



ARAŞTIRMA MAKALESİ

ARAŞTIRMA MAKALE

CBU-SBED, 2018, 5(3): 112-119

Kronik Sudan Kaçınma Stresi ile Oluşturulan Oksidatif Hasar ve Fulvik Asidin Erkek Sıçan Dokusunda Eretil Disfonksiyon Üzerine Etkisi

Ezgi Yaprak Söyük¹, İbrahim Söğüt 2*, Esra Çikler Dülger¹, Canan Hürdağ¹

¹İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı İstanbul, Türkiye:

ezgiyaprak05@hotmail.com, esracikler@gmail.com, İstanbul Bilim Üniversitesi,

² Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, İstanbul, Türkiye ibrahim.sogut@gmail.com

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: İbrahim Söğüt

Gönderim Tarihi / Received: 03.08.2018

Kabul Tarihi / Accepted: 20.09.2018

Öz

Amaç: Çalışmamızda fulvik asitin antioksidan özelliğinden yararlanarak erekil disfonksiyon ile bağlantılı olan penil doku hasarın üzerine olan etkisini amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 18 adet Sprague-Dawley (250-300gr) erişkin erkek sıçan 3 eşit gruba ayrıldı: Kontrol (K), Kronik Stres (KS) ve Kronik Stres+Fulvik Asit (KS+FA). Penis doku kesitleri Hematoksilin&Eozin (H&E) ve Masson trikrom ile histokimyasal; endotelial; nöronal nitrik oksit sentaz (eNOS;nNOS), Kaveloin-1, immünohistokimya işaretlemeler incelenmiştir. Biyokimyasal olarak dokulardaki total antioksidan seviyesi (TAS), total oksidan seviyesi (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ), katalaz (KAT), glutasyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ölçülmüştür.

Bulgular: KS grubu incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla trabeküler endotel hücrelerinde kayıp, kollajen liflerde azalmalar ve incelmeler, bağ dokusu ve düz kas dağılımında bozulmalar gözlenmiştir. KS+FA grubu incelendiğinde KS grubuna kıyasla oluşan hasarlarda tam bir iyileşme gözlenmemekle beraber dokularda yer yer düzelmeler rastlanmıştır. KS grubunda eNOS ve nNOS aktivitesinin kontrol grubuna göre azalmış, kaveolin-1 reaksiyonun ise artmış olduğu gözlenmiştir. Aynı grupta TOS ve OSİ değerlerinin arttığı, TAS, SOD, KAT ve GPx değerlerinin de azaldığı görülmüştür. KS+FA grubunda fulvik asit kullanımı ile kontrol grubuna yakın olduğu gözlenmiştir.

Sonuç: Kullanılan fulvik asitin tedavi edici etkileri olduğu fakat tedavi için kullanılan dozun yeterli miktarda olmadığı saptanmıştır. Tedavi edici etkinin yeterli miktarda olması için farklı dozlarda çalışılmasını ileri sürmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Eretil Disfonksiyon, Sudan Kaçınma Stresi, Oksidatif Stres, İnfertilite, Fulvik Asit.

Soyut

Amaç: Çalışmamızda erekil disfonksiyona bağlı penil doku hasarını önlemek için fulvik asidin antioksidan özelliğini kullanmayı amaçladık.

Yöntemler: 18 Sprague-Dawley yetişkin erkek sıçan 3 deney grubuna ayrıldı: Kontrol (K), Kronik Stres (CS) ve Sudan Kaçınma Stresi+Fulvik Asit (CS+FA). Testislerden alınan histolojik kesitler Hematoksilin&Eozin (H&E) ve Masson Trichrome ile boyandı ve endotelial ve n nitrik oksit sentaz (eNOS &nNOS) immünohistokimya işaretlemesi yapıldı. Total antioksidant durum (TAS), total oksidant durum (TOS), oksidatif stres (OSİ), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri biyokimyasal olarak değerlendirildi.

Bulgular: CS grubunda kontrol grubuna göre trabeküler endotel hücrelerinin kaybolduğu, kollajen liflerinin büzüldüğü, bağ dokusu ve düz kas dağılımlarının dengesiz dağıldığı görüldü.

CS + FA grubu incelendiğinde, CS grubundaki hasar tedavi edilen dokularda önemli ölçüde iyileşme gösterdi. CS grubunda hem eNOS hem de nNOS reaktivitesi kontrol grubuna göre azalırken caveolin 1 reaktivitesi artmıştı. histokimyasal veriler. Ayrıca KS grubunda TOS ve OSİ düzeylerinde artış, TAS, SOD, CAT ve GPx düzeylerinde azalma gözlemlendi.

Sonuç: Kullanılan fulvik asidin terapötik etkisi olduğu ancak tedavi için kullanılan dozun yeterli olmadığı görüldü. Terapötik etkinin sağlanması için farklı ama daha yüksek dozlarda çalışmayı öneriyoruz.

Anahtar Kelimeler: Eretil Disfonksiyon, Su Kaçınma Stresi, Oksidatif Stres, İnfertilite, Fulvik Asit.

1. Giriş

Dünyada en yaygın rastlanan erkek infertilite problemi, beraberinde cinsel fonksiyon sorunlarını da meydana getiren, erektil disfonksiyondur (ED). İnfertilite erkek için stres kaynağıdır. İnfertiliteye bağlı stres ED gelişimine sebep olur [1]. Eretil disfonksiyon ile infertilite arasında psikoseksüel bir etki vardır. İnfertiliteye bağlı yaşanan sürekli kaygı, inhibitör sinirleri uyararak penisteki düz kasların gevşemesini önler. Bu durum ereksiyon bozukluğuna neden olur [2]. Eretil disfonksiyon tanılı hastalarda cinsellik üremenin önüne geçer, bu durumda erkek birey kendini yetersiz hissetme psikolojisine girer ve yaşam kalitesini düşürür [3].

Stres, organizmanın fizyolojik ve psikolojik dengesini bozacak anormal çevresel etkilere karşı homeostazi korumak üzere geliştirdiği bir tepkidir. Kronik stres uzun süreli strese maruz kalma durumu olarak tanımlanır [4]. Kronik stres sonucu hipotalamik-pitüiter adrenal (HPA) ekseninin organizasyonu (5) ve değişik HPA aksamları (hipotalamik-pitüiter-gonadal (HPG) ekseninin hormonal mekanizmaları arasında yakın bir ilişki vardır.

Uzun süreli veya tekrarlanan stres koşullarında, HPA ekseninin aktivasyonu sonucunda kortizol salgısı artar; ancak HPG ekseninin aktivitesi ters yönde etkilenir. HPG ekseninin son ürünü olan testosteron, ereksiyonun hormonal düzenlenmesinde önemli rol oynar [6]. Ereksiyon, hipotalamus ve periferik etki mekanizmaları altındaki cinsel uyarı sonrasında, sinüzoidlerin kan ile dolmaya başlaması sürecidir. Bu süreç, korpus kavernozumda ki düz kasların gevşemesi ile sağlanır.

Ereksiyon oluşumunda nitrik oksit (NO), nörojenik nitrik oksit sentaz (nNOS), endotel nitrik oksit sentaz (eNOS), Ca²⁺ ve tunika albugenia rol oynamaktadır [7]. Reaktif oksijen türleri (ROS) vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri NO ve eNOS ekspresyonunu ve aktivitesinin uyarılmasına neden olur [8]. Endotel hücre membranında bulunan eNOS ve kaveolin-1 proteinleri direkt etkileşim halindedir ve diğer proteinlerle birlikte normal endotel hücre fonksiyonu için çalışırlar. Kaveolin-1, eNOS aktivitesini inhibe eder ve buna bağlı olarak endotel hücre yapısının bozulmasına ve erektil disfonksiyona sebep olur [9].

Stresin çeşitli dokularda meydana getirdiği toksisite, ROS artışı nedeniyle oluşur. Normal koşullarda hücre içi antioksidan sistemleri, ROS oluşumunu engelleyerek ya da serbest radikal ve bunların öncülerini uzaklaştırarak görev yaparlar. ROS'un artması ve antioksidan savunma sistemlerinin bu ROS artışına karşı yetersiz kalmasıdır [10].

Post mortem dönemde mikroskobik organizmalar maddelerin ayrıştırılmasını sağlarken birçok yararlı madde de açığa çıkar. Bu maddelerden biri toprakta bulunan humik maddedir [11]. Fulvik asit yapısında aromatik polimerler, aromatik halkalar, fenolik hidroksil, keton karbonil dahil olmak üzere aktif

fonksiyonel gruplar içerir [12]. Topraklarda humik maddelerin dağılımı yaklaşık olarak %50 humin %40 humik asit ve %10 fulvik asit şeklinde olduğu bilinmektedir [11,13]. Fulvik asit, humik asite göre daha düşük molekül ağırlığına ve daha yüksek oksijen oranına sahiptir. Fulvik asit, hormonlar, vitaminler ve mineraller bakımından çok zengindir ve bulundurduğu sağlıklı minerallerden dolayı toprağın içindeki en aktif madde olarak bilinir [12]. Fulvik asit, antioksidan özelliğinin yanı sıra toksik olmayan anti-inflamatuar ve antiapoptotik bir ajandır. Stres sonucu, fulvik asit tedavisinin nötrofillerden salınan oksidanların üretimini azalttığı bildirilmiştir [14]. Fulvik asit, serbest radikal hasarı ile mücadelede önemli bir başarı göstermektedir, özellikle süperoksit dismutaz enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırmaktadır [15].

Çalışmamızda uygulanan sudan kaçınma stresi hem psikolojik hem de fizyolojik stresi yansıtmaktadır. Bu çalışmanın amacı, günümüzde herkesi etkileyen yaşamsal stres koşullarının etkisi ile artan ve önemli bir sosyal sorun olan erektil disfonksiyon ile ilişkili penis doku hasarına fulvik asitin iyileştirici etkisinin incelendiği ülkemizde ve dünyada yapılacak ilk araştırma olma özelliğini taşımaktadır.

2. Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanları Deneylerde 250-300 gr ağırlığındaki erişkin Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. Denekler, deney süresince standart kafeslerde, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde, sabit 22 °C ve %55 nemli ortamda barındırıldılar, standart pellet yem ve musluk suyu ile (ad libitum) beslendiler. Denekler, İstanbul Medipol Üniversitesi MEDİTAM'dan alındı ve deneysel çalışmalar aynı kurumda 24/02/2016 tarihli 2016/26 numaralı etik kurulu onayı ile gerçekleştirildi. Fulvik Asitin Hazırlanması Fulvik asit, IHSS (Uluslararası Humik Madde Derneği) tarafından "Pahokee Turba Fulvik Asit Standard" olarak temin edildi. Deneylerde distile su ile 150 mg/kg oranında hazırlanan homojen karışım kullanıldı.

Stres Protokolü Denekler birbirini takip eden 10 gün boyunca günde 1 saat olmak üzere 50 cm x 50 cm x 50 cm ebatlarındaki ılık suyla dolu pleksiglas havuzların merkezindeki 6 cm x 8 cm ebatlarındaki platformun üzerine bırakıldılar. Havuzlar platformun 1 cm altına gelecek kadar ılık su ile dolduruldu. Stres protokolü her gün sabah 08:00-09:00 saatleri arasında uygulandı. Deneylere başlanmadan bir hafta önce tüm denekler aynı araştırmacı tarafından dokunularak deney koşullarına ve araştırmacıya alıştırdı (handling).

Deney Protokolü Deneylerde kullanılan toplam 18 adet sıçan her bir grupta eşit sayıda denek olacak şekilde 3 gruba ayrıldılar: (1) Kontrol (K) (n=6): Herhangi bir işlem uygulanmayan grup, (2) Kronik Stres (KS) (n=6): 10 gün boyunca sudan kaçınma stresi uygulanan grup, (3) Kronik Stres+Fulvik Asit (KS+FA) (n=6): 10 gün boyunca sudan kaçınma stresi ve ardından 10 mg/kg fulvik asit (i.p.) uygulanan grup. Deneylerin 10. gününde tüm gruplardaki denekler, izofluran (Aerrane

İbrahim SÖĞÜT ve Ark.

Isofluran Volatil) anestezi ile sedasyonun ardından sakrifiye edildiler. Deneklerin penil dokuları histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için Bouin solüsyona alındı. Biyokimyasal analiz için ayrılan testisler, sıvı azotta dondurulduktan sonra analizleri yapılana kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Histolojik Yöntem Bouin solüsyonunda fikse olan penil dokuları dehidrate edildikten sonra parafin blok haline getirilip dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı (Thermo Scientific HM 340E). Genel histolojik değerlendirme için H&E, bağ dokusu değerlendirmesi için Masson trikrom (TM) boyamaları ve immünohistokimyasal analizler yapıldı. H&E (Bioptica) kesitler X100, X400 büyütme ve TM (Bioptica) ile boyanan kesitler X1000 büyütmede Olympus BX53 ışık mikroskobu ile incelenip fotoğraflandı. İmmünohistokimyasal Yöntem Kesitleri deparafinize ve rehidratasyon yaptıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için %3'lük hidrojen peroksit ve antijenik bölgelerin açılması amacıyla sitrat tamponuna (pH 6.0) (Sigma-Aldrich, LOT:C-2488) alındılar. Ardından kesitler nNOS primer antikorunda (1:200), eNOS primer antikorunda (1:500) ve kaveolin 1 primer antikorunda (1:200) (Thermo Fischer Scientific, sırasıyla LOT numaraları 40487565, QJ214409, RE2198415) +4 °C' de 24 saat boyunca tutuldu. Kesitler anti-polyvalent Biotin (ScyTek Laboratories LOT: 41865) sekonder antikorunda daha sonra peroksidaz enzimi ile işaretli olan streptavidinle (ScyTek Laboratories SensiTek HRP LOT: 41865) işaretlendi.

Renk reaksiyon ürününün oluşması için 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) substratı (ScyTek Laboratories LOT: 36729) ile sulandırılmış olan DAB kromojene (ScyTek Laboratories LOT: 36702) maruz bırakıldı. nNOS, eNOS ve kaveolin-1 reaksiyonlarını gözlemlemek için kesitlerde (Olympus Bx53, Japonya) fotoğrafları çekildi.

Biyokimyasal Yöntem Penil doku örnekleri tartıldıktan sonra TAS, TOS ve OSİ seviyelerinin inceleneceği örnekler, 0.15 N potasyum klorür (KCl) solüsyonunda; SOD, KAT, GPx seviyelerinin inceleneceği örnekler PBS solüsyonunda Ultra Turrax T10 (IKA, Wilmington, NC, ABD) ile homojenize edildi. Penis dokusunda TAS, TOS ve OSİ seviyeleri Rel Assay Diagnostics kitleri (Gaziantep, Türkiye) ve SOD, KAT ve GPx seviyeleri ise ELISA kitleri (Bioassay teknolojisi laboratuvarı, Şangay, Çin) ile tespit edildi. İstatistiksel Değerlendirme GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software Inc.) programı kullanıldı. Bulgular için ortalama ± standart hata (SE) ve *p<0,05 değeri anlamlı kabul edildi. Normal dağılıma uygunluk gösteren veriler için tek yönlü ANOVA testi olan Tukey uygulandı.

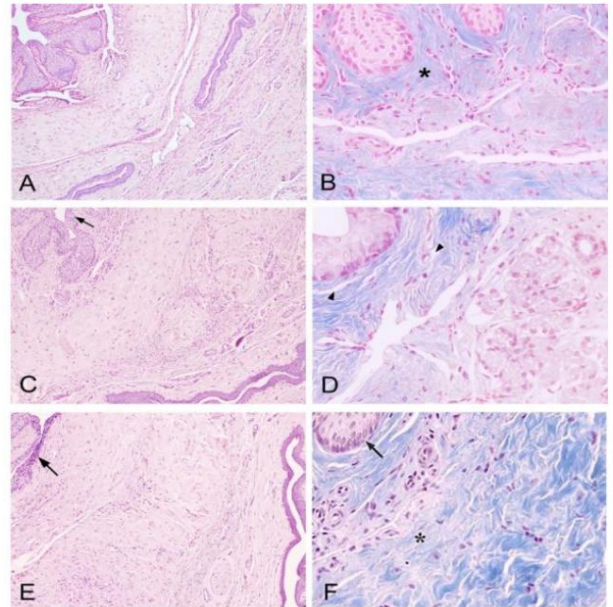
3. Bulgular

3.1.Histolojik Bulgular Kontrol grubuna ait H&E ile boyanmış penis dokuları ışık mikroskobu ile incelendiğinde bağ dokusu yapılanması düzgün, kollajen yapılanması sık ve paralel yerleşim gösterdiği

görülmüştür. Fibroelastik trabeküler bağ dokusu ile düz kas içeriği oranı normal değerlendirilmiştir. Penil üretranın transizyonel epitelinde herhangi bir hasara rastlanmamış, lamina proprianın düzgün dağılım gösterdiği ve korpus spongiosum yapısının normal olduğu gözlenmiştir (Şekil 1A). Masson'un üçlü boyası ile boyanan K grubuna ait penis preparatları incelendiğinde, kollajen-kas oranı düzenli dağılım ve yerleşim göstermiştir. Epitel görüntüsünün düzgün ve hücrelerin yerleşimlerinin düzenli olduğu görülmüştür (Şekil 1B). KS grubuna ait H&E ile boyanmış penis dokuları ışık mikroskobu ile incelendiğinde bağ dokuda bozulmalar kollajen liflerde kopmalar gözlenmiştir. Bağ dokusu ile epitel doku arasındaki bazal membran bütünlüğü bozulduğu için bazal hücrelerde düzensiz yerleşim görülmüştür. Özellikle trabeküler alandaki düzensizlikler çok yoğun olarak izlenmiştir (Şekil 1C).

KS grubuna ait Masson'un üçlü boyaması yapılan penis preparatları incelendiğinde, tunika albuginea'nın kaba ve dağınık kollajen lif demetlerinden oluştuğu görülmüştür. Dağınık ve incelmış kollajen demetleri içeren kavernoza dokuda yaygın fibroblast varlığı gözlenmiştir. Bağ dokusu ve düz kas dağılımı oranında belirgin bozulmalar ile endotel hücre hasarı görülmüştür (Şekil 1D).

KS+FA grubuna ait H&E ile boyanmış penis dokuları ışık mikroskobu ile incelendiğinde KS grubuna kıyasla bazal membran ve bağ dokuda düzelmeler gözlenmiştir (Şekil 1E). KS+FA grubuna ait Masson'un üçlü boyası ile boyanan penis doku preparatları incelendiğinde, kronik stres grubuna kıyasla kollajen lif ve bazal membran yapılarında düzelmeler görülmüştür (Şekil 1F).



Şekil 1: Hematoksilen-eosin ve Masson'un üçlü boyaması ile boyanan penil doku kesitleri: K grubunda penil üretra, transizyonel epitel ve korpus spongiosum (A) ve düzenli yerleşimli kollajen görüntüsü (*), (B); KS grubunda bazal membran bütünlüğünde bozulmalar (C); KS+FA grubunda kollajen lif ve bazal membran yapılarında düzelmeler (E); KS+FA grubuna ait Masson'un üçlü boyaması ile boyanan penis doku preparatları incelendiğinde, kronik stres grubuna kıyasla kollajen lif ve bazal membran yapılarında düzelmeler görülmüştür (Şekil 1F).

İbrahim SÖĞÜT ve Ark.

(), kollajen liflerde ayrılmalar, (C); Kollajen liflerin dağılık ve incelmış görüntüsü (), (D); KS+FA grubunda bazal membranda (), (E) ve bağ dokusunda düzelmeler (, *), (F) (Şekil 1A, C ve E: H&E boyaması, büyütme: X100; Şekil 1B, D ve F: Masson'un üçlü boyaması, büyütme: X 400). 3.2.İmmünohistokimyasal Bulgular Sıçan penis dokularından elde edilen örneklerde K grubuna ait eNOS immün reaksiyonunun KS grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu ($p<0,05$) görülmüştür. KS+FA grubuna ait eNOS immün reaksiyonunun ise KS grubuna göre artmış, ancak bu artış anlamlı bulunamamıştır Reaksiyon özellikle trabeküler alanda yer alan endotel hücrelerde gözlenmiştir (Şekil 2A).

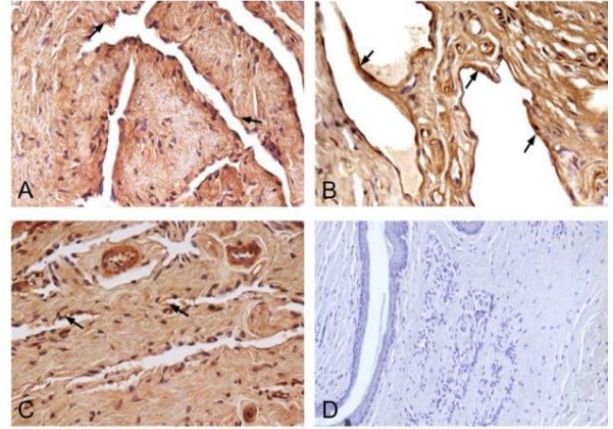
Bunun yanı sıra, damar endotelinde de eNOS reaksiyonunun olduğu belirlenmiştir. KS grubuna ait penis dokularında eNOS reaksiyonunun trabeküler alanda yer alan endotel hücrelerinde kontrol grubuna göre az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2B).

KS+FA grubuna ait penis dokularında trabeküler alan endotelindeki eNOS reaksiyonunun ise kronik stres grubuna göre arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 2C). KS grubunda nNOS ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla azalmış; ancak bu azalma anlamlı bulunmamıştır. KS+FA grubundaki nNOS ekspresyonu KS grubuna kıyasla artmış, bu artış anlamlı bulunmamıştır. nNOS reaksiyonunun, sıçanlardan elde edilen penis dokusunda sinir pleksusları çevresinde olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3A). KS grubuna ait penis dokusunda sinir pleksusları çevresinde nNOS immün reaksiyonu incelendiğinde K grubuna kıyasla aktivasyon azalmıştır (Şekil 3B). KS+FA grubuna ait penis dokusunda nNOS immün reaksiyonu incelendiğinde KS grubuna göre artış gözlemlenmiştir (Şekil 3C). KS grubunda kaveolin-1 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla artmış; ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır.

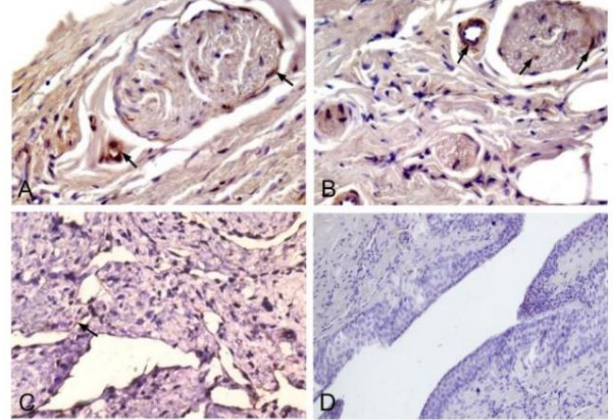
KS+FA grubundaki kaveolin-1 ekspresyonu KS grubuna kıyasla azalmış, bu azalma anlamlı bulunmamıştır.

Kaveolin-1 ekspresyonu penis dokusunda düz kas hücrelerinde gözlemlenmemiştir (Şekil 4A). KS grubuna ait penis dokusu düz kas hücrelerinde immün reaksiyonu incelendiğinde K grubuna kıyasla aktivasyonu artmıştır (Şekil 4B).

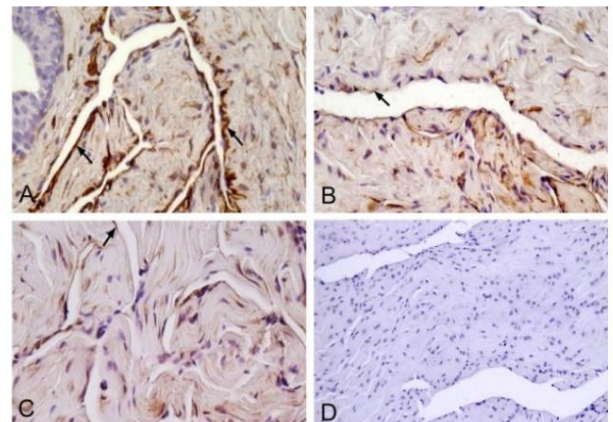
KS+FA grubuna ait penis dokusu düz kas hücreleri incelendiğinde kaveolin-1 ekspresyonuna azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4C).



Şekil 2: eNOS ile işaretlenen penis doku kesitleri: K grubunda trabeküler alanda endotel hücrede eNOS immün işaretlemesi (), (A); KS grubunda trabeküler alanda bulunan endotel hücrelerde eNOS aktivitesindeki azalma (), (B); KS+FA grubunda trabeküler alanda aktivitesi KS grubuna göre artmış (), (C); Kontrol grubunda eNOS negatif immün boyama (D), (eNOS immünohistokimyası, büyütme: X400).



Şekil 3: nNOS ile işaretlenen penis doku kesitleri: K grubunda sinir pleksuslarında nNOS immün işaretlemesi (), (A); KS grubunda nNOS aktivitesindeki K grubuna göre azalma (), (B); KS+FA nNOS immün aktivitesinde KS grubuna göre artma (), (C); Kontrol grubunda nNOS negatif immün boyama (D), (nNOS immünohistokimyası, büyütme: X400).



İbrahim SÖĞÜT ve Ark.

Şekil 4: Kaveolin-1 ile işaretlenen penil doku kesitleri: K grubunda düz kas hücrelerinde kaveolin-1 immun işaretleme (), (A); KS grubunda düz kas hücrelerinde kaveolin-1 immun aktivitesinde K grubuna göre azalma (), (B); KS+FA grubunda KS grubuna göre azalma (), (C); Kontrol grubunda kaveolin-1 negatif immun boyama (D), (kaveolin-1 immunhistokimyası, büyütme:X400).

3.3.Biyokimyasal Bulgular Sıçan testis örneklerinde K, KS ve KS+FA grupları arasındaki biyokimyasal parametrelerin değişimi incelendiğinde KS+FA grubuna ait dokuların SOD, KAT, GPx ve TAS düzeylerinin KS grubuna göre ise anlamlı derecede arttığı; KS+FA grubuna ait TOS ve OSI düzeylerinin KS grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (Tablo 1).

Tablo 1: Biyokimya ve immunohistokimya verilerinin karşılaştırılması

Parametreler	K Grubu	KS Grubu	KS+FA Grubu	p Değeri
SOD (ng/dL)	3,111±0,156	2,563±0,190	3,394±0,170 ^a	^a p<0.05 KS grubuna göre
KAT (ng/dL)	36,29±2,121	30,11±1,283	41,20±1,771 ^b	^b p<0.01 KS grubuna göre
GPx (ng/dL)	23,96±2,710	19,13±1,489	28,53±2,012 ^a	^a p<0.05 KS grubuna göre
TOS (µmol H ₂ O ₂ eq/L)	2,394±0,391	3,981±0,548	1,99±0,566 ^a	^a p<0.05 KS grubuna göre
TAS (mmol Trolox eq/L)	2,297±0,192	1,771±0,230	3,002±0,201 ^b	^b p<0.01 KS grubuna göre
OSI (keyfi birim) eNOS	0,11±0,02 ^a	0,265±0,06	0,06±0,018 ^a	^a p<0.05 KS grubuna göre
	2,167±0,16 ^a	1,333±0,21	1,833±0,307	^a p<0.05 KS grubuna göre
nNOS	2,50±0,223	2,0±0,258	2,167±0,307	İstatistiksel fark yok
Caveolin-1	2,333±0,21	2,50±0,223	2,167±0,307	İstatistiksel fark yok

a: *p<0,05, b: **p<0,01

4. Tartışma

Eretil disfonksiyon yeterli bir ereksiyonu sağlama ve sürdürmedeki persistan yetersizlik olarak tanımlanır [16]. Günümüzde ED ile ilgili yapılan çalışmalarda stresin ED üzerine olan göreceli etkileri araştırılmıştır [17]. Ereksiyon, psikolojik, hormonal, nöral sistemlerle vasküler ve kavernoza düz kas yapılarının birlikte çalışması ile meydana gelen kompleks ve dinamik bir mekanizmadır. Bu mekanizmaların herhangi bir aşamasında oluşacak bozukluk erektil disfonksiyon ile sonuçlanır. Bu olayın uzun yıllar anlaşılmasının sebebi, deneysel çalışmaları yapmadaki zorluklarından kaynaklanmıyordu.

Bir çalışmada, deneklere günde 1 saat sudan kaçınma modeli uygulayarak hem fizyolojik hem de psikolojik periferik CRH (kortikotropin salgılatıcı hormon) aracılığıyla kolon epitelinin permeabilitesini arttırdığı sonucuna varmışlardır [18]. Tron ve arkadaşları, kemirgenlerde sudan kaçınma modeli, hassas bağırsak sendromuna benzer aşırı visseral ağrıya sebep verdiğini ve bu modelin kronik fizyolojik stres modeli olduğunu ispatlamışlardır. Bu durum kronik stres visseral duyarlılığı arttırarak merkezi sinir sistemini de etkilediği için önemlidir [19].

Lee ve arkadaşları, dişi sıçanlara 10 gün boyunca sudan kaçınma modelini kullanmış bunun sonucunda yüksek kaygılı sıçanlarda kronik psikolojik stresin sürekli mesane hiperaljezi olmasına neden olduğunu ileri sürmüşlerdir [20]. Çalışmamızda, yaşamsal stresi yansıtmak üzere erkek sıçanlara on gün birer saat uygulanan kronik sudan kaçınma stresi, penis dokusunda hasar oluşturmuştur.

Ereksiyon mekanizmasında anatomik bakımından korpus kavernoza en önemli yapıyı meydana getirir. Korpus kavernoza başlıca düz kas lifleri, bağ dokusu, kan damarları ve trabeküler damarlardan oluşmuştur. Bağ dokusu ereksiyon sırasında sertliğin artmasına ve uzamasına izin verir ve detümesans sonrası olan gevşeme dönemine hızlıca geri dönmesi için gerekli direnci sağlar. Halbuki, düz kas lifleri, ereksiyon esnasında intrakavernöz basıncı arttırarak ereksiyonun devam etmesi için gevşemelidir. Bu mekanizma sadece vasküler mekanizma ile sağlanamaz. Bu durumda normal penis fonksiyonunu sağlamak için yeterli oranda düz kas ve bağ dokusu gerektiği görülmektedir.

Mersdorf ve arkadaşları yaşlı hastalarda ve vasküler rahatsızlığı olan hastalarda ekstrasellüler matriksin, kas endotel hücrelerinin azaldığını bildirmiştir [21]. Diğer çalışmalar, düz kas içeriğinin veno-okluzif

İbrahim SÖĞÜT ve Ark.

mekanizmayla fonksiyonel bir paralellik olduğunu bildirmişlerdir. Özbilen yaptığı çalışmada Tunika albuginea yapısındaki bozukluk ve kalınlığındaki azalmanın venoz yetmezliğe sebep olmadığını bildirmiştir [22].

Çalışmamızda Masson'un üçlü boyama bulguları incelendiğinde kronik stres grubuna ait bulgularda tunika albuginea kaba ve dağınık kollajen lif demetleri şeklinde gözlenmektedir. Bağ dokusu ve düz kas dağılımı incelendiğinde diğer gruplara göre farklılıklar

Kronik stres oluşturduğumuz grupta da saptandığı üzere korpus kavernozumun düz kas liflerinin göreceli kaybı ve bağ dokusunun artışı (penil fibrozis) ED'li hastalarda da bildirilmiş ortak bir bulgudur [22]. Penil fibrozis aynı zamanda yaşlanma, diabetes mellitus, kavernoze sinir hasarı ve androjen eksikliği ile ilişkilidir. İnsan ve sıçan korpus kavernozumları arasında morfolojik farklılıklar olmasına rağmen benzer biçimde bazı hastalıkların oluşumundaki penil fibrozis mekanizması açısından aynıdır.

NO'nun fizyolojik sistemlerde birçok işlevsel rollere sahip olduğu bilinmektedir. NO penil ereksiyonda vasküler ve nörolojik etkiye sahiptir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar erektil disfonksiyonun özellikle NO'nun fizyolojik etkilerinin aksamasından kaynaklı olduğunu göstermektedir. Nöronlar tarafından sentezlenen NO nörotransmitter olarak hareket ederken, damar içerisinde NO endotel hücre fonksiyonu ve düz kas hücre çoğalmasını inhibe etmektedir. Nitrik oksit guanilat siklaz enzimini aktive eder, böylece trabeküler düz kaslarda guanozin trifosfatın (GTP) guanozin monofosfata (cGMP) dönüşümüne yol açılır. Monofosfat düz kas gevşemesine neden olur. Bu nedenle GTP, cGMP dönüşümüne meydana gelecek herhangi bir değişiklik erektil disfonksiyona katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür [23].

ED ile ilgili yapılan çalışmalarda, penil ereksiyonda rol oynayan diğer faktörlerden düz kas ile ilgili yapılan araştırmalarda kaveolin-1 etkisi incelenmiştir [24]. Çalışmada, erektil disfonksiyonun oksidatif stres ile olan ilişkisini anlamak (vasküler ve nörolojik etkisini göstermek için) eNOS, nNOS ve ED' nin düz kas hasarı sebebi ilişkisini anlamak için ise kaveolin-1 seviyeleri belirlenmiştir. Bivalacqua ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada artmış oksidatif stres sonucu eNOS fonksiyonunun azalması ED'ye sebep olduğunu göstermişlerdir [25]. Seftel ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada eNOS'un vasküler kaynaklı hastalıkların patogenezinde ve endotel hücre ile düz kasların immünohistokimyasal lokalizasyonunda önemli bir düzenleyici rol oynadığını göstermişlerdir [26]. Penson ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada ED'ü olan hastalarda nNOS aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir [27].

Akingba ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada ED'de eNOS ve nNOS etkisinin aynı oranda azaldığını göstermişlerdir [22,28]. Hurdag ve arkadaşları, yaptığı çalışmada ED'ü olan hastalarda eNOS ve nNOS'un etkisinin azalmasının kavernoze mekanizmasında önemli rol oynadığını göstermişlerdir ve arkadaşları, tavşan korpus kavernozumunda asetilkolin uygulama sonrası yaşa bağlı gevşemenin azaldığını göstermişlerdir [30].

Bununla birlikte, penisde yaşlılarda ve gençlerde eşdeğer gevşemenin NO verilmesi ile sağlanabileceği gösterilmiştir. Haas ve arkadaşları, eNOS ifadesinin penis endotelin de upregüle edildiğini doğrulamıştır. Genç tavşanlar ve yaşlı tavşanlar kıyaslandığında eNOS'un telafi edici bir mekanizma olduğu anlaşılmıştır [30]. Araştırmamızda da eNOS ve nNOS'un aktivitesinin kronik strese maruz kalan grupta, K grubuna oranla azaldığı gözlemlenirken KS+FA grubunda kronik strese maruz kalan gruba göre azda olsa artış gözlemlenmiştir. Kaveolin-1 aktivitesi ise tam tersi etkiyle KS grubunda anlamsız artış göstermiştir. Kaveola plazma zarında bulunan özel organeldir ve çoğu hücrenin endositozu ile ilgilidir. eNOS ile kaveolin-1 arasında inhibitör ilişki olduğu kabul edilmektedir. eNOS kalsiyum-kalmodulin bağımlı çalışmaktadır, bu düzenleme eNOS homodimerizasyonu için önemlidir. eNOS'un böyle etkinleşmesi kaveolin-1 aktivitesini engellemektedir. Kalmodulin'in eNOS'a bağlanması ile hücre içi kalsiyum seviyesi düşmektedir [24].

Bugüne kadar elde edilen veriler, kaveolin'lerin NO sinyaline katkıda bulunduğunu, kas fonksiyonu ve endotel sağlığı için kaveolin'lerin önemli olduğunu bildirmektedir. Sağlıklı ereksiyon için penis dokusunda eNOS aktivitesinin kaveolin-1'e oranla daha fazla olması gerekmektedir [31]. Linder ve arkadaşları, kaveola'nin ereksiyona katkısı solubl guanil siklaz/cGMP sinyal platformları olarak hareket etmesi olduğunu ileri sürülmüştür [32].

Çalışmamızda uyguladığımız kaveolin-1'in istatistiksel olarak anlamsız yükselişi kaveolin-1'in aktivitesi hakkında daha fazla bilgi ihtiyacımızın olduğunu düşünmekteyiz. Bir çalışmada subklinik hipotiroidinin endotel disfonksiyona neden olduğu ateroskleroz gelişimine etkisi olacak şekilde lipid metabolizması üzerindeki olumsuz etkisi olduğu ortaya konulmuştur. Endotel bağımlı vazodilatasyon olan NO, LDL kolesterol'ün (LDL-C) oksidatif modifikasyonunu engeller [33]. Bu bilginin doğrultusunda çalışmamızda kaveolin-1'in aktivitesini anlayabilmek için yapılabilecek diğer çalışmalar ileri sürmekteyiz.

Stres koşulları sırasında oksidatif stres ortaya çıkabilmektedir. Oksidatif stres, vücut hücrelerin çok fazla düzeyde moleküler oksijen veya reaktif oksijen türlerine (ROS) maruz kalması anlamına gelmektedir. Oksidatif stresin etkisinden korunmak için bazı enzim

İbrahim SÖĞÜT ve Ark.

sistemleri vardır ve bunlar süperoksitler ile diğer ROS'ları uzaklaştırmaktadır. Bunların en önemlileri, süperoksit dismutaz (SOD; bu enzim süperoksit anyonunun ($\cdot\text{O}_2^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürür), katalaz (KAT; H_2O_2 'nin moleküler oksijene ve suya (H_2O) ve glutatyon peroksidaz (GPx; hidrojen peroksiti suya dönüştürür) 'dır [34]. Bizim çalışmamızda da kronik stres oluşturulan grubun SOD, KAT, GPx ve TAS düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir. Fulvik asit yapısında içerdiği aktif karbon ve bol miktardaki oksijen molekülü nedeniyle güçlü antioksidan özelliği taşır. Bu özelliği sayesinde fulvik asit etkisini, dokuda oluşan serbest radikalleri nötralize ederek gösterir [35].

KS+FA grubun ise SOD, KAT, GPx ve TAS düzeylerinde KS grubuna kıyasla arttığı gözlemlendi. TOS ve OSI seviyeleri ise antioksidan parametrelerini destekler şekilde KS grubunda artmış KS+FA grubunda ise azalmıştır. Bizim sonuçlarımıza paralel olarak daha önce yapılan bir çalışmada, sudan kaçınma stresi sonucunda lipid peroksidazın son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyelerinde artma, antioksidanlardan glutatyon seviyesinde ise azalma bulmuşlardır [36]. Stres sonucu, FA tedavisinin nötrofillerden salınan oksidanların üretimini azalttığı anlaşılmıştır [14]. FA serbest radikal hasarı ile mücadelede önemli bir başarı göstermektedir, özellikle süperoksit dismutaz enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırmaktadır [14]. Schneider ve arkadaşları yaptıkları çalışmada FA 'in ölümcül kanser ve tümörlerin tedavisinde ilerlemeyi durdurduğunu belirtmiştir.

MacCarthy yaptığı çalışmada FA'in hücrelerde antioksidan gibi davranarak serbest radikallerin olumsuz etkilerini yok ederek hastalık önlenmesinde etkili olduğunu belirtmiştir [37]. Bunlara ek olarak, oksidatif stresin hipertansiyon, diyabet ve infertilite gibi pek çok hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir [38].

5. Sonuç

Çalışmamızın sonucunda kronik sudan kaçınma stresinin testis dokusunun antioksidan savunma sistemini zayıflattığı ve dokuda hem histolojik hem de biyokimyasal hasara neden olduğu tespit edilmiştir.

Dışarıdan alınan güçlü bir antioksidan olan fulvik asit desteği ile dokudaki antioksidan-oksidan dengesi kurularak oksidatif stresin olumsuz etkilerinin engellendiği görülmüştür. Buna göre fulvik asitin psikolojik strese bağlı infertilite durumlarında stres kaynaklı penis dokusunda hasarın azaltılmasında destekleyici bir ajan olarak kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

6. Teşekkürler

Çalışmamız İstanbul Bilim Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (İBAPKO Karar No: 2016-01-17) tarafından desteklenmiştir.

7. Kaynaklar 1.

Khademi A, Alleyassini A, Amini M, Ghaemi M. İnfertil çiftlerde cinsel işlev bozukluğu prevalansının değerlendirilmesi. J Seks Med. 2008;5(6):1402-10.

- Saleh RA, Ranga GM, Raina R, Nelson DR, Agarwal A. Kısırlık değerlendirmesi yapılan erkeklerde cinsel işlev bozukluğu: kohort gözlemsel bir çalışma. Fertil Steril. 2003;79(4):909-12.
- LH'yi yakar. Cinsel danışmanlık ve kısırlık. İçinde: Covington SH BLH, editör. Kısırlık danışmanlığı klinisyenler için kapsamlı bir el kitabı. New York: Parthenon Yayıncılık; 2006.s. 212-36.
- Rees PM, Fowler CJ, Maas CP. Nörolojik bozukluğu olan kadın ve erkeklerde cinsel işlev. Lancet. 2007;369(9560):512-25.
- Tsigos C, Kyrou I, Kassi E, Chrousos GP. Stres, Endokrin Fizyoloji ve Patofizyoloji. 2000.
- Grigoriadis DE, Heroux JA, De Souza EB. Merkezi sinir, endokrin ve bağışıklık sistemlerinde kortikotropin salınan faktör reseptörlerinin karakterizasyonu ve düzenlenmesi. Ciba Bulundu Symp. 1993;172:85-101
- Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Nitrik oksit ve penis erektil fonksiyon. Eczacılık Ter. 2005;106(2):233-66.
- Oluk JM. Doku hasarının biyobelirteçleri olarak lipid peroksidasyonu ve antioksidanlar. Klinik Kimya 1995;41:1819-28.
- Lewis RW, Fugl-Meyer KS, Crown G, Hayes RD, Moreira ED, Jr, al. Laumann EO, ve Tanımlar/epidemioloji/cinsel işlev bozukluğu için risk faktörleri. J Seks Med. 2010;7:1598-607.
- Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. İnmede oksidatif stresin potansiyel belirteçleri. Serbest Radik Biol Med. 2005;39(7):841-52.
- Wang W, Yang H, Wang X, Jiang J, Zhu W. Fulvik asit ve hümk asidin içme suyunda alüminyum türleşmesi üzerindeki etkileri. J Environ Sci (Çin). 2010;22(2):211-7.
- Zhang XF, Yang G, Dong Y, Zhao YQ, Sun XR, Chen L, et al. Spektroskopik analiz ile fulvik asidin transferrin ile bağlanması üzerine çalışmalar. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2015;137:1280-5.
- Chiou CT Noniyonik organik bileşiklerin toprak organik maddesi tarafından alınmasına ilişkin teorik değerlendirmeler. İçinde: Sawhney BL BK, editör. Organik kimyasalların topraktaki reaksiyonları ve hareketi. Madison,W: Amerika Toprak Bilimi Derneği; 1989. s. 1-29. 14. van Rensburg CE. Humik Maddelerin Antienflamatuar Özellikleri: Mini Bir İnceleme. Fitoterapi Arş. 2015;29(6):791-5.
- Dong L, Cordova-Kreylos AL, Yang J, Yuan H, Scow KM. Hümk asitler, ürenin toprak amonyak oksitleyicileri ve potansiyel nitrifikasyon üzerindeki etkilerini tamponlar. Toprak Biol Biyokim. 2009;41(8):1612-21.
- [PMC ücretsiz makale] [PubMed] 16. Wespes E, Amar E, Hatzichristou D, Montorsi F, Pryor J, Vardi Y. Eretil disfonksiyonla ilgili kılavuzlar. Boğazımız. 2002;41(1):1-5.
- Saenz de Tejada I, Angulo J, Celtek S, Gonzalez-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, et al. Eretil disfonksiyonun patofizyolojisi. J Seks Med. 2005;2(1):26-3
- Saunders PR, Santos J, Hanssen NP, Yates D, Groot JA, Perdue MH. Siçanlarda fiziksel ve psikolojik stres, periferik CRH yoluyla kolonik epitelyal geçirgenliği artırır. Dig Dis Sci. 2002;47(1):208-15.
- Tran L, Chaloner A, Sawalha AH, Greenwood Van Meerveld B. Kronik sudan kaçınma stresinin neden olduğu visseral ağrıda epigenetik mekanizmaların önemi. Psikonöroendokrinoloji. 2013;38(6):898-906.
- Lee UJ, Ackerman AL, Wu A, Zhang R, Leung J, Bradesi S, et al. Yüksek kaygılı siçanlarda kronik psikolojik stres, sürekli mesane hiperaljesisine neden olur. Fizyolojik Davranış 2015;139:541-8.
- Mersdorf A, Goldsmith PC, Diederichs W, Padula CA, Lue TF, Fishman JJ, et al. İktidarsız penis dokusunda ultrastrüktürel değişiklikler: 65 hastanın karşılaştırılması. J Urol. 1991;145(4):749-58.
- Ozbilen O. Siçanlarda Medikal ve Cerrahi Kastrasyon Sonrası Penis Kavernöz Doku ve Tunika Albugineaada Gelişen Histopatolojik Değişiklikler ve Eretil Disfonksiyon Mekanizmasındaki Rolü. Adana2008.
- Bakırcıoğlu ME, Sievert KD, Nunes L, Lau A, Lin CS, Lue TF. Azalmış trabeküler düz kas ve caveolin-1

İbrahim SÖĞÜT ve Ark.

- yaşlı sıçanların penis dokusunda ifade. J Urol. 2001;166(2):734-8.
24. Becher EF, Toblli JE, Castronuovo C, Nolzco C, Rosenfeld C, Grosman H, et al. Sildenafil sitrat ile tedaviden sonra denerve bir hayvan modelinde penil kavernoza dokuda caveolin-1'in ifadesi. J Seks Med. 2009;6(6):1587-93.
25. Bivalacqua TJ, Musicki B, Hsu LL, Berkowitz DE, Champion HC, Burnett AL. Orak hücreli fare penisinde sildenafil sitratla restore edilmiş eNOS ve PDE5 düzenlemesi, oksidatif/nitrozatif stresin kontrolü yoluyla priapizmi önler. PLoS Bir. 2013;8(7):e68028.
26. Seftel AD, Saenz de Tejada I, Szetela B, Cole J, Goldstein I. Klozapin ilişkili priapizm: Bir olgu sunumu. J Urol. 1992;147(1):146-8.
27. Penson DF, Armstrong AJ, Concepcion R, Agarwal N, Olsson C, Karsh L, et al. Kastrasyona Dirençli Prostat Kanserinde Enzalutamide Karşı Bicalutamide: STRIVE Denemesi. J Clin Oncol. 2016;34(18):2098-106.
28. Akingba AG, Burnett AL. Alloksan kaynaklı diyabetik sıçanın penisinde endotel nitrik oksit sentaz protein ekspresyonu, lokalizasyonu ve aktivitesi. Mol Urol. 2001;5(4):189-97.
29. Hurdağ C, Özkara H, Çitçi S, Uyaner İ, Demirci C. Streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda alfa-lipoik asidin nitrik oksit sentetaz dispersiyonu in penil function üzerindeki etkileri. Int J Doku Reaksiyonu. 2005;27(3):145-50.
- [PubMed] 30. Haas CA, Seftel AD, Razmjouei K, Ganz MB, Hampel N, Ferguson K. Yaşlanmada erektil disfonksiyon: upregülasyon endotel nitrik oksit sentez. Üroloji. 1998;51(3):516-22.
31. Behrendt D, Ganz P. Endotelial fonksiyon. Vasküler biyolojiden klinik uygulamalara. Ben J Cardiol. 2002;90:40.
32. Linder AE, McCluskey LP, Cole KR, 3., Lanning KM, Webb RC. Sıçan aortunda nitrik oksit akış aşağı sinyali moleküllerinin endotel caveolin-1 ile dinamik ilişkisi. J Pharmacol Uzm. 2005;314(1):9-15.
33. Esertas K. Subklinik Hipotiroidili Olgularda Simvastatin ve Levotiroksin Replasman Tedavisinin Endotel Disfonksiyonu Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. İstanbul2004.
34. Beckman JS, Koppenol WH. Nitrik oksit, süperoksit ve peroksinitrit: iyi, kötü ve çirkin. Ben J Physiol. 1996;271:1424-37.
35. Rodriguez NC, Urrutia EC, Gertrudis BH, Chaverri JP, Mejia GB. Fülvik asidin antioksidan aktivitesi: Canlı maddeden türetilen bir biyoaktif bileşik. J Gıda Tarım Çevre. 2011;9(3-4):123-7.
36. Ak E C-DE, Sehirli AO, Tetik S, Pisiriciler R, Sener G, Cetinel S. Sudan kaçınma stresi uygulanmış erkek sıçan mesanesinde oksitosin etkisi: Işık ve elektron mikroskopik inceleme. Marmara Pharmaceutical Journal. 2015;19:19-26.
37. MacCarthy P PM, Malcolm RL, Thurman EM. . Hüyük maddelerin hidrofobik bir reçineden ph gradyan desorpsiyonu ile ayrılması. Anal Kimya 1979;51(12):2041-3.
38. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Erkek kısırlığının tedavisinde antioksidanların rolü. Int J Urol. 2009;16(5):449-57.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Alıntı-Gayriticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

