile de bu hücrelerin damar duvarına yapışmasında artışa neden olur. Bu artış hem Ox-LDL tarafından hem de endotelial hücrelerinin redoks durumundaki değişikliğine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (116,117). Azalmış NO ve artmış oksidatif stres aynı zamanda özellikle aktive matriks metalloproteinazları MMP-2 ve MMP-9'u aktive eder ve ateroskleroz ilerleyişinde hızlanmaya neden olur (118,119). Sonuç olarak NO bioyararlanımının azalması, artmış oksidatif stres ve adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve sitokinler ile birlikte oluşan endotelial disfonksiyon sadece başlangıç aşamasında değil aynı zamanda aterosklerotik hastalığın progresyonu ile de ilişkilidir (120).

Vazokonstriktör ajan olan anjiotensin II (Anj II) NADPH oksidazı aktive ederek ROS oluşumuna ve süperoksit radikallerini artırarak NO miktarında azalmaya ve buna bağlı vasküler

fonksiyonlarında bozulmaya neden olur (121). Anj II sadece vazokonstriktör olarak görev almaz; aynı zamanda ET-1 üretimini de stimule eder (122). ET-1 ve Anj II VDKH'nin proliferasyonunu arttırarak ateroskleroz gelişimine katkıda bulunurlar (123, 124).

Lektin benzeri okside-LDL reseptörü-1 (LOX-1)

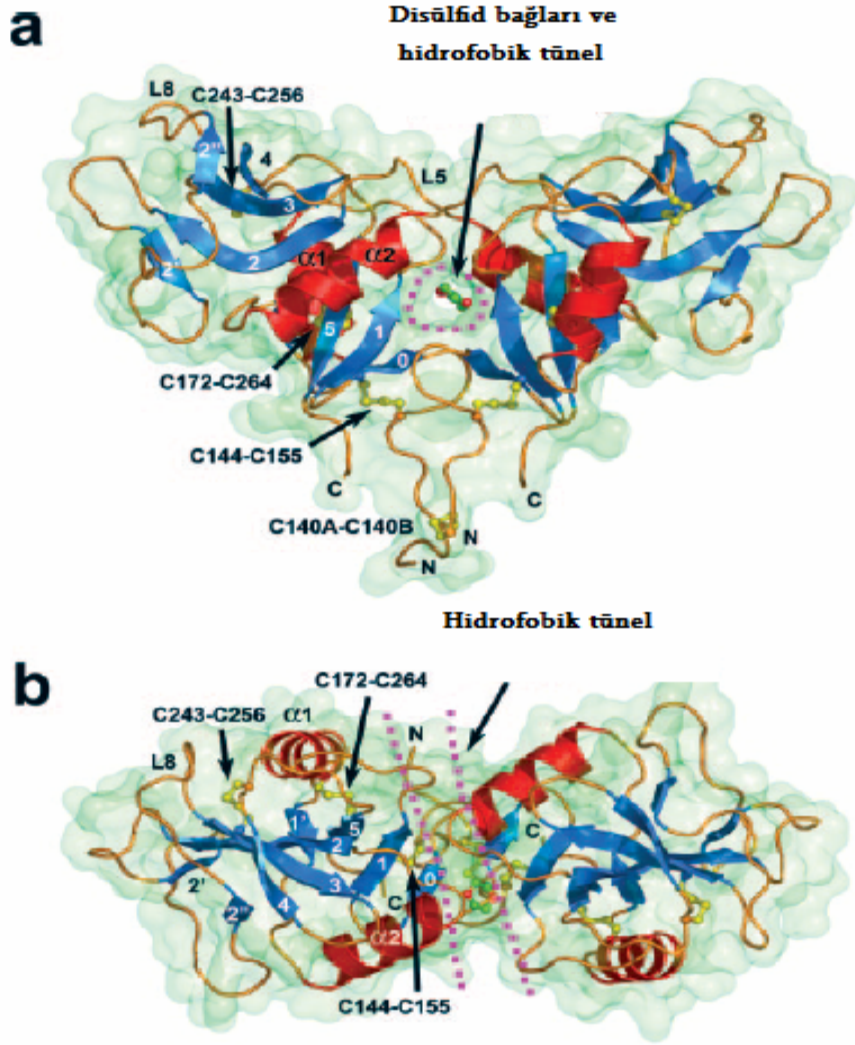
LOX-1 elli iki kDA ağırlığında, 273 amino asitten oluşan, yapısal olarak C tipi lektin ailesine ait bir tip II membran proteini olup Ox-LDL'nin endositozunda rol oynamaktadır. LOX-1 ekspresyonu ilk olarak 1997'de Sawamura ve ark. tarafından bovin aortik endotel hücrelerinde gösterilmiş olup, Ox-LDL'nin endotel hücrelerine bağlanması, internalizasyonu ve degradasyonundan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar endotel hücrelerinin aterosklerozun erken evrelerinde okside olmuş düşük molekül ağırlıklı lipoprotein (Ox-LDL) tarafından etkilendiğini ve Ox-LDL'nin endotel hücrelerinde reseptör aracılı yollarla aktivasyon ve ilerleyen süreçte endotel hücrelerinde disfonksiyon meydana getirdiğini göstermiştir. Ox-LDL'nin bu etkilerinden sorumlu ana reseptör tipi ise endotelial LOX-1'dir ve C-tipi lektin benzeri ligand bağlayıcı bölge içermesi ile diğer reseptörlerden ayrılır (6). Bunu takip eden çalışmalarda da Mehta ve ark. tarafından insan koroner arter hücre kültürlerinde LOX-1 ekspresyonu gösterilmiştir (7). LOX-1; Ox-LDL'nin NO salınımında azalma (8), MCP-1 sekresyonu (9), reaktif oksijen ürünlerinin oluşması (10) ve apoptozis (11) gibi proaterojenik etkilerinde önemli role sahiptir. In vivo olarak aort, karotid, torasik ve koroner arterlerde LOX-1 ekspresyonu gösterilmiştir (125). Endotel hücreleri dışında damar duvarı düz kas hücrelerinde, fibroblastlarda (126), makrofajlarda (127) ve trombositlerde de (128) ekspresyonu mevcuttur.

LOX-1 moleküler yapısı

LOX-1 geni insan genomunda NK gen kompleksinin içerisinde 12. kromozomun kısa kolunun p12.3 – p13.2 bölgesinde yer almaktadır (129, 130) . İnsan LOX-1 geni 7000 baz çiftinden daha fazla yer kaplar, 6 ekson ve 5 introndan oluşur (130). Temel olarak dört bölgeden oluşur; N terminal sitoplazmik bölge, transmembran bölge, boyun bölgesi ve C terminalinde lektin benzeri bölge (Şekil 6). C terminalindeki lektin benzeri bölge (karbonhidrat tanıma bölgesi) ligand bağlayıcı olarak görev yapmaktadır ve internalizasyon ve fagositoz aşamalarını başlatır. Bu bölgede bulunan pozitif yüklü amino asitler negatif yüklü Ox-LDL'nin tanınmasını sağlar (131). LOX-1 yapısında bulunan bağlayıcı bölgeler ve dimer yüzeyi ile Ox-LDL büyüklüğü karşılaştırıldığında bir Ox-LDL için 3 LOX-1 molekülü gerekmektedir (132). Boyun bölgesi lektin benzeri bölge ile transmembran bölge arasında homodimer yapının oluşmasında rol oynar (132). Lektin benzeri bölgenin hücre dışı kısmının 1.4 angstrom kristal yapısı incelendiğinde LOX-1'in kalp şeklinde homodimer yapıda olduğu ve molekül içerisinde boylu boyunca uzanan bir hidrofobik tünel varlığı görülür (Şekil 7). Bu yapısında kolesterol ve yağ asidi zincirlerinin tanınmasında rol oynadığı düşünülmektedir (133). N terminalinde bulunan sitoplazmik bölgenin fonksiyonu bugün için tam olarak bilinmemektedir.



Şekil 6. LOX-1 dört ana bölgeden oluşmaktadır (Mehta ve ark. Cardiovascular Research 69 (2006) 36 – 45)

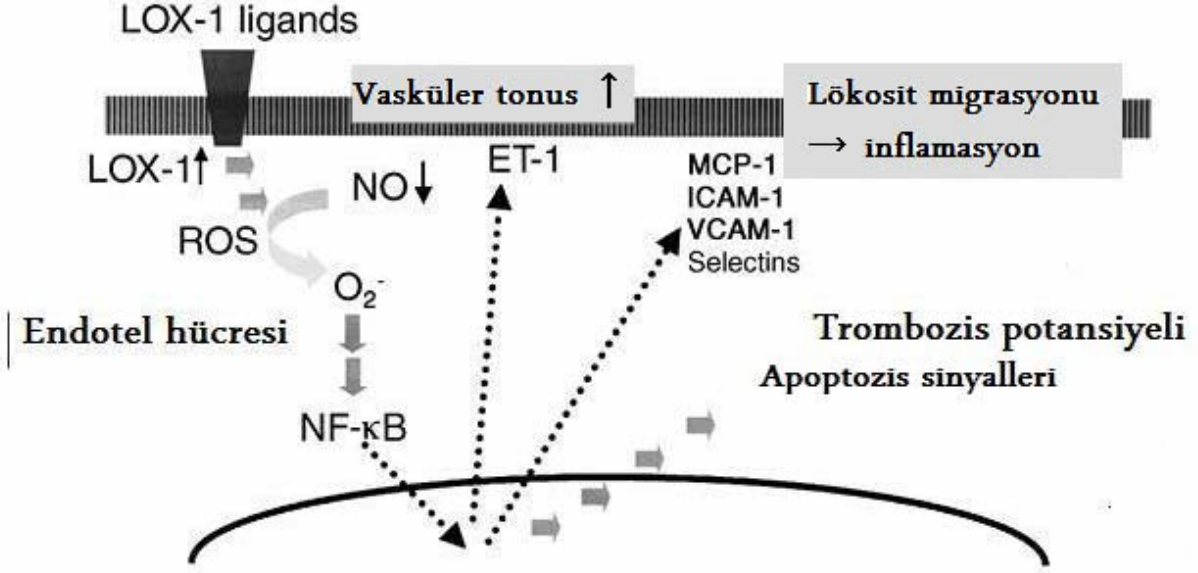


Şekil 7. İnsanlarda LOX-1'in homodimer yapısı ve hidrofobik tünel yerleşimi (a) yandan görünüm (b) üstten görünüm (Park ve ark. The Journal of Biological Chemistry Vol. 280, No. 14, Issue of April 8, pp. 13593–13599, 2005)

LOX-1 ve endotelial disfonksiyon

Ox-LDL'nin endotel hücreleri ile etkileşimi endotelial disfonksiyon olarak tanımlanan bazı patolojik değişiklikleri indüklemektedir. Endotel hücrelerinde Ox-LDL'nin LOX-1'e bağlanması ile süperoksit anyonlar açığa çıkar, NO miktarı azalır ve eş zamanlı olarak NF-kB aktive olur (8,10) (Şekil 8). Buna ek olarak bu bağlanma ile birlikte endotel hücrelerinde apoptozis indüklenebilmektedir (11). LOX-1'e yönelik antisense oligonükleotid uygulaması ile Ox-

LDL'ye bağı MCP-1 ekspresyonu artışında ve endotel hücrelerine monosit adezyonunda gözlenen inhibisyon LOX-1'in endotel disfonksiyonundaki rolünü desteklemektedir (9).



Şekil 8. LOX-1 aracılı endotelial disfonksiyon. Ox-LDL'nin LOX-1'e bağlanması ile oksidatif stres oluşur, NO miktarı azalır, süperoksit oluşumu artar ve NF-κB aktive olur, kemokin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunda değişiklikler meydana gelir. (M. Chen ve ark. / Pharmacology & Therapeutics 95 (2002) 89–100)

LOX-1 gen ekspresyonunda artışa yol açan çeşitli in vivo ve in vitro durumlar vardır. In vitro koşullarda endotel hücrelerinde bazal LOX-1 gen ekspresyonu çok düşük miktarlardadır, fakat Ox-LDL, Ang II, TNF- α ve mekanik stres gibi çeşitli proinflamatuvar, prooksidan ve mekanik uyarılarla ekspresyonu hızla indüklenebilir (11, 134, 135, 136). In vivo koşullarda da LOX-1 geninin ekspresyonu düşük seviyelerdedir fakat hipertansiyon, diabetes mellitus ve hiperlipidemi gibi bazı patolojik durumlarda ekspresyonu artar (137, 138, 139) (Tablo 6). Bu patolojik durumların çoğunun direkt veya indirekt olarak aterogenezle ilişkili olduğu göz önüne alınırsa bu faktörlerin varlığının LOX-1 gen ekspresyonu üzerine sinerjistik etkileri olduğu düşünülebilir.

Tablo 6. LOX-1 gen ekspresyonunda artışa yol açan in vitro ve in vivo durumlar

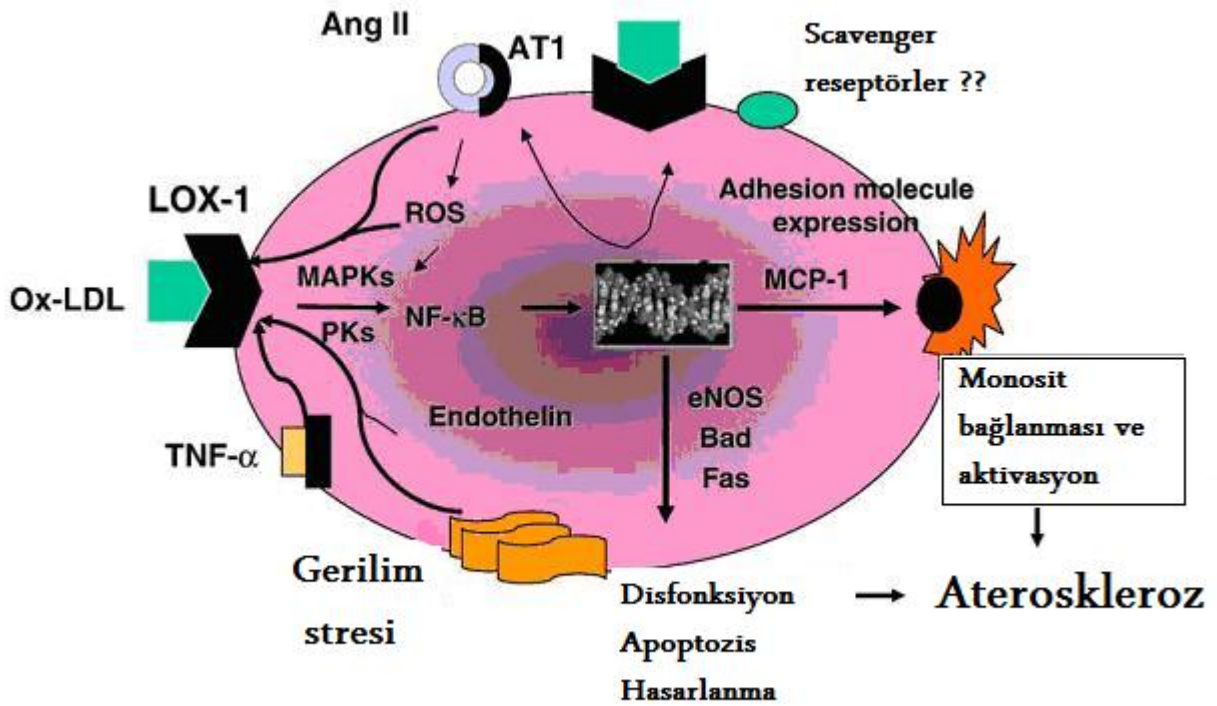
LOX-1 ekspresyonunda artışa yol açan in vitro uyarılar

Anjiotensin II (Ang II)
C-reaktif protein (CRP)
Endotelin-1 (ET-1)
Glukoz
Histamin
Homosistein
Human sitomegalovirus (HCMV)
İnterferon- γ (IFN- γ)
İnterlökin-1 β (IL-1 β)
Oksidan ürünler
Okside düşük dansiteli lipoprotein (Ox-LDL)
Forbol ester
Akım stresi
Transforming growth faktör- β (TGF- β)
Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α)

LOX-1 ekspresyonunda artışa yol açan in vivo durumlar

Ateroskleroz
Diabetes mellitus
Hiperlipidemi
Hipertansiyon
İskemi reperfüzyon hasarı
Transplantasyon

Vasküler endotelial hücrelerde LOX-1 aktivasyonunun birçok hücre içi sinyal yolağını uyardığı gösterilmiştir. Bu yollar arasında p38 (MAPK), p44/42 MAPK, protein kinaz C (PKC), protein kinaz B (PKB), protein tirozin kinaz (PTK) ve transkripsiyon faktörü NF- κ B bulunur. LOX-1 antikor ile bloke edildiğinde bu yolların aktivasyonunda azalma olduğu görülür (140-146) (Şekil 9).



Şekil 9. Ox-LDL LOX-1 aracılığı ile Ang II tip I reseptör ekspresyonunu artırırken Ang II’de LOX-1 reseptör ekspresyonunu artırır. Gerilim stresi, endotelin ve TNF- α ’da LOX-1 reseptör ekspresyonunu arttırmaktadır. Hem AT1 hem de LOX-1 reseptörlerinin aktivasyonu redoks sinyallerle apoptozisle sonuçlanan hücre disfonksiyonu ve hücre hasarına, monosit adezyonu ve aktivasyonuna ve sonuç olarak ateroskleroza yol açar. (Mehta ve ark. Cardiovascular Research 69 (2006) 36 – 45)

Resveratrol

Bundan 4500 yıl önce Hintliler “Ayurveda” isimli eski bir tıp kitabında kırmızı üzüm suyunu “darakchasava” olarak tanımlayıp kardiyotonik olarak kullanmışlardır (147). 1940 yılında resveratrol greyfurdun ilaç bileşiği olarak tanımlanmış ve Polygonum cuspidatum (Japonya’da Ko-jo-kon olarak bilinen) köklerinden ekstrakte edilmiş ve hiperlipidemik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (148). Resveratrolün en zengin kaynağı Japonya ve Çin’de yetiştirilen Polygonum cuspidatum (Ko-jo-kon) bitkisinin kökleridir (149).

1970’li yıllarda ise gözlemsel çalışmalar sonucunda orta düzeyde alkol tüketen kadın ve erkeklerin KVH’lara bağlı ölüm risklerinin içmeyenlerden daha az olduğu ileri sürülmüştür (150). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar ise Güney Fransa bölgesinde yağlı diyet ve sigara

tüketiminin yüksek olmasına karşın şarap tüketiminin fazla olması nedeni ile kardiyak hastalıkların az görülmesine dikkat çekerek bu tabloyu “Fransız Paradoksu” olarak isimlendirmişlerdir (151, 152, 153). Bu konu ile ilgili yapılmış olan çalışmalar bu paradoksun etkeni olarak resveratrolu göstermektedir (153,154, 155).

Üzüm kabuklarında yaklaşık olarak 50–100 µg/g resveratrol bulunmaktadır. Üzümün etli kısmından çok kabuk kısmında bulunur ve kırmızı üzüm ile karşılaştırıldığında diğer üzümlerde çok az miktarda bulunur. Kırmızı şarabın kalp üzerine olan koruyucu etkisinde ise içerdiği 0.2–7 mg/L resveratrolun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Üzümlerin dışında resveratrol dut, yaban mersini, keklik üzümü, böğürtlen, çay üzümü, yer fıstığı gibi birçok besin maddesinde de bulunmaktadır. Amerika’da 15 mg, 50 mg, 200 mg’lık kapsülleri ve 10 mg’lık tabletleri mevcuttur.

Resveratrolun birçok hücrede tümör nekroz faktör tarafından oluşturulan reaktif oksijenleri ve lipit peroksidasyonunun inhibe ettiği gözlenmiştir (156). Resveratrol hücre içi antioksidan miktarını arttırabilir. Benzer olarak, insan lenfositlerinde resveratrol glutatyon peroksidaz, glutatyon-S transferaz ve glutatyon redüktaz gibi birçok antioksidan enzimde de artışa neden olmaktadır (157).

Resveratrol trombin ve ADP ile aktive edilmiş olan trombosit adezyonunu anlamlı olarak inhibe etmektedir. Etki mekanizması olarak ise agregasyon aşamasında artmış olan hücre içi kalsiyum miktarını azaltması gösterilmiştir. Buna benzer bir çalışmada ise kollajen, trombin ve ADP ile uyarılmış olan insan trombosit agregasyonunun resveratrol ile inhibe edildiği ve oluşan Tromboksan A₂ miktarının anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (158).

Yapılan birçok çalışma resveratrolun insan üzerine faydalı etkilerini göstermiştir (159). Resveratrol plazma lipoproteinlerini etkilemektedir in vitro olarak LDL oksidasyonunu önlediği (160, 161, 162), trombosit agregasyonunu (163) ve polimorfonükleer hücre aktivasyonunu ve ROS üretimini engellediği gösterilmiştir. İnsan endotel hücrelerinde vazorelaksasyonu arttırarak, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak trombojenik potansiyeli azalttıkları gözlenmiştir (164, 165, 166).

Resveratrolün endotel üzerine etkileri

Üzüm, üzüm kabuğu, şarap ekstrelerindeki NO'ya bağlı kardiyoprotektif etki ilk olarak fenilefrin ile kasılmış izole aortalarda gevşeme oluşturmaları fakat endoteli alınmış olan aortalarda herhangi bir etki göstermemeleri ile fark edilmiştir (167). Bu etkilerinin NO'in kompetitif inhibitörleri olan NG-monomethyl-L-arginine veya NG -nitro-L-arginine ile inhibe edilebilmeleri, etkilerini NO ve cGMP yolağı ile gösterdiklerini doğrulamaktadır. Pulmoner arter endotel hücre kültürlerinde resveratrol tedavisi sonrası eNOS ekspresyonunu arttırarak direkt olarak NO üzerine etki oluşturdıkları gösterilmiştir (168). Başka bir çalışmada sıçan aorta halkalarında resveratrolun fenilefrin ve KCl ile olan kasılmalara olan yanıtına bakılmış; endotel sağlam halkalarda gevşeme yanıtı alınırken endoteli çıkarılmış olan halkalarda bu yanıtın olmadığı gözlenmiştir. Endotelyumu sağlam olan halkalarda resveratrolun oluşturduğu bu etki NOS inhibitörü olan L-NOARG ile geri çevrilmiştir (169). Ateroskleroz patogenezinde vasküler düz kas proliferasyonu da önemli bir rol oynamaktadır. Yapılmış olan çalışmalarda sıçan torasik aort düz kas hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği görülmüştür. Bu etkiyi Cyclidin A geni mRNA miktarını azaltarak gösterdiği bildirilmiştir (170).

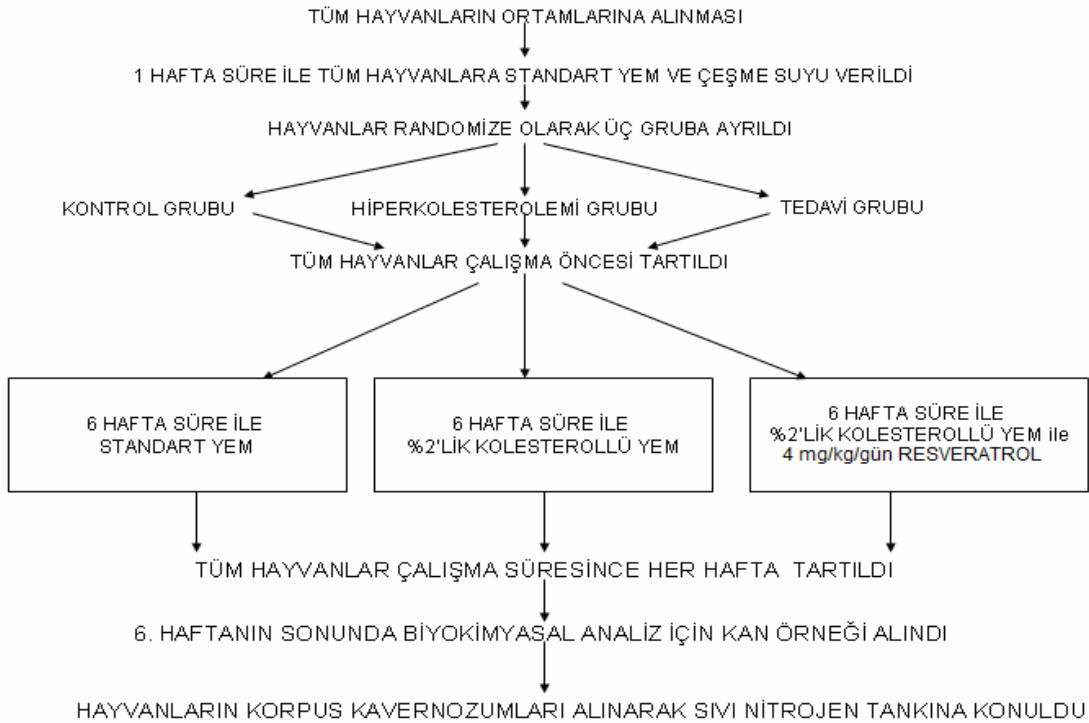
GEREÇ VE YÖNTEMLER

Etik Kurul Onayı, Tavşanların Beslenmesi, Gruplandırılması:

Randomize kontrollü deneysel bir araştırma olan tez çalışmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığınca değerlendirildi ve 5.11.2007 tarihli 104 sayılı karar ile çalışmaya onay verildi. Deneyler Androloji laboratuvarında gerçekleştirildi.

Deneysel hiperkolesterolemi modeli için 2600 – 3200g ($2896 \pm 32,9g$) ağırlığında Beyaz Yeni Zelanda tavşanları Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalından temin edildi. Tavşanlar uygulanacak protokole göre 3 gruba ayrıldı.

1. Kontrol grubu: Tavşanlar sınırsız standart yem ve içme suyu ile beslendi (n=7).
2. Hiperkolesterolemi grubu: %2'lik kolesterol içeren sınırsız yem ve içme suyu ile altı hafta süre ile beslendi (n=7).
3. Tedavi (Resveratrol) grubu: %2'lik kolesterol içeren sınırsız yem ile beslenirken aynı zamanda içme suları içinde oral resveratrol ile 4 mg/kg/gün dozda altı hafta süreyle verildi (n=7).



Şekil 10. Çalışmaya alınana kadar deney hayvanlarına uygulanan protokol

Çalışmaya alınan tüm tavşanlar standardizasyon amacı ile 60x60x30 cm boyutlarındaki özel tavşan kafeslerine alındıktan sonra bir hafta süre ile standart yem (TARİŞ YEMTA) ve içme suyu ile beslenerek ortama uyumları sağlandı. Tavşanların beslenme süresi 6 hafta olarak belirlendi. Tüm deney süresi boyunca oda ısıları 24°C'de sabit tutuldu (Resim 1). Kolesterol yemleri ve resveratrol içeren içme suları günlük olarak hazırlandı.

%2'lik 1kg Kolesterol yemi= 900g yem + 80g zeytinyağı + 20g kolesterol içeriğinden oluşmaktadır. Resveratrol içeren içme suları ise; özel olarak ışıktan muhafaza edecek şekilde hazırlanmış olan tavşan suluklarında günlük olarak verilir, resveratrol içeren sıvıyı tamamen bitirdikleri gözlemlendi. Ertesi gün çalışmaya alınacak olan hayvanların 12 saat öncesinden yemleri alınarak, sıvı alımlarına ise izin verildi.



Resim 1. Çalışmaya alınan tavşanların barınma koşulları

Plazma kolesterol düzeylerinin ölçümü:

Deney sürelerinin sonunda tavşanların plazma total kolesterol düzeyleri kalp sağ atriumdan alınan 10 cc'lik kan örneklerinden ölçüldü. Plazmadan total kolesterol, LDL kolesterol ve HDL kolesterol düzeyleri bakıldı. Total kolesterol, LDL ve HDL düzeyleri homojen enzimatik kalorimetrik yöntemeye dayalı kitler ile Roche COBAS Integra 800 cihazı kullanılarak ölçüldü.

Tavşanların korus kavernozum ve aort dokusunun alınması:

Tavşanlar, kulak venlerinden enjekte edilen yüksek doz tiopental ile sakrifiye edildi (Resim 2). KK dokusu ve torakal aortaları alındı (Resim 3). PBS (Phosphate buffer saline) içerisinde tunika albuginea KK dokusundan ayrıldı. Aort PBS içerisinde koyularak periaortik dokular uzaklaştırıldı. Daha sonra dokular çalışmanın yapılacağı zamana kadar sıvı nitrojende saklandı.



Resim 2. Sakrifikasyon işlemi



Resim 3. Korpus kavernozum diseksiyonu

Dokulardan RNA İzolasyonu:

Dokular nitrojen takından çıkartılarak 100 mg'lık doku örnekleri alındı. Dokular buz üzerinde yapılan keskin diseksiyonla ufalandıktan sonra tüplere alındı ve her bir tüpe 100 mg'a 1 ml olacak şekilde trizol reaktifi (RNA-tidy-G AppliChem) eklenerek süspansiyon haline getirildi. Oda sıcaklığında 20 dakika beklendikten sonra süspansiyon otomatik homojenizatörle (Heidolph Silent Crusher S) homojenize edildi ve süspansiyon 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınarak Sigma

3K30 santrifüj cihazında, +4⁰C’de 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpte oluşan şeffaf sıvı kısım başka bir eppendorf tüpe pipet yardımıyla alındı ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine kullanılan trizolün 1/5’i kadar (0,2 ml) %99’luk kloroform (AppliChem) eklendi. Tüpler 15 saniye ters düz kibarca çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Daha sonra 4⁰C’de 12000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınıp üzerine RNA’nın çökmesi için 0,5 ml izopropanol (AppliChem) eklenerek vorteks ile karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Devamında 4⁰C’de 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpteki izopropanol uzaklaştırıldı ve dipteki RNA pellet 1 ml %75 etanol (Merck) ile yıkanıp +4⁰C’de 7500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Santrifüjden sonra etanol pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve tüpteki RNA 3 saat kurumaya bırakıldı. Kuruyan RNA pellet üzerine 50 µl RNase-free water (QIAGEN) eklenerek çözüldü. RNA konsantrasyonu Lambda 25 UV/VIS Spektrofotometresi (OPTIMA SP-3000 PLUS) kullanılarak ölçüldü. 260 nm’deki absorbans değeri kullanılarak RNA konsantrasyonu, A₂₆₀/A₂₈₀ değerleri kullanılarak ise RNA kalitesi değerlendirildi. RNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -80⁰C’lik buzdolabında saklandı. Tablo 7’de 100 mg dokudan elde edilen RNA’ların konsantrasyonları sunulmuştur.

| Doku adı | RNA konsantrasyonu (µg/µl) | Doku adı | RNA Konsantrasyonu (µg/µl) | Doku adı | RNA konsantrasyonu (µg/µl) |
|--------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|---------------|----------------------------|
| Kontrol aort | 0,130 | | | | |
| Kontrol 1 | 0,160 | Hiperkolesterolemi 1 | 0,180 | Resveratrol 1 | 0,200 |
| Kontrol 2 | 0,166 | Hiperkolesterolemi 2 | 0,091 | Resveratrol 2 | 0,207 |
| Kontrol 3 | 0,612 | Hiperkolesterolemi 3 | 0,218 | Resveratrol 3 | 0,281 |
| Kontrol 4 | 0,441 | Hiperkolesterolemi 4 | 0,415 | Resveratrol 4 | 0,184 |
| Kontrol 5 | 0,131 | Hiperkolesterolemi 5 | 0,156 | Resveratrol 5 | 0,167 |
| Kontrol 6 | 0,228 | Hiperkolesterolemi 6 | 0,159 | Resveratrol 6 | 0,226 |
| Kontrol 7 | 0,193 | Hiperkolesterolemi 7 | 0,161 | Resveratrol 7 | 0,151 |

Tablo 7. 100 mg doku örneğinden elde edilen RNA konsantrasyonları

cDNA sentezi:

cDNA sentezi her örnek için 1 mcg RNA ile Roche Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca özetleyecek olursak ilk aşamada 1 mcg RNA, 2 mcl Random Hexamer ve karışımın toplam hacmi 13 mcl olacak şekilde ilk karışım hazırlandıktan sonra termal siklus cihazında (Tchne TC-412) 10 dakika 65⁰ C sıcaklıkta enkübe edildi ve sonrasında bu karışım buz üzerine alındı. Enkübasyon sırasında hazırlanmış olan ikinci karışım 4 mcl Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0.5 mcl RNase inhibitörü, 2 mcl deoksiniükleotid karışımı ve 0.5 mcl Transcriptor Reverse Transcriptase bileşenlerinden oluşmaktadır. Enkübasyon sonrasında birinci ve ikinci karışımlar pipetlenerek karıştırılır ve reaksiyon için tekrar termal siklus cihazında (10 dk 25⁰C, 60 dk 50⁰C ve 5 dk 85⁰C) enkübe edilir ve elde edilen cDNA -20⁰C’de saklanır.

RT-PCR

Her grup için cDNA sentezleri tamamlandıktan sonra her örnek için 2 mcl cDNA ile Roche Light Cycler 1.5 cihazı ile FastStart DNA Master HybProbe yöntemi ile her örnekte eNOS, LOX-1 ve GAPDH spesifik mRNA primer dizaynları ve spesifik problemleri kullanılarak denatürasyon, soğuma, uzama ve erime fazları için uygun sıcaklık ayarları yapıldıktan sonra amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Light Cycler 2.0 software ile kontrol grubu ile dilüsyon yöntemi kullanılarak standart eğriler oluşturuldu ve bu eğrilere göre kontrol, hiperkolesterolemi ve resveratrol grupları için GAPDH, eNOS ve LOX-1 mRNA ekspresyon düzeyleri hesaplandı. Hedef genler olan eNOS ve LOX-1 mRNA ekspresyonlarının kontrol geni GAPDH mRNA ekspresyonuna oranı her üç grupta değerlendirildi ve ortalama ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıklar karşılaştırıldı.

Örneklerin Agaroz jelde (%1,5’lik) yürütülmesi :

2,25 gr agaroz 150 ml 1X TAE Buffer içine konup mikrodalga fırında 3-5 dakika ısıtılarak eritildi. DNA’ya bağlanıp görüntülenmesini sağlamak amacıyla erimiş agaroz içine 7 µl 10 mg/ml etidyum bromür eklendi. Karışım yatay elektroforez sistemi içine dökülüp jelin polimerize olması için 30 dk beklendi. Jel katılaştıktan sonra üzerine 1X TAE Buffer jelin üzerini kaplayacak şekilde döküldü. %1,5’luk agaroz jele, 10 µl PCR ürünü ile 2 µl loading boyasından oluşan karışım yüklendi. Thermo EC1000-90 elektroforez cihazında 200 V, 60 mA’ de 2 saat yürütüldü ve Stratagene Eagle Eye® görüntüleme sistemi kullanılarak jel görüntüleri elde edildi.

İstatistiksel yöntem

Çalışmadaki tüm veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz SPSS 11.0 programı kullanılarak bütün grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile, iki grubun karşılaştırması Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. P değerinin 0,05'in altında olması ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Plazma kolesterol düzeyleri :

6 hafta sonunda çalışılan kan örneklerinde kontrol grubu, hiperkolesterolemi grubu ve resveratrol grubunda ortalama plazma total kolesterol, HDL kolesterol ve LDL kolesterol seviyeleri Tablo 8’de verilmiştir. Hiperkolesterolemi ve resveratrol grubunda total kolesterol, LDL kolesterol ve HDL kolesterol seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış görüldü ($p<0.001$). Hiperkolesterolemi ve resveratrol grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında total ve LDL kolesterol düzeylerinde resveratrol grubunda anlamlı derecede iyileşme olduğu görüldü ($p<0.01$). Bu iki grup arasında HDL kolesterol seviyeleri arasında fark yoktu ($p>0.05$).

| Gruplar | Total kolesterol (mg/dl) | LDL (mg/dl) | HDL (mg/dl) |
|--------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|
| Kontrol (n:7) | 35 ± 5,7 | 6,4 ± 1,3 | 6,4 ± 0,9 |
| Hiperkolesterolemi (n:7) | 2508 ± 252 | 859,1 ± 73,0 | 27,1 ± 1,7 |
| Resveratrol (n:7) | 1357,8 ± 342,4* | 495,6 ± 107,0* | 23,7 ± 3,8 |

* $p<0.01$

Tablo 8. 6 hafta sonunda plazma kolesterol seviyeleri. Resveratrol uygulaması ile plazma total kolesterol ve LDL kolesterol seviyesi anlamlı olarak azalırken ($p<0.01$), HDL kolesterol seviyeleri arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

Hayvan ağırlıklarının karşılaştırılması:

Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları her hafta düzenli olarak ölçüldü. Hayvanların deney süresince izlenen vücut ağırlıkları her 3 grupta da; çalışma başlangıcı ve altı hafta sonunda değerlendirilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 9). Grupların hiçbirinde başlangıç kilolarına göre belirgin artış veya düşme gözlenmedi.

| | Vücut Ağırlığı(g) | |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|
| | Başlangıç | 6. hafta sonunda |
| Kontrol (n=7) | 2752,8 ± 59,0 g | 2862,8 ± 78,5 g |
| Hiperkolesterolemi (n=7) | 2708,6± 65,3 g | 2878,6 ± 86,2 g |
| Resveratrol (n=7) | 2861,4 ± 57,3g | 2993,6 ± 75,4 g |

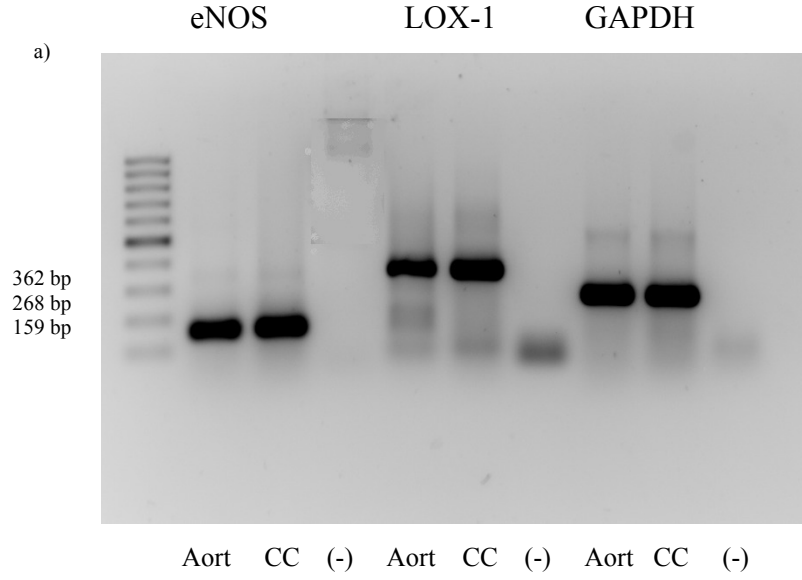
Tablo 9. Deney hayvanlarının deney başlangıcı ve sonundaki ağırlıkları

RT-PCR

Daha önce korpus kavernozumda ekspresyonu gösterilmemiş olan LOX-1 reseptörünün gösterilmesi amacıyla daha önce bu reseptörün ekspresyonunun gösterildiği aort dokusu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kendilerine özgü spesifik primer ve prob dizaynları (TIB MOLBIOL, Tablo 10) kullanılarak RT-PCR cihazı ile korpus kavernozumda ekspresyonu gösterilen GAPDH, LOX-1 reseptörü ve eNOS daha sonra agaroz jelde görüntülendi (Şekil 11).

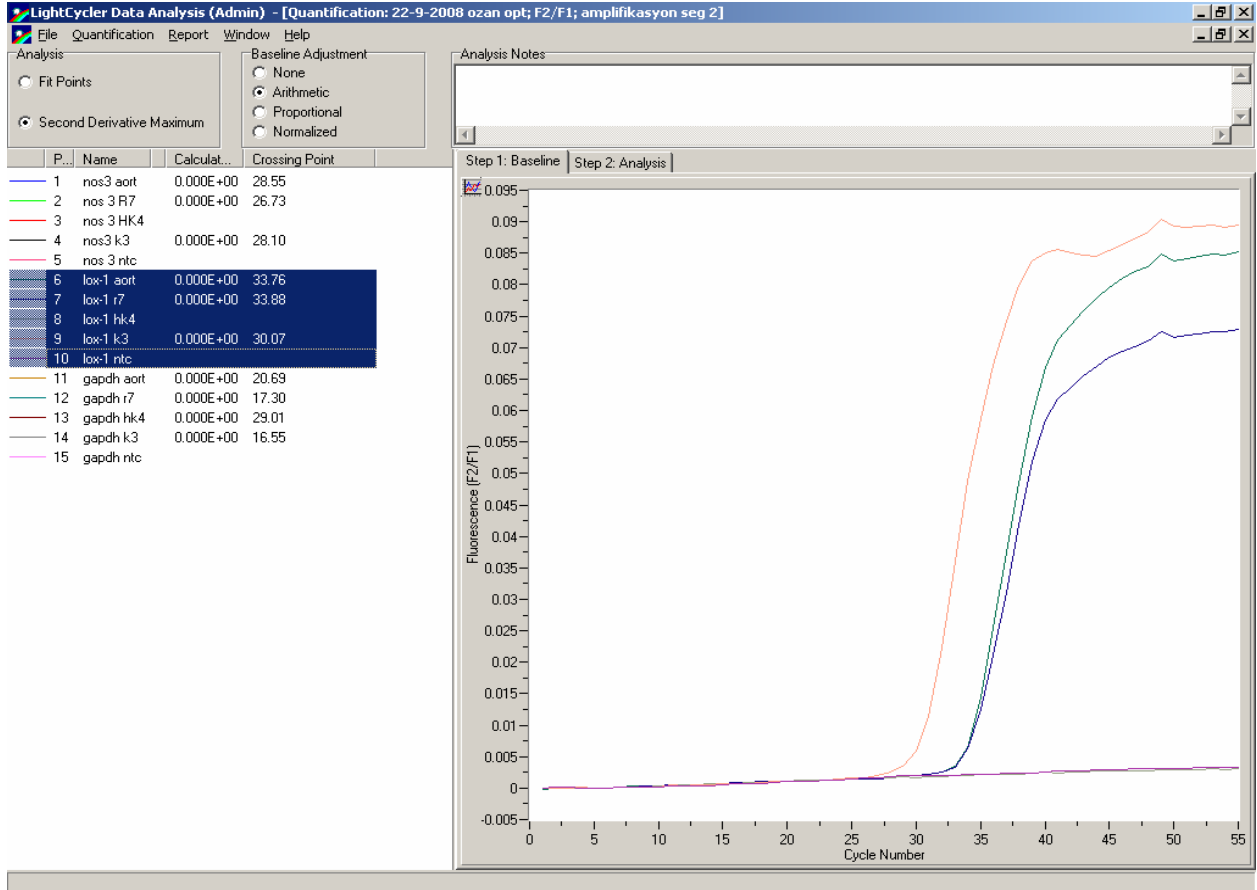
| Gen adı | İleri primer | Geri primer |
|--------------|---------------------------------|----------------------------|
| GAPDH | 5'- TgTgAAgCTCATTTCCTggTATg | 5'- gTTTCATgACAAggTAaggCTC |
| LOX-1 | 5'- gAATATACTggAgggACAaggTCTTAg | 5'- CTggAATgggAAgTCgCT |
| eNOS | 5'- CTggAggATgTggCCgT | 5'- CTCTggCCTTCTgCTCATTCT |

Tablo 10. Tavşan GAPDH, LOX-1 ve eNOS primer mRNA dizaynları



Şekil 11. a) Aort ve korpus kavernozum dokularında eNOS, LOX-1 ve GAPDH ekspresyonlarının agaroz jelde görüntüleri b) LOX-1 reseptörünün korpus kavernozumda ekspresyonunun Lightcycler Software görüntüsü

b)



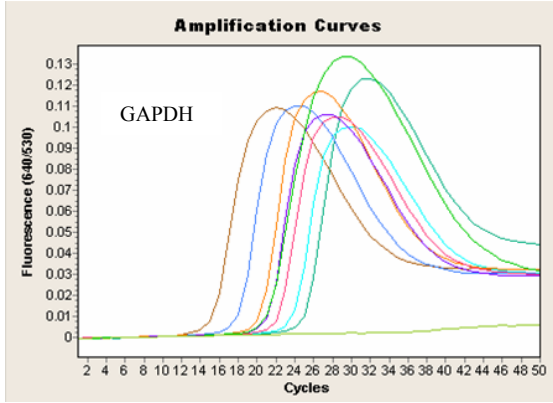
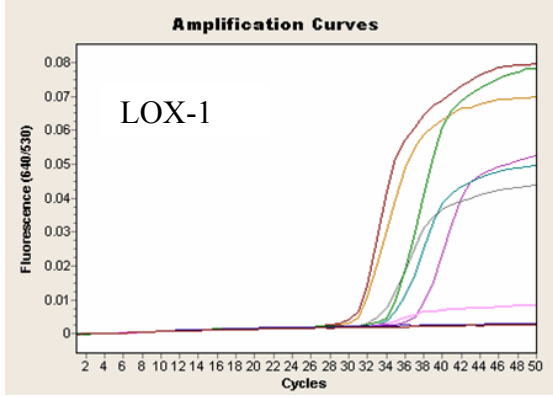
LOX-1 ekspresyonu :

Kontrol, hiperkolesterolemi ve resveratrol gruplarında LOX-1 mRNA ekspresyonları real time RT-PCR ile değerlendirildi. LOX-1 ve GAPDH mutlak mRNA ekspresyon düzeyleri Tablo 11’de sunulmaktadır. Hedef molekül LOX-1’in kontrol GAPDH’a relatif oranı ile hesaplanan ortalama mRNA ekspresyon düzeyleri açısından kontrol ($0,670 \pm 0,315$), hiperkolesterolemi ($0,392 \pm 0,216$) ve resveratrol ($0,274 \pm 0,130$) grupları arasında nonparametrik ANOVA analizinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.488$) (Şekil 12).

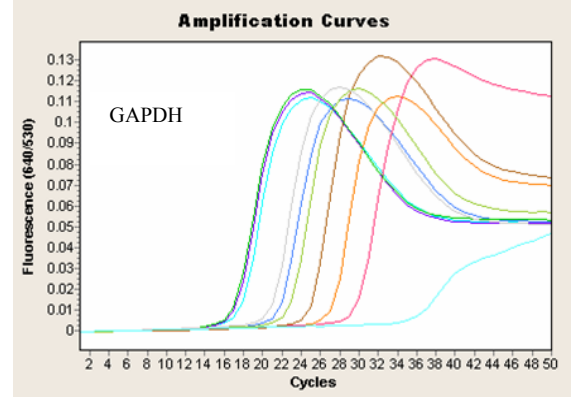
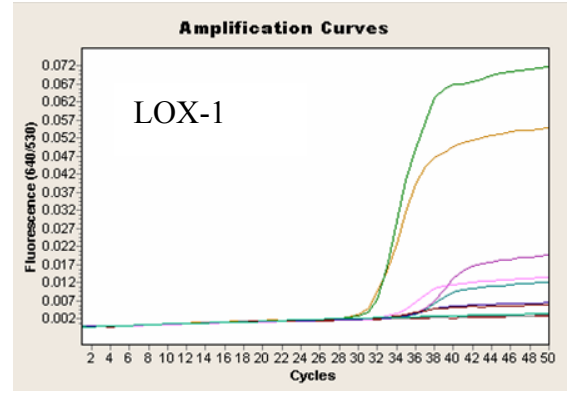
| | LOX-1 | GAPDH |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|
| Kontrol 1 | $6,71 \times 10^4$ | $1,49 \times 10^7$ |
| Kontrol 2 | $2,01 \times 10^4$ | $2,65 \times 10^4$ |
| Kontrol 3 | $8,99 \times 10^5$ | $2,11 \times 10^6$ |
| Kontrol 4 | $1,53 \times 10^5$ | $3,24 \times 10^5$ |
| Kontrol 5 | $2,03 \times 10^5$ | $8,05 \times 10^4$ |
| Kontrol 6 | $6,69 \times 10^4$ | $1,94 \times 10^5$ |
| Kontrol 7 | $7,78 \times 10^4$ | $1,88 \times 10^5$ |
| Hiperkolesterolemi 1 | $2,67 \times 10^5$ | $2,17 \times 10^6$ |
| Hiperkolesterolemi 2 | $1,69 \times 10^4$ | $9,69 \times 10^4$ |
| Hiperkolesterolemi 3 | $3,62 \times 10^3$ | $3,88 \times 10^3$ |
| Hiperkolesterolemi 4 | * | * |
| Hiperkolesterolemi 5 | $6,68 \times 10^4$ | $3,11 \times 10^6$ |
| Hiperkolesterolemi 6 | $6,67 \times 10^4$ | $4,58 \times 10^4$ |
| Hiperkolesterolemi 7 | $2,18 \times 10^5$ | $3,79 \times 10^6$ |
| Resveratrol 1 | $3,21 \times 10^4$ | $2,84 \times 10^5$ |
| Resveratrol 2 | $5,54 \times 10^4$ | $1,28 \times 10^5$ |
| Resveratrol 3 | $2,22 \times 10^4$ | $2,54 \times 10^5$ |
| Resveratrol 4 | $7,46 \times 10^4$ | $3,19 \times 10^5$ |
| Resveratrol 5 | * | * |
| Resveratrol 6 | $2,12 \times 10^4$ | $6,55 \times 10^5$ |
| Resveratrol 7 | $2,36 \times 10^6$ | $2,29 \times 10^6$ |

Tablo 11. Her üç grupta LOX-1 ve GAPDH mutlak mRNA ekspresyon düzeyleri * Ölçülemeyecek düzeyde

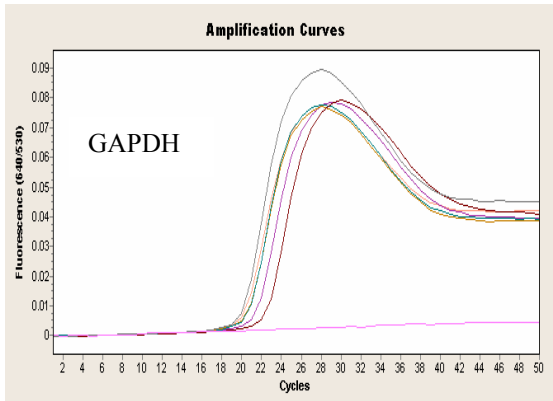
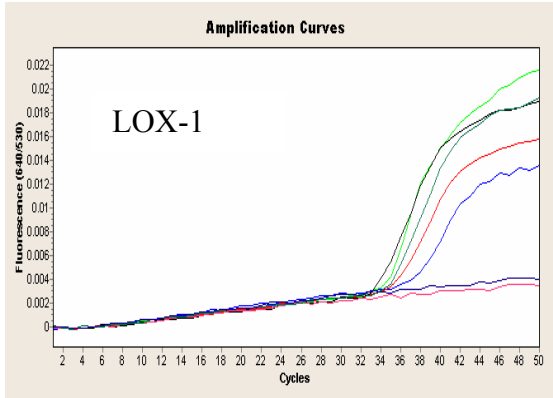
a)



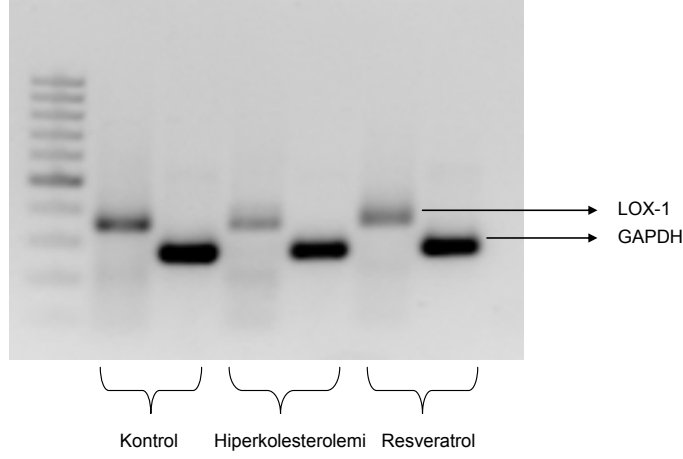
b)



c)



Şekil 12. a) Kontrol grubunda üstteki grafikte LOX-1 reseptörü için, alttaki grafikte GAPDH için amplifikasyon eğrileri görülmektedir. b) Hiperkolesterolemi grubunda üst grafikte LOX-1, alt grafikte GAPDH için amplifikasyon eğrileri. c) Resveratrol grubunda LOX-1 ve GAPDH için amplifikasyon eğrileri



Şekil 13. Her üç grupta korpis kavernozumda LOX-1 mRNA ekspresyonları görülmektedir. Hiperkolesterolemi ve resveratrol gruplarında kontrol grubuna göre sinyal yoğunluğunda azalma gözlenmekle birlikte kantitatif analizde bu azalma anlamlı değildir ($p = 0.488$).

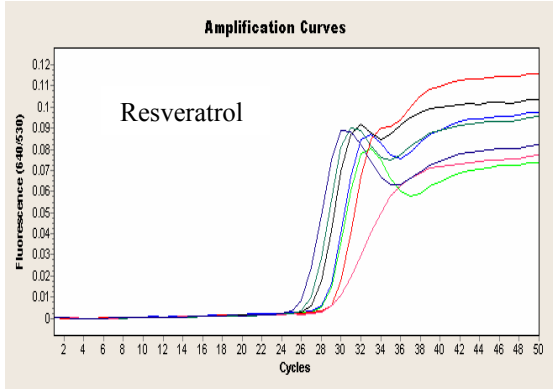
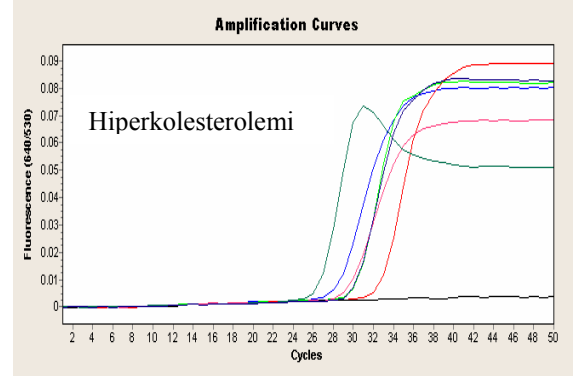
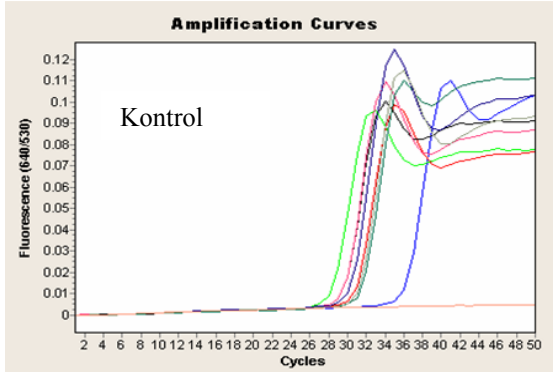
eNOS ekspresyonu :

Kontrol, hiperkolesterolemi ve resveratrol gruplarında eNOS mRNA ekspresyonları real time RT-PCR ile değerlendirildi. eNOS ve GAPDH mutlak mRNA ekspresyon düzeyleri Tablo 12’de sunulmaktadır. Hedef molekül eNOS’un kontrol GAPDH’a relatif oranı ile hesaplanan ortalama mRNA ekspresyon düzeyleri üç grup için nonparametrik ANOVA testi ile analiz edildiğinde anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p=0.018$). Gruplar kendi aralarında nonparametrik Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında hiperkolesterolemi grubu ortalama eNOS mRNA ekspresyonunda ($0,275 \pm 0,216$) kontrol grubu ortalama eNOS mRNA ekspresyonuna ($4,807 \pm 2,460$) göre anlamlı derecede azalma olduğu saptandı ($p=0.011$). Resveratrol grubu ortalama eNOS mRNA ekspresyonu ($5,209 \pm 1,102$)

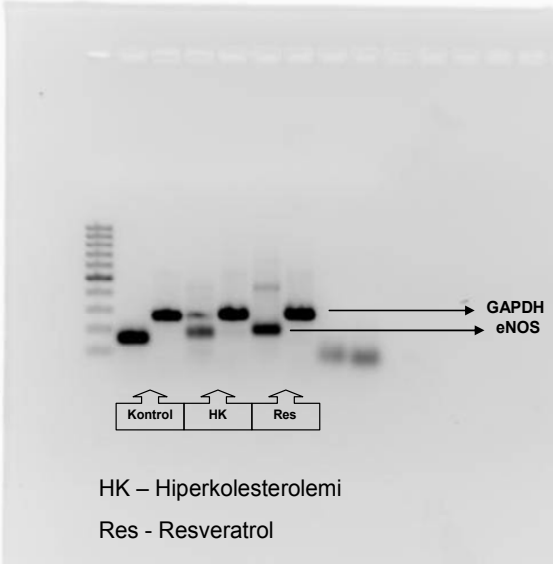
hiperkolesterolemi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzelme olduğu görüldü ($p<0.001$). Resveratrol grubu ile kontrol grubu ortalama mRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0.097$) (Şekil 14).

| | eNOS | GAPDH |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|
| Kontrol 1 | $3,43 \times 10^6$ | $1,49 \times 10^7$ |
| Kontrol 2 | $5,11 \times 10^5$ | $2,65 \times 10^4$ |
| Kontrol 3 | $1,27 \times 10^6$ | $2,11 \times 10^6$ |
| Kontrol 4 | $1,20 \times 10^6$ | $3,24 \times 10^5$ |
| Kontrol 5 | $2,98 \times 10^5$ | $8,05 \times 10^4$ |
| Kontrol 6 | $6,50 \times 10^5$ | $1,94 \times 10^5$ |
| Kontrol 7 | $3,74 \times 10^5$ | $1,31 \times 10^5$ |
| Hiperkolesterolemi 1 | $2,96 \times 10^6$ | $7,67 \times 10^7$ |
| Hiperkolesterolemi 2 | $9,06 \times 10^5$ | $3,11 \times 10^6$ |
| Hiperkolesterolemi 3 | $1,49 \times 10^5$ | $1,84 \times 10^5$ |
| Hiperkolesterolemi 4 | * | * |
| Hiperkolesterolemi 5 | $1,32 \times 10^6$ | $9,48 \times 10^7$ |
| Hiperkolesterolemi 6 | $1,76 \times 10^7$ | $1,72 \times 10^8$ |
| Hiperkolesterolemi 7 | $9,17 \times 10^5$ | $1,30 \times 10^6$ |
| Resveratrol 1 | $1,34 \times 10^6$ | $2,91 \times 10^5$ |
| Resveratrol 2 | $1,23 \times 10^6$ | $2,42 \times 10^5$ |
| Resveratrol 3 | $5,58 \times 10^5$ | $3,50 \times 10^5$ |
| Resveratrol 4 | $2,84 \times 10^6$ | $4,86 \times 10^5$ |
| Resveratrol 5 | $3,60 \times 10^5$ | $9,10 \times 10^4$ |
| Resveratrol 6 | $4,19 \times 10^6$ | $3,76 \times 10^5$ |
| Resveratrol 7 | $7,74 \times 10^6$ | $1,80 \times 10^6$ |

Tablo 12. Her üç grupta korpus kavernozumda eNOS ve GAPDH mutlak mRNA ekspresyon düzeyleri * Ölçülemeyecek düzeyde



Şekil 14. Her 3 grupta korpus kavernozumda eNOS mRNA ekspresyonları real time RT-PCR görüntüleri



Şekil 15. Agaroz jel görüntülemeye hiperkolesterolemi grubunda azalan eNOS mRNA sinyal intensitesinin resveratrol grubunda tekrar arttığı gözlenmektedir

TARTIŞMA

ED tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir ve yaşla paralel olarak görülme sıklığı artmaktadır. Yaşamı tehdit etmese de hasta ve partnerinin psikososyal durumu ve yaşam kalitesi üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır (1,2,3). ED risk faktörleri ateroskleroz gelişiminde rol oynayan vasküler risk faktörleri ile yakın benzerlik göstermektedir ve her iki durum için de son zamanlarda en kabul gören patofizyolojik mekanizma endotelial disfonksiyondur (4). Hiperkolesterolemi bu risk faktörleri arasında ED gelişimi açısından oldukça önemlidir (171). Hiperkolesteroleminin endotel bağımlı damar duvarı ve korpus kavernozum düz kas gevşemesini bozduğu hem insanlarda hem de deney hayvanlarında gösterilmiştir (172,173,174). Çalışmamızda 6 haftalık %2 kolesterol diyeti ile oluşturulan tavşan hiperkolesterolemi modelinde plazma total kolesterol ve LDL kolesterol seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu görüldü ($p<0.001$). Resveratrol grubunda ise plazma total ve LDL kolesterol seviyelerindeki bu artışta hiperkolesterolemi grubuna göre önemli düzeyde iyileşme saptandı ($p<0.001$). Yeni Zelanda tavşanları ile yapılan çeşitli çalışmalarda plazma kolesterol düzeylerinin 20-80 mg/dl arasında değiştiği, kolesterol diyeti ile birlikte beslenme süresi ve kolesterol miktarına bağlı olarak 1000-2000 mg/dl düzeyine çıktığı saptanmıştır (175,176,177,178,179,180). Çalışmamızda hiperkolesterolemi grubunda görülen bu artış literatürde daha önce bu modeli kullanan hayvan çalışmaları ile uyumlu görünmektedir. Resveratrol ile ilgili olarak daha önce yapılan çalışmalarda genel kanı plazma kolesterol düzeylerini düşürdüğü yönündeyse, etkilemediğini gösteren çalışmalarda mevcuttur (181,182,183,184,185). Çalışmamızda 6 haftalık %2 kolesterol diyeti ile oluşturulan hiperkolesterolemide 4 mg/kg/gün dozunda resveratrol hem total kolesterol hem de LDL kolesterol seviyelerinde anlamlı iyileşme sağladı.

LDL özellikle Ox-LDL ateroskleroza yol açan endotelial disfonksiyon gelişiminde önemli role sahiptir. Ox-LDL'nin proaterojenik süreçteki endotelial disfonksiyona yol açan etkilerinden sorumlu ana reseptör tipi LOX-1'dir (6). Sawamura ve ark. LOX-1'in Ox-LDL'nin endotel hücrelerine bağlanması, hücre içine alınması ve degradasyonda rol oynadığını göstermişlerdir. LOX-1 ekspresyonu özellikle plasenta, akciğer ve beyin gibi damarsal yapılardan zengin dokularda ve aterosklerotik lezyonlarda daha yüksek seviyelerde gözlenmektedir (6). Daha sonra yapılan çalışmalarda Ox-LDL ile aktive olan LOX-1'in endotel disfonksiyonu ve apoptozise giden süreci indüklediği belirlenmiştir (9,11).

Yamanaka ve ark. 43 farklı insan dokusunda LOX-1 ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. En yüksek ekspresyon düzeyinin plasenta dokusunda görüldüğü saptanmıştır. Yine akciğer, kemik iliği, substantia nigra ve spinal kord dokularında LOX-1 ekspresyonunun yüksek seviyelerde olduğu raporlanmıştır. Aort dokusunda LOX-1 ekspresyonu bu dokulara oranla daha düşük düzeylerde bulunmuştur (129). Bu çalışmada damarsal yapılardan zengin bir doku olan korpus kavernozum dokusunda LOX-1 ekspresyonu değerlendirilmemiştir.

Yapılan literatür taramasında korpus kavernozumda LOX-1 ekspresyonu veya aktivitesini değerlendiren herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Aynı şekilde resveratrolün LOX-1 ekspresyonu veya aktivitesi üzerine olan etkilerini araştıran herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. Çalışmamız bu açılarından ilk olma özelliği taşımaktadır. Öncelikle real time RT-PCR ile korpus kavernozumda LOX-1 mRNA ekspresyonu değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak daha önce LOX-1 ekspresyonunun gösterilmiş olduğu aort dokusu kullanıldı. RT-PCR ile hem aortta hem de korpus kavernozumda LOX-1 mRNA ekspresyonu saptandıktan sonra agaroz jel görüntüleri elde edildi ve korpus kavernozumda LOX-1 varlığı ortaya konuldu (Şekil 11).

Chen ve ark. hiperlipidemik tavşanların aortalarında LOX-1 ekspresyonunu değerlendirmiştir. Sonuçta hiperlipidemik grupta kontrol grubuna göre LOX-1 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Bu artıştan esas sorumlu hücre tipinin vasküler endotel hücreleri olduğunda aynı çalışmada belirlenmiştir. Bunun yanında bu ekspresyon artışının sadece lezyon alanında değil fakat lezyon içermeyen aorta bölgelerinde dahada yüksek seviyelerde meydana geldiğini görerek LOX-1'in aterogenezin erken evrelerinde çok daha önemli rolü olduğunu belirtmişlerdir (139). Kakutani ve ark. hiperlipidemik tavşanların plazmasında ve aterosklerotik lezyonlarında LOX-1 ligand aktivitesini değerlendirmişlerdir. Hiperlipidemik tavşanların plazmasında LOX-1 ligand aktivitesinde artış saptanmıştır. Kontrol grubundaki tavşanlarda immunohistokimyasal değerlendirmede aortada herhangi bir ligand aktivitesi gözlenmezken, hiperlipidemik tavşanların aortalarında hem lezyon olan hem de olmayan alanlarda LOX-1 ligand aktivitesi olduğu görülmüştür (186). Bu iki çalışma LOX-1'in hiperlipidemik tavşanlardaki aterosklerozun hem erken hem de geç evrelerinde rolü olduğunu kuvvetle desteklemektedir.

Çalışmamızda vaskülojenik ED modelinde kantitatif RT-PCR ile hiperkolesterolemik tavşanların korpus kavernozumlarında LOX-1 mRNA ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik göstermediğini saptadık. Aynı şekilde resveratrol grubundada

hiperkolesterolemi grubu ile karşılaştırıldığında LOX-1 mRNA ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişiklik olmadığı görüldü. Bu bulgular LOX-1'in risk faktörleri ve patofizyolojik mekanizmalar açısından yakın benzerlik gösteren vaskülojenik ED ve ateroskleroz durumlarında korpus kavernozum ve aorta veya diğer büyük damarlarda farklı etkileri olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda LOX-1 mRNA ekspresyonu değerlendirilmiş, protein ekspresyonu ve ligand aktivitesine bakılmamıştır. Bu nedenle bu bulgularla kesin bir kanıya varmak zor görünmektedir.

Çalışmamızda değerlendirmeye aldığımız bir diğer molekül eNOS fizyolojik koşullarda nNOS ile başlayan ereksiyon sürecinin devamlılığında rol oynamaktadır (187). NO biyoyararlanımındaki azalma yani endotelial disfonksiyon ED patofizyolojisindeki en önemli mekanizmadır. Bu azalmadan sorumlu olabilecek mekanizmalar ise kısaca azalmış eNOS ekspresyonu ve aktivitesi, eNOS fosforilasyonunda azalma, reaktif oksijen ürünleri veya Ox-LDL tarafından NO'nun inaktivasyonu, eNOS kofaktörleri veya substrat miktarlarında azalma şeklinde özetlenebilir (188).

Seo ve ark. hiperkolesterolemik tavşanlarda yaptıkları çalışmada korpus kavernozum relaksasyon yanıtlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde kötüleşme olduğunu göstermişlerdir ve bu durumun eNOS aktivitesindeki azalmayla ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (189). Bizde laboratuvarımızda daha önce yapılan bir uzmanlık tezi çalışmasında bu çalışmada kullandığımız hiperkolesterolemik tavşan modelinde kontrol grubuna göre korpus kavernozum gevşeme yanıtlarında anlamlı bozulma olduğunu saptadık ve resveratrol uygulaması ile bu bozulmanın iyileştiğini gösterdik.

Çalışmamızda hiperkolesterolemik tavşanlarda korpus kavernozum eNOS mRNA ekspresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalma olduğu görüldü (Şekil 14, Şekil 15). Önceki çalışmamızla bu çalışmamızın bulgularını birleştirdiğimiz zaman tavşan hiperkolesterolemik erektil disfonksiyon modelinde korpus kavernozum gevşeme yanıtlarındaki azalmanın azalmış eNOS ekspresyonuna bağlı olabileceğini söyleyebiliriz.

Literatüre bakıldığında daha önce resveratrolün korpus kavernozumda eNOS ekspresyonu üzerine olan etkilerini değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun yanında resveratrolün diğer vasküler yapılarda eNOS ekspresyonunu arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (190,191,192,193). Çalışmamızda hiperkolesterolemi grubunda

azalmış olan eNOS mRNA ekspresyonunda resveratrol uygulaması ile anlamlı iyileşme olduğunu gösterdik. Bu bulgularla ilk defa resveratrolün korpus kavernozum eNOS ekspresyonunun üzerine olan etkisini ortaya koymuş bulunuyoruz.

Caminacini ve ark. bovine aortik endotel hücre kültüründe yaptıkları çalışmada Ox-LDL ile LOX-1 etkileşiminin endotel hücrelerde süperoksit üretimini artırarak NO biyoyararlanımında azalmaya neden olduğunu öne sürmüşlerdir (8). Ox-LDL'nin korpus kavernozum düz kası üzerine olan etkileri tartışmalı bir konu olarak yerini almıştır. Tavşan korpus kavernozumunda Ox-LDL'ye yanıt olarak endotel bağımlı gevşeme yanıtlarında azalma olduğunu gösteren çalışmaların yanında değişikliğe yol açmadığını gösteren çalışmalarda mevcuttur (188). Ox-LDL'nin korporal düz kas üzerinde direkt kontraktıl etkisi olduğu da gösterilmiştir (194). Çalışmamızda NO biyoyararlanımı değerlendirilmedi. Sonuçlarımıza bakıldığında hiperkolesterolemik tavşan korpus kavernozumlarında LOX-1 ekspresyonunda anlamlı değişiklik olmaksızın eNOS ekspresyonunun azaldığı gözlenmektedir. Bu bulgular, erektil disfonksiyonda Ox-LDL'nin LOX-1 aracılı mekanizmadan daha çok direkt etkilerinin rol oynadığını düşündürmektedir.

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile korpus kavernozumda LOX-1 ekspresyonu ilk kez gösterildi. Aorta, karotis, koroner ve torasik arterler gibi damarlarda proaterojenik süreçteki endotel disfonksiyonda önemli rolleri olan LOX-1, erektil disfonksiyonun süregeldiği korpus kavernozumdaki endotel disfonksiyonda patofizyolojik süreçte etkili görünmemektedir. Resveratrol uygulaması ile korpus kavernozumda LOX-1 reseptör ekspresyonunda önemli değişiklikler gözlenmemektedir. Hiperkolesterolemik tavşan korpus kavernozumunda eNOS ekspresyonunda anlamlı derecede azalma olmaktadır ve bu azalma daha önce çeşitli çalışmalarda ortaya konduğu gibi ED patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Bu azalma, resveratrol uygulaması ile önemli ölçüde iyileşme göstermektedir. Resveratrolün korpus kavernozum eNOS ekspresyonu üzerine olan bu olumlu etkileri, ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Lipid profili üzerine olan olumlu etkileri ile birlikte resveratrolün özellikle vasküler risk faktörlerinin eşlik ettiği tedaviye dirençli ED olgularında yararlı olabileceği sonucuna vardık.

KAYNAKLAR:

- 1) Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol* 1994; 151:54-61.
- 2) Moreira ED Jr, Lobo CF, Diament A, Nicolosi A, Glasser DB. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: results from a population-based cohort study in Brazil. *Urology* 2003;61:431-436.
- 3) Schouten BW, Bosch JL, Bernsen RM, Blanker MH, Thomas S, Bohnen AM. Incidence rates of erectile dysfunction in the Dutch general population. Effects of definition, clinical relevance and duration of follow-up in the Krimpen Study. *Int J Imp Res* 2004
- 4) Ganz P. Erectile Dysfunction : Pathophysiologic mechanisms pointing to underlying cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2005
- 5) Elesber AA, Solomon H, Lennon RJ, Mathew V ve ark. Coronary endothelial dysfunction is associated with erectile dysfunction and elevated ADMA in patients with early atherosclerosis. *European Heart Journal* 2006;27: 824-831
- 6) Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H ve ark. An endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Nature* 1997; 386: 73-7
- 7) Mehta JL, Li DY. Identification and autoregulation of receptor for Ox-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 511-514
- 8) Cominacini L, Rigoni A, Pasini AF, Garbin U ve ark. The binding of oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL) to Ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J. Biol Chem.* 2001 Apr 27;276(17): 13750-5
- 9) Li D, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation.* 2000 Jun 27; 101(25): 2889-95
- 10) Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Dovoli A ve ark. Ox-LDL binding to Ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J. Biol Chem.* 2000 Apr 28; 275(17): 12633-8

- 11) Li D, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Apr;20(4): 116-22
- 12) Jeremy JY, Angelini GD, Khan M, Mikhailidis DP ve ark. Platelets, oxidant stress and erectile dysfunction: an hypothesis. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 50-54
- 13) Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, Khan MA ve ark. Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? *Cardiovasc Res* 1999; 43: 658-665
- 14) Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV ve ark. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275: 218–220
- 15) Das S, Alagappan VK, Bagchi D, Sharma HS ve ark. Coordinated induction of iNOS–VEGF–KDR–eNOS after resveratrol consumption: a potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascul. Pharmacol.* 2005;42: 281–289
- 16) Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv.* 2006 Feb;6(1):36-47
- 17) NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. *Jama*, 1993; 270: 83-90.
- 18) Montague D.K., Barada J.H., Belker A.M. ve ark. Clinical guidelines panel on erectile dysfunction: summary report on the treatment of organic erectile dysfunction. The American Urological Association. *J Urol*, 1996; 156: 2007-2011.
- 19) Akkus E., Kadioglu A., Esen A. ve ark: Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Turkey: a population-based study. *Eur Urol*, 2002; 41: 298-304.
- 20) Wessells H, Lue TF, McAninch JW: Penile length in the flaccid and erect states: Guidelines for penile augmentation. *J Urol* 1996; 156:995-997.
- 21) Campbell-Walsh Urology: sekizinci baskı, sayfa 74
- 22) Hsu GL, Brock GB, Martinez-Pineiro L ve ark. The three-dimensional structure of the tunica albuginea: anatomical and structural levels. *Int J Impot Res* 1992; 4:117-132
- 23) Brock G, Hsu G-L, Nunes L ve ark. The anatomy of the tunica albuginea in the normal penis and in Peyronie’s disease. *J Urol* 1997; 157:276-281
- 24) Campbell-Walsh Urology: sekizinci baskı, sayfa 1593
- 25) Anderson KE, Wagner G: Physiology of erection. *Physiol Rev* 1995; 75:191-236

- 26)** Nitahara KS, Lue TF: “Microscopic anatomy of the penis” in Textbook of erectile dysfunction, Carson CC, Kirby R and Goldstein I, editors (ISIS Medical Media, Oxford, 1999)
- 27)** Chuang AT, Steers WD: “Neurophysiology of penile erection” in Textbook of erectile dysfunction, Carson CC, Kirby R and Goldstein I, editors (ISIS Medical Media, Oxford, 1999), sayfa 59-72.
- 28)** Carrier S, Brock G, Kour NW ve ark. Pathophysiology of erectile dysfunction. *Urology* 1993; 42: 468-481
- 29)** Saenz de Tejada I, Moroukian P, Tessier J ve ark. Trabecular smooth muscle modulates the capacitor function of the penis. Studies on a rabbit model. *Am J Physiol* 1991; 260: 1590-1595.
- 30)** Udelson D, Nehra A, Hatzichristou DG ve ark. Engineering analysis of penile hemodynamic and structural-dynamic relationships: Part I--Clinical implications of penile tissue mechanical properties. *Int J Impot Res* 1998; 10: 15-24.
- 31)** Lerner SE, Melman A, Christ GJ. A review of erectile dysfunction: new insights and more questions. *J Urol* 1993; 149: 1246-1255.
- 32)** Lue TF, Tanagho EA. Hemodynamics of erection. Baltimore: Williams&Wilkins, sayfa 28-38, 1992
- 33)** Zhao W, Christ GJ. Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction. II. Calcium mobilization in cultured human corporal smooth muscle cells. *J Urol* 1995; 154: 1571-1579.
- 34)** Kirkeby HJ, Forman A, Sorensen S ve ark. Alpha-adrenoceptor function in isolated penile circumflex veins from potent and impotent men. *J Urol* 1989; 142: 1369-1371.
- 35)** Newman HF, Tchertkoff V. Penile vascular cushions and erection. *Invest Urol* 1980; 18: 43-45.
- 36)** Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction and priapism. In: *Campbell's Urology*, 7th ed. Edited by P. C. Walsh, A. B. Retik, T. A. Stamey ve ark. Philadelphia: Saunders, vol. 38, pp. 1157-1170., 1998
- 37)** Tejada IS. In the physiology of erection, signposts to impotence. *Contemporary Urol* 1992; 7: 52-58.
- 38)** Andersson KE. Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 417-450.
- 39)** Mills TM, Chitale K, Lewis RW. Vasoconstrictors in erectile physiology. *Int J Impot Res* 2001; 13 Suppl 5: S29-34.
- 40)** Burnett AL. Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biol Reprod* 1995; 52: 485-489.

- 41) Okamura T, Ayajiki K, Toda N. Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by NO and other relaxing factor derived from nerves. *Am J Physiol* 1998; 274: H1075- 1081.
- 42) Giuliano FA, Rampin O, Benoit G ve ark. Neural control of penile erection. *Urol Clin North Am* 1995; 22: 747-766.
- 43) Burnett AL. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. *J Urol* 1997; 157: 320-324.
- 44) Bloch W, Klotz T, Sedlacek P ve ark. Evidence for the involvement of endothelial nitric oxide synthase from smooth muscle cells in the erectile function of the human corpus cavernosum. *Urol Res* 1998; 26: 129-135.
- 45) Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9: 1319-1330.
- 46) Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM ve ark. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of korpus kavernozum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 843-850.
- 47) Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA ve ark. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the korpus kavernozum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* 1992; 326: 90-94.
- 48) Chitaley K, Webb RC, Mills TM. RhoA/Rho-kinase: a novel player in the regulation of penile erection. *Int J Impot Res* 2001; 13: 67-72.
- 49) Wu X, Haystead TA, Nakamoto RK ve ark. Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 11362-11369.
- 50) Lizza EF, Rosen RC. Definition and classification of erectile dysfunction: Report of the Nomenclature Committee of the International Society of Impotence Research. *Int J Impot Res* 1999;11:141-143
- 51) Michal V, Ruzbarsky V. Histological changes in the penile arterial bed with aging and diabetes. In Zorngiotti AW, Rossi G (eds): *Vasculogenic impotence: Proceedings of the First International Conference on Korpus kavernozum Revascularization*. Springfield,111, Charles C Thomas, 1980, pp 113-119.
- 52) Azadzoi KM, Goldstein I. Erectile dysfunction due to atherosclerotic vascular disease: the development of an animal model. *J Urol*1992; 147: 1675-1681
- 53) Azadzoi KM, Park K, Andry C ve ark. Relationship between cavernosal ischemia and corporal veno-occlusive dysfunction in an animal model. *J Urol* 1997;157:1011-1017

- 54)** Nehra A, Azadzoï KM, Moreland RB ve ark. Cavernosal expandability is an erectile tissue mechanical property which predicts trabecular histology in an animal model of vasculogenic erectile dysfunction. *J Urol* 1998;159: 2229-2236
- 55)** Azadzoï KM, Goldstein I, Sroky MB ve ark. Mechanisms of ischemia-induced cavernosal smooth muscle relaxation impairment in a rabbit model of vasculogenic erectile dysfunction. *J Urol*1998;160:2216-2222
- 56)** Abicht JH. Testing the autonomic system. In:Jonas U, Thon WF, Stief CG, editors. *Erectile dysfunction*. Berlin: Springer Verlag 1991 187-194
- 57)** Aboseif S, Shinohara K, Borırakchanyavat S ve ark. The effect of cryosurgical ablation of the prostate on erectile function. *Br J Urol*1997; 80:918-922
- 58)** Sachs BD, Meisel RL. The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E, Neill JD, Ewing LL, ve ark ed. *The Physiology of Reproduction*, New York: Raven Press; 1988:1393-1423
- 59)** Wermuth L, Stenager E. Sexual aspects of Parkinson's disease. *Semin Neurol* 1992; 12:125-127
- 60)** Mulligan T, Schmitt B. Testosterone for erectile failure. *J Gen Intern Med* 1993; 8:517-521
- 61)** Granata AR, Rochira V, Lerchl A ve ark. Relationship between sleep-related erections and testosterone levels in men. *J Androl* 1997; 18:522-527.
- 62)** Mills TM, Stopper VS, Wiedmeier VT: Effects of castration and androgen replacement on the hemodynamics of penile erection in the rat. *Biol Reprod* 1994; 51:234-238.
- 63)** Penson DF, Ng C, Cai L, ve ark: Androgen and pituitary control of penile nitric oxide synthase and erectile function in the rat. *Biol Reprod* 1996; 55:567-574.
- 64)** Wespes E, Amar E, Hatzichristou F ve ark: *EAU Guidelines on erectile dysfunction*, 2006 edition.
- 65)** Anafartalar K, Bedük Y, Arıkan N. *Temel Üroloji, Üçüncü baskı*, s1031-1038.
- 66)** Neal CR, Michel CC. Transcellular openings through microvascular walls in acutely inflamed frog mesentery. *Exp Physiol* 1992;77:917-20
- 67)** Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncade S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium - derived relaxing factor. *Nature* 1987;327: 524-26
- 68)** Gardiner SM, Campton AM, Benett T ve ark. Regional hemodynamic changes during oral ingestion of N- monomethyl-L-Arginin methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br J Pharmacol* 1990;101:10-12

- 69)** Pahl U, Holtz J, Busse R ve ark. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986;8: 27-44
- 70)** Fishman AP. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann NY Acad Sci* 1982; 401: 1–8.
- 71)** Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redoxactivated forms. *Science* 1992; 258: 1898–1902
- 72)** Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3203–3207.
- 73)** Fitz Gerald GA, Pedersen AK, Patrono C. Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation* 1983; 67: 1174–1177
- 74)** Stamler JS, Vaughan DE, Loscalzo J. Synergistic disaggregation of platelets by tissue-type plasminogen activator, prostaglandin E1, and nitroglycerin. *Circ Res* 1989; 65: 796–804.
- 75)** Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16:23–30
- 76)** Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995; 333: 356–363.
- 77)** Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 1994; 344: 852–854
- 78)** Pigazzi A, Heydrick S, Folli F, Benoit S ve ark. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem* 1999; 274: 14368–14375
- 79)** Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651–4655
- 80)** De Caterina R, Libby P, Peng HB, ve ark. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96: 60–68
- 81)** Marks DS, Vita JA, Folts JD ve ark. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest* 1995; 96: 2630–2638
- 82)** Grag UC, Hassid A. Nitric oxide (NO) and 8-bromo-cyclic GMP inhibits mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1974–1978

- 83)** Fukuo K, Inoue T, Morimoto S ve ark. Nitric oxide mediates cytotoxicity and basic fibroblast growth factor release in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 669–672.
- 84)** Mendelsohn ME, O'Neill S, George D, Loscalzo J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem* 1990; 265:19028–19034
- 85)** Simari RD, San H, Rekhter M ve ark. Regulation of cellular proliferation and intimal formation following balloon injury in atherosclerotic rabbit arteries. *J Clin Invest* 1996; 98: 225–235
- 86)** Garcia-Cardena F, Fan R, Stern DF, Liu J ve ark. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 1996; 271: 27237–27240
- 87)** Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 1–14
- 88)** TTB, İzmir Tabip Odası, Tıpta Temel Bilimler Kolu, Sonbahar Okulu. Endotel, 16-21 Ekim 1994, Seferihisar-İzmir
- 89)** Freiman PC, Mitchell GG, Heistad DD ve ark. Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. *Circ Res* 1986; 58: 783–789
- 90)** Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1991; 83: 391–401
- 91)** Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans: effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension. *J Clin Invest* 1993; 92: 652–662
- 92)** Adams MR, Robinson J, McCredie R ve ark. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 123–127
- 93)** Cernacek P, Stewart DJ. Immunoreactive endothelin in human plasma: marked elevations in patients in cardiogenic shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:562–567
- 94)** Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ, Heistad DD. Vascular responses to endothelin-1 in atherosclerotic primates. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 1113–1118

- 95)** Blair A, Philip W. Shaul, Ivan S ve ark. Oxidized Low Density Lipoprotein Displaces Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) from Plasmalemmal Caveolae and Impairs eNOS activation. *The Journal Of Biological Chemistry*; 1999Vol. 274, No. 45, Issue of November 5, pp. 32512–32519
- 96)** Adams MR, Kinlay S, Blake GJ, Orford JL ve ark. Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: mechanisms in the genesis of ischemic syndrome. *Annu Rev Med* 2000; 51: 149–167
- 97)** Arnman V, Nilsson A, Stemme S, Risberg B ve ark. Expression of plasminogen activator inhibitor 1 mRNA in healthy, atherosclerotic and thrombotic human arteries and veins. *Thromb Res* 1994; 76: 487–499
- 98)** Hamsten A. Hemostatic function and coronary disease. *N Engl J Med* 1991; 332: 677–678
- 99)** Szczeklik A, Musial J, Undas A ve ark. Inhibition of thrombin generation by aspirin is blunted in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 948–954
- 100)** Davi G, Ganci A, Averna M ve ark. Thromboxane biosynthesis, neutrophil and coagulation activation in type IIa hypercholesterolemia. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1015–1019
- 101)** Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovascular Res* 1999; 43: 532–541
- 102)** Abe J, Berk BC. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 1998; 8: 59–64
- 103)** Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412–426
- 104)** Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, ve ark. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 834–842
- 105)** Landmesser U, Dikalov S, Price SR ve ark. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111: 1201–1209
- 106)** Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108: 1912–1916
- 107)** Anderson TJ, Meredith IT, Charbonneau F ve ark. Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans. *Circulation* 1996; 93: 1647–1650

- 108)** Hernandez-Perera O, Perez-Sala D ve ark. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelium-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998; 101: 2711–2719
- 109)** Bode-Böger SM, Böger RH, Kienke S ve ark. Elevated L-arginine/ dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219: 598–603
- 110)** Vallance P, Leone A, Calver A ve ark. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572–575
- 111)** Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelial-derived relaxing factor and prostacyclin in platelets. *J Pharmacol* 1987;92: 181–187
- 112)** Boulanger CM, Tanner FC, Béa ML ve ark. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992; 70: 1191–1197
- 113)** Kita T, Kume N, Minami M ve ark. Role of Oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 947: 199–206
- 114)** Palmer HJ, Paulson KE. Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev* 1997; 55: 353–361
- 115)** Sundaesan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K ve ark. Requirements for generation of H₂O₂ for PDGF signal transduction. *Science* 1995; 270: 296–299
- 116)** Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251: 788–791
- 117)** Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90: 1138–1144
- 118)** Lopez-Garcia E, Schulze MB, Meigs JB ve ark. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *Nutrition* 2005; 135: 562–566
- 119)** De Caterina R, Liao JK, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 213–223
- 120)** Wallace FA, Miles EA, Evans C ve ark. Dietary fatty acids influence the production of Th1-but not Th2-type cytokines. *J Leuk Biol* 2001; 69: 449–457

- 121)** Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2175–2183
- 122)** Sowers JR. Hypertension, angiotensin II, and oxidative stress. *N Engl J Med* 2002; 346: 1999–2001
- 123)** Drexler H. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol* 1998; 82: 3–4
- 124)** Langheinrich AC, Bohle RM. Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation. *Virchows Arch* 2005; 446: 101–111
- 125)** Chen M, Masaki T, Sawamura T. LOX-1; the receptor for oxidized low density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 2002 Jul; 95(1): 89-100
- 126)** Draude G, Hrboticky N, Lorenz RL. The expression of the lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor (LOX-1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its downregulation by lovastatin. *Biochem Pharmacol.* 1999 Feb 15;57(4): 383-6
- 127)** Moriwaki H, Kume N, Kataoka H, Murase T. Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF-alpha. *FEBS Lett.* 1998 Nov 27;440 (1-2): 29-32
- 128)** Chen M, Kakutani M, Naruko T, Ueda M. Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 282: 153
- 129)** Yamanaka S, Zhang XY, Miura K, Kim S, Iwao H. The human gene encoding the lectin type oxidized LDL receptor (OLR1) is a novel member of the natural killer gene complex with a unique expression profile. *Genomics* 1998;54:191–9
- 130)** Aoyama T, Sawamura T, Furutani Y, Matsuoka R, Fujiwara H, Masaki T. Structure and chromosomal assignment of the human lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene. *Biochem J* 1999;39:177–84
- 131)** Chen M, Narumiya S, Masaki T, Sawamura T. C-terminal Conserved residues within the lectin-like domain of LOX-1 are essential for oxidized low-density-lipoprotein binding. *Biochem J* 2001;355: 289– 96
- 132)** Ohki I, Ishigaki T, Oyama T, Matsunaga S, Xie Q, Ohnishi- Kameyama M, ve ark. Crystal structure of human lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ligand binding domain and its ligand recognition mode to oxLDL. *Structure* 2005;13:905–17

- 133)** Park H, Adsit FG, Boyington JC. The 1.4 angstrom crystal structure of the human oxidized low density lipoprotein receptor lox-1. *J Biol Chem* 2005;280:13593–9
- 134)** Li DY, Sawamura T, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type-1 receptor activation. *Circ Res* 1999;84:1043–9
- 135)** Murase T, Kume N, Korenaga R, Ando J, Sawamura T, Masaki T, et al. Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1998;83: 328– 33
- 136)** Kume N, Sawamura T, Moriwaki H, Aoyama A, Nishi E, Ueno Y, et al. Inducible expression of LOX-1, a novel lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein, in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1998;83:322– 7
- 137)** Nagase M, Hirose S, Sawamura T, Masaki T, Fujita T. Enhanced expression of endothelial oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:496–8
- 138)** Chen M, Nagase M, Fujita T, Narumiya S, Masaki T, Sawamura T. Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of LOX-1 ligand and age. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;87:962– 8
- 139)** Chen M, Kakutani M, Minami M. Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1107–15
- 140)** Mehta JL, Chen J, Yu F, Li DY. Aspirin inhibits Ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2004;64:243– 9
- 141)** Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T, Mehta JL. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:816–21
- 142)** Li D, Chen H, Mehta JL. Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation. *Cardiovasc Res* 2001;52:130– 5
- 143)** Li D, Mehta JL. Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol* 1998;275:568– 76
- 144)** Li D, Chen H, Sawamura T, Saldeen T, Mehta JL. Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:601–5

- 145)** Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NFkappaB. *Circulation* 2000;102:1970– 6.
- 146)** Li D, Singh RM, Liu L, Chen H, Singh BM, Kazzaz N, ve ark. Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2003;57:238–43
- 147)** Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an Ayurvedic medicine from India. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 68: 71–76
- 148)** Vastano BC, Chen Y, Zhu N, Ho CT ve ark. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J. Agri. Food Chem.* 2000; 48: 253–256
- 149)** Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal* 1997; 11: 287-313
- 150)** St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to consumption of wine. *Lancet*; 1979; 1: 1017-1020
- 151)** Renoud S.C. Geuguen R, Schenker J. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology* 1998; 9: 184-188
- 152)** Law M, Wald N. Why hearth disease mortality is low in France:The time lad explanation. *Br. Med J* 1999;318:1471-1476
- 153)** Renoud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradoxfor coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339:1523-1526
- 154)** Koop P. Resveratrol a phytoostrohen found in red wine. A possible explanation for the conundrim of the “French paradox”. *Euro J Endo* 1998; 138:619-620
- 155)** Wu JM, Wang Z, Hseih JC. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic present in red wine. *Int J. Molecular Medicine.* 2001; 8:3-17
- 156)** Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J. Immunol.* 2000; 164: 6509–6519
- 157)** Yen GC, Duh PD, Lin CW. Effects of resveratrol and 4- hexylresorcicol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic. Res.* 2003; 37: 509–514

- 158)** Kirk RI, Deitch JA, Wu JM, Lerea KM. Resveratrol decreases early signaling events in washed platelets but has little effect on platelet in whole blood. *Blood Cells Mol Dis*; 2000; 26(2):144-50
- 159)** Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000; 66: 663– 73
- 160)** Belguendouz L, Fremont L, Gozzelino MT. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:811–816
- 161)** Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E ve ark. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993; 341:454– 7
- 162)** Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 1997; 135:93– 102
- 163)** Wang Z, Huang Y, Zou J, Cao K ve ark. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Mol Med* 2002; 9:77– 9.
- 164)** Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, Celardo A, Rotillo D, de Gaetano G ve ark. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br J Pharmacol* 1998; 123:1691 –1619
- 165)** Lin MT, Yen ML, Lin CY, Kuo ML. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol* 2003; 64:1029– 36
- 166)** Pendurthi UR, Rao LV. Resveratrol suppresses agonist-induced monocyte adhesion to cultured human endothelial cells. *Thromb Res* 2002; 106:243– 8
- 167)** Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine or other grape products. *Am J Physiol* 1993; 265: 774–748
- 168)** Klinge CM, Risinger KE, Watts MB, Beck V, Eder R, Jungbauer A. Estrogenic activity in white and red wine extracts. *J Agri Food Chem* 2003; 51: 1850–1857
- 169)** Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro JM, Gomez E, Fernandez P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol* 2002; 61(2):294-302
- 170)** Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S ve ark. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation* 2000; 22;101(7):805-11
- 171)** Krane RJ, Goldstein I, Saenz de Tejada I. Impotence. *N Eng J Med* 1989;321:1648-1659
- 172)** Azadzo KM, Saenz de Tejada I. Hypercholesterolemia impairs endothelium dependent relaxation of rabbit korpus kavernozum smooth muscle. *J Urol* 1991;146: 238- 240

- 173)** Kim SC, Kim IK, Lee MY, Uhm DY. Relaxation responses of cavernous smooth muscles to vasodilators in impotent patients with hypercholesterolemia or hypertriglyceridemia. *Kor J Androl* 1995;13: 95-101
- 174)** Kim SC, Kim IK, Seo KK, Baek KJ, Lee MY. Involvement of superoxide radical in the impaired endothelium dependent relaxation of cavernous smooth muscle in hypercholesterolemic rabbits. *Urol Res* 1997;25: 341-346
- 175)** Menzoian JO, Haudenschild CC, Shipman JL, Nickerson CJ ve ark. Correction of enhanced endothelial permeability by cessation of cholesterol feeding. *J Vasc Surg.* 1987; 5(2):336-41
- 176)** Kojda G, Stein D, Kottenberg E, Schnaith EM, Noack E. In vivo effects of pentaerythryl-tetranitrate and isosorbide-5-mononitrate on the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction in cholesterol-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25(5):763-73
- 177)** Santilli SM, Kronson J, Payne WD. The effect of hypercholesterolemia on the rabbit transarterial wall oxygen gradient. *Ann Vasc Surg* 1998; 12(5):418-23
- 178)** Yang BC, Phillips MI, Mohuczy D, Meng H ve ark. Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(9):1433-9
- 179)** Laal Jayakody, Manohara Senaratne, Alan Thomson, Tissa Kappagoda. Endothelium-Dependent Relaxation in Experimental Atherosclerosis in the Rabbit. *Circ Res* 1987;60: 251-264.
- 180)** Catherine M. Lenich, Aram V. Chobanian ve ark. Effect of dietary cholesterol and alloxan-diabetes on tissue cholesterol and apolipoprotein E mRNA levels in the rabbit . *Journal of Lipid Research* 1991 Mar;32(3): 431-8
- 181)** Miura D, Miura Y, Yagasaki K. Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. *Life Sci* 2003; 73(11):1393-400
- 182)** Rimando AM, Nagmani R, Feller DR, Yokoyama W. Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *J Agric Food Chem* 2005; 4;53(9):3403-7
- 183)** Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Koneru S, Juhasz B ve ark. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42(3):508-516

- 184)** Wang Z, Zou J, Cao K, Hsieh TC ve ark. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int J Mol Med* 2005; 16(4):533-40
- 185)** Wilson T, Knight TJ, Beitz DC, Lewis DS ve ark. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci* 1996; 59(1):15-21.
- 186)** Kakutani M, Ueda M, Naruko T, Masaki T, Sawamura T. Accumulation of LOX-1 ligand in plasma and atherosclerotic lesions of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits : Identification by a novel enzyme immunoassay. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 180-185
- 187)** Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, Crone JK, Becker RE, Moriarity JL, Snyder SH, Burnett AL. Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99
- 188)** Musicki B, Burnett AL. eNOS function and dysfunction in the penis. *Exp Biol Med* 2006; 231: 154-165
- 189)** Seo KK, Yun HY, Kim H, Kim SC. Involvement of endothelial nitric-oxide synthase in the impaired endothelium-dependent relaxation of cavernous smooth muscle in hypercholesterolemic rabbit. *J Androl* 1999;20: 298-306
- 190)** Wallerath T, Li H, Godtel-Ambrust U, Schwarz PMat al. A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric Oxide* 2005; 12(2):97-104
- 191)** Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H ve ark. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003; 25;107(11):78-9
- 192)** Liu ZP, Song Y, Liu ZQ, Zhang XP. Preventive effect of trans-resveratrol on hypertension-induced cardiac hypertrophy in partially nephrectomized rats. *Wei Sheng Yan Jiu* Nov 2005;34(6):756-8.
- 193)** Liu Z, Song Y, Zhang X, Liu Zve ark. Effects of trans-resveratrol on hypertension-induced cardiac hypertrophy using the partially nephrectomized rat model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* Dec 2005;32(12):1049-54.
- 194)** Ahn TY, Gomez-Coronado D, Martinez V, Cuevas P, Goldstein I, Saenz de Tejada I. Enhanced contractility of rabbit korpus kavernozum smooth muscle by oxidized low density lipoproteins. *Int J Impot Res* 1999;11:9-14