

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı

**RAT HİPERHOMOSİSTEİNEMİ MODELİNDE
KAVERNOZAL DİSFONKSİYONUN ANTİOKSİDAN
SİSTEM VE NİTRİK OKSİT SENTAZ İZOENZİMLERİ
İLE İLİŞKİSİ**

Dr. TAYLAN OKSAY

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Alim KOŞAR

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 1142-TU-05
proje numarası ile desteklenmiştir.**

2006 - ISPARTA

TEZ KABUL ve ONAY
Tıp Fakültesi Dekanlığı'na
ISPARTA

Süleyman Demirel Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı Başkanlığı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “Uzmanlık Tezi” olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/05/2006

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Alim KOŞAR, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Üye: Prof. Dr. Alim KOŞAR, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Üye: Prof. Dr. Tekin Ahmet SEREL, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Üye: Prof. Dr. Tuğrul SEZER, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Üye: Doç. Dr. Hakkı PERK, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Üye: Doç. Dr. Sadık ÖZMEN, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ÖNSÖZ

Uzmanlık tezimin hazırlanması sürecinde ve üroloji eğitimimde katkılarını esirgememiş olan sayın hocam Prof. Dr. Alim KOŞAR'a

Üroloji ihtisasım boyunca destekleriyle her zaman yanımda olan ve eğitimimde katkılarından dolayı kliniğimizin değerli hocaları Prof. Dr. Tekin Ahmet SEREL'e, Doç.Dr. Hakkı PERK'e, Yrd. Doç. Sedat SOYUPEK'e, Yrd. Doç.Dr. Abdullah ARMAĞAN'a,

Kliniğimizde çalışmaktan mutluluk duyduğum araştırma görevlisi ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Sabır ve desteklerinden dolayı sevgili eşim Aygen, oğlum Kaan Demir ve diğer tüm aile fertlerime,

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGE VE KISALTMALAR	iv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erektile Disfonksiyon	3
2.2. Penis Anatomisi	4
2.2.1. Penisin Arterleri	6
2.2.2. Penisin Venleri	7
2.2.3. Penisin Sınırları	8
2.3. Ereksiyon ve Detümesans Hemodinamisi ve Mekanizması	9
2.4. Periferale Nörofizyolojisi ve Nörotransmitterler	10
2.5. Homosistein ve Hiperhomosisteinemi	13
2.5.1. Homosistein	13
2.5.2. Hiperhomosisteinemi	14
3. MATERYAL VE METOD	16
3.1. MATERYAL	16
3.1.1. Deney Hayvanları	16
3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler	17
3.1.3. Kimyasal Maddeler	17
3.1.4. SDS-PAGE ve Western-Blot İçin Kullanılan Çözeltiler	19
3.2. METOD	21
3.2.1. Hiperhomosisteinemi Oluşturulması	21
3.2.2. Homojenizasyon	21
3.2.3. Süperoksitle Dismutaz Aktivitesi Ölçümü	21
3.2.5. SDS-PAGE Yöntemi	23
3.2.6. Western Blot Yöntemi	23
3.2.7. Plazma Homosistein Düzeyinin Tespiti	24
3.3. İstatistiksel Analiz	24
4. BULGULAR	25
4.1. Grupların Kan Hcy Değerlerinin Karşılaştırılması	26
4.2. Grupların Doku Antioksidan Düzeylerinin Karşılaştırılması	26
4.3. Grupların eNOS ve nNOS Seviyelerinin Karşılaştırılması	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	29
5.1. Antioksidan Sistem ve Vasküler Oksidatif Stres	29
5.2. Hiperhomosisteinemi ve Penil NOS İzoenzim Düzeyleri	33
ÖZET	35
SUMMARY	36
KAYNAKLAR	37

SİMGE VE KISALTMALAR

ED	: Erektıl Disfonksiyon
eNOS	: Endoteliyal NOS
gr	: Gram
GSH – Px	: Glutatyon Peroksidaz
GSH	: Glutatyon
Hcy	: Homosistein
HHcy	: Hiperhomosisteinemi
iNOS	: Uyarılabilir (inducible) NOS
KK	: Korpus Kavernosum
Kg	: Kilogram
KVH	: Kardiyovasküler Hastalık
L (l)	: Litre
NANC	: Nonadrenerjik/nonkolinerjik
nNOS	: Nöronal NOS
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
PDE	: Fosfodiesteraz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
tHcy	: Total Homosistein

1. GİRİŞ

Seksüel ilişki için yeterli penis ereksiyonunu sağlayamama ve/veya sürdürmede yetersizlik olarak tanımlanan erektil disfonksiyonun, günümüzde dünya üzerinde 150 milyondan fazla erkeği etkilediği ve önümüzdeki 25 yılda bu oranın iki kattan fazla artacağı tahmin edilmektedir (1). Bu kadar fazla insanı ilgilendiren erektil disfonksiyonun patogenezi ve farmakolojisiyle ilgili bilgiler özellikle 1998'de sildenafil sitratın keşfiyle dramatik olarak ilerlemiştir. Bu yeni 'etkili oral tedavi çağında', artmış sayıda hasta tedavi görmeyi ister hale gelmiştir.

Oral tedavinin ispat edilmiş etkinliğinin yanında, hastaların çok az bir kısmı konvensiyonel tedaviden yarar görmemektedir. Bu etkin tedavinin yanında, erektil disfonksiyonun uzun vadeli tedavi stratejileri konusuna çok az önem verilmiştir. Mevcut erektil disfonksiyon (ED) tedavileri endojen santral veya periferik nörovasküler yolların güçlendirilmesi şeklinde sağlanmaktadır (örneğin; apomorfin ve sildenafil). Günümüzde çalışmalar daha çok altta yatan patofizyolojinin durdurulması veya geri çevrilmesini amaçlayan tedaviler üzerine yoğunlaşmıştır.

Son yıllarda, ileri kardiyovasküler hastalığı (KVH) olan hastalarda ED geliştiği kabul görmüştür. Bununla birlikte, yapılan çalışmaların sonuçları ED'nin sistemik aterosklerozun bir erken belirtisi olabileceği ve diğer organlarda klinik olarak önemli vasküler hastalıklardan önce oluşabileceğini düşündürmektedir. MMAS (Massachusetts Erkeklerde Yaşlanma Çalışması) verilerine göre Miyokard infarktüsü ile başvuran hastaların %64'ünde kalp problemlerinden önce ED mevcuttu (2). Yine bir başka çalışmada benzer şekilde koroner bypass cerrahisi uygulanan hastaların %57'si cerrahi öncesi ED rapor etmişlerdir (3). Bu çalışmalarda göstermektedir ki kardiyovasküler hastalıklar ve ED arasında yakın ilişki mevcuttur.

Mevcut klinik çalışmalar kardiyovasküler hastalıklar için bilinen bazı risk faktörlerinin (örn. diabetes mellitus, dislipidemi, sigara) aynı zamanda ED içinde geçerli olduğunu göstermektedir (2, 4-7). Chung ve ark. ED' si olan hastalarda yaptığı penil doppler çalışmasında, bu hastaların penil damar yataklarının vazodilatasyon kabiliyetinin kardiyovasküler risk faktörleri ile ters ilişkisi olduğunu göstermiştir (8). Kawanishi ve ark. ED'si ve anormal penil Doppler ultrasonografi

olan erkeklerin iskemik kalp hastalığı için artmış riskleri olduğunu göstermiştir (9) Endotelial disfonksiyon, bahsedilen kardiyovasküler risk faktörleri için ortak paydayı oluşturmaktadır ve ED ile aralarındaki ilişki açısından çok önemli olduğu düşünülmektedir (2, 4-7).

Yüksek kan homosistein (Hcy) değerleri erken ateroskleroz ve KVH için bağımsız risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (10,11). Hiperhomosisteinemi (HHcy) endotelial disfonksiyon, vasküler dokulardaki NO-aracılı relaksasyonda ve arterlerdeki NO-aracılı vazodilatasyondaki bozulmayla ilişkilidir (12,13). Rat ve maymunda diyet aracılı HHcy modelleri yayınlanmıştır ve bu yayınlarda da benzer şekilde endotel bağımlı vasküler düz kas relaksasyonunda bozulma belirtilmiştir (14,15). Hcy anjiopatik etkisini esas olarak süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksidi (H_2O_2) içeren reaktif oksijen türlerinin oluşturulmasıyla yapmaktadır (11,12,16). O_2^- vazokonstrüksiyona neden olur ve NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturur. Bu reaksiyon vasküler dokuda endotelial NO'nun mevcudiyetini azaltır (17).

Hiperhomosisteineminin korpus kavernosum (KK) düz kasında da benzer etkilerinin olduğu, dolayısıyla HHcy'nin ED için ek bir vasküler risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (7, 18, 19). Khan ve ark. yaptığı çalışmada tavşan korpus kavernosum doku şeritinde Hcy'nin direkt etkisi gösterilmiştir. Homosisteinin kavernosal gevşemeyi azalttığı ve bu etkinin bakır ile artırılıp süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) ile azaltıldığı saptanmıştır (18). Jones ve ark., yine organ banyosu tekniği ile yaptıkları çalışmada HHcy oluşturulmuş tavşan korpus kavernosumunda, endotelial kaynaklı relaksasyonda ve NO oluşumunda inhibisyon oluştuğunu, bu etkinin de serbest oksijen radikalleri aracılığıyla oluştuğunu belirtmişlerdir (19).

Bu çalışmada, hafif ve orta düzeyde hiperhomosisteinemi oluşturulmuş ratların korpus kavernosum dokusundaki antioksidan düzeylerindeki değişiklikleri ve bunun NOS izoenzim düzeyleri üzerine olan etkisini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eretil Disfonksiyon

Doksanlı yıllara kadar libido, orgazm ve ejakülasyon bozukluklarını kapsayan erkek seksüel disfonksiyonu, empotans terimi ile karşılanmaktaydı. Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (INH) 1992 tarihindeki konsensüs toplantısında alınan kararlar empotans teriminin yerini eretil disfonksiyon (ED) almıştır. Aynı bildirimde, eretil disfonksiyon, bir erkeğin en az 6 ay süreyle seksüel ilişki için yeterli penis ereksiyonunu sağlayamama ve/veya sürdürmede yetersizlik olarak tanımlanmıştır (20).

ED ile ilgili ilk kapsamlı epidemiyolojik çalışma 1948' de Kinsey ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmada, 15,781 deneğin anket sonucunda ED prevalansı, 40 yaşında %1.9, 65 yaş üzerinde %25 olarak bulunmuştur (21). Massachusetts Erkeklerde Yaşlanma Çalışması'nda (MMAS) 40-70 yaş arası 1,211 erkekte ED oranı %52 olarak saptanmıştır. Bu erkeklerin %9.6'si hafif, %22.2 orta ve %17.2'u tam ereksiyon kaybından yakınmaktaydı. Hafif derecede ED prevalansı 40 yaşından 70 yaşına doğru sabit kalmasına rağmen, orta derecede ED iki katına, tam ED oranı 3 katına çıkmıştır (2).

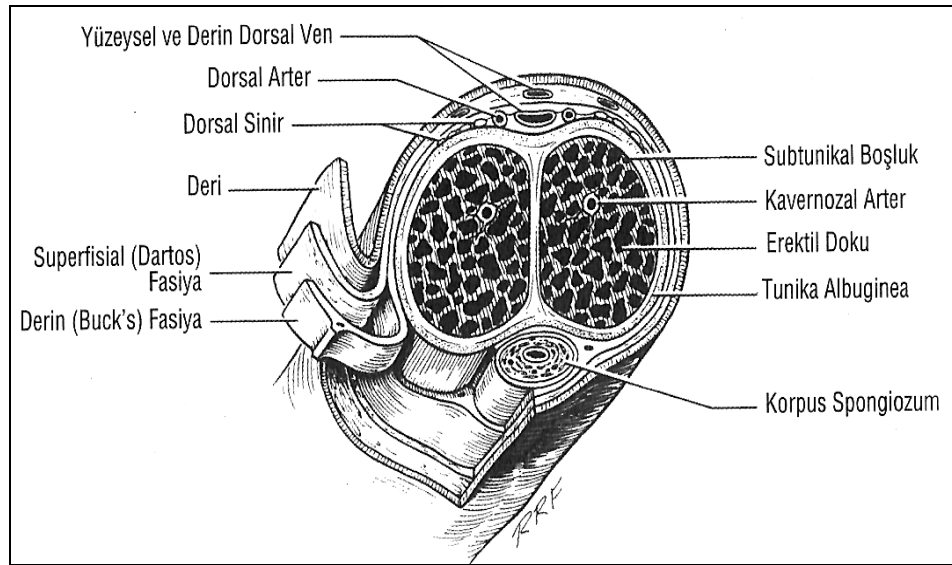
Ülkemizde 1982 erkekte yapılan bir çalışmada ED' nin tüm derecelerinin prevalansı %69.2 olarak saptanmıştır. Tam ereksiyon kaybı prevalansı 40-49 yaşta %49.9, 70 ve üzeri yaşlarda % 94.7 bulunmuştur. ED prevalansının ve şiddetinin yaşla birlikte arttığı, ayrıca orta ve tam ED'nin birleşik prevalansının da yaşın artmasıyla belirgin bir şekilde yükseldiği gösterilmiştir (22).

ED' nin dünya çapında 150 milyondan fazla erkeği etkilediği tahmin edilmekte ve önümüzdeki 25 yılda bu sayının iki kattan fazla artması beklenmektedir (1).

2.2. Penis Anatomisi

Penis, bir çift kavernoöz cisim ve bir adet spongioz cisimden oluşur. Penisin tabakaları dıştan içe şu şekilde sıralanır (Şekil-1) (23):

- 1 -Deri
- 2-Süperfisiyal. tabaka (Dartos tabakası)
- 3-Tela Subfasiyalis (Eberth tabakası)
- 4-Buck Fasiyası
- 5-Tunika Albuginea



Şekil 1: Penisin kesitsel anatomisi

Penis shaftının derisi, bez ve kıl yapısı içermez ve çok elastik yapıdadır. Bu deri yapısı yağdan yoksundur ve deri altı Dartos tabakasının, Buck tabakası ile zayıf bağlantısı nedeniyle hareketli yapıdadır. Penis derisinin damarları erektil yapılardan ayrı olarak, femoral arterin eksternal pudental dalından köken alırlar. Bu damarlar penis kökünde penise girer; Dartos tabakasında longitudinal olarak uzanır ve kendi arasında sık anastomozlar yaparlar. Glansın üzerindeki deri ise, altındaki tunikaya sıkıca bağlı olması nedeniyle immobildir. Buck fasiyası dorsalde her iki korpus kavernozumunu çevrelerken, ventralde lifleri bölünerek korpus spongiozumunu da çevreler. Daha derinde ise, Buck fasiyası perinede tunika albuginea ile birleşir ve erektil dokunun kas yapısına kadar uzanır. Distalde ise koronada glans penisin tabanı

ile birleşir. Korpus kavernozumlarından oluşan yırtılmaların çoğunda kan Buck fasiyası ile sınırlanır ve ekimoz penis shaftında lokalize olur (24).

Tunika Albuginea penise büyük fleksibilite, sertlik ve güç sağlar (24). Korpus kavernosumlarının tunikal örtüsü çok sayıda alt tabakadan oluşan iki tabakalı bir yapıdır, iç tabakanın demetleri sirküler olarak kavernöz dokuyu sarar ve destekler, iç tabakadan septuma uzanan intrakavernozal bantlar erektil dokuya asıl desteği sağlayan septumu güçlendirir. Dış tabakanın demetleri longitudinal seyrederek, glans penisten proksimal kruraya doğru uzanır, inferior ramus pubise yapışırlar, ancak saat 5 ve 7 hizasında yokturlar. Korpus spongiosum ise dış tabaka ya da septalardan yoksundur, böylece ereksiyon sırasında düşük basınçlı bir yapı oluşturur.

Tunika kollajen liflerinin tutunduğu, düzensiz kafese benzer bir yapı oluşturan elastik liflerden oluşur. Emitter venler iç ve dış tabakalar arasında kısa bir mesafe seyrederek, daha sonra sıklıkla dış tabaka liflerini oblik olarak delerler. Bununla birlikte, korpus kavernosuma ilave kan akımı sağlayan kavernöz arter ve dorsal arterin dalları daha düz bir yol izler ve periarteriyel yumuşak doku kılıfı ile çevrilidirler. Bu kılıf ereksiyon sırasında arterlerin tunika albuginea tarafından sıkıştırılmasını önler. Dış tunika tabakası ereksiyon sırasında emitter venlerin sıkıştırılmasında ilave bir rol oynar gibi gözükmektedir. Büyük oranda tunika kalınlığının değişkenliğini ve gücünü belirleyen de bu tabakadır (25).

Korpus kavernosumlar tunika albugineadan oluşan kalın kılıf ile sarılı, bir çift süngersi silindirden oluşmuştur. Proksimal uçları, kruralar, iskion-pubis kollarının alt yüzeyinden köken alan iki ayrı yapı halindedir, ancak pubik arkusun altında birleşerek glansa kadar yapışık olarak devam ederler.

Korpus kavernosumlar tunika albuginea, septum, intrakavernöz septalar, intrakavernöz fibröz çatı, periarteriyel ve perinöral fibröz kılıflar tarafından desteklenir (25, 26). Tunikanın içinde elastik fibriller, kollajen ve gevşek bağ dokusu ile çevrili düz kas trabekülaları ile ayrılmış birbiri ile iştirak eden sinusoidler vardır. Terminal kavernöz sinirler ve helisin arterler düz kasla yakın ilişkilidir. Her korpus kavernosum merkezde geniş, periferde daha küçük olan sinusoidlerden oluşmuştur. Flask durumunda, kan yavaşça merkezden periferal sinusoidlere geçer ve kan gazları seviyeleri venöz kanla aynıdır. Ereksiyon sırasında, arteriyel kanın hem merkezi hem periferal sinusoidlere hızla girişi, intrakavernöz kan gazları seviyelerini arteriyel kan

seviyesine değiştirir. Korpus spongiosum ve glansın yapısı korpus kavernosumlara benzer, ancak sinusoidler daha geniştir, spongiosumda tunika daha incedir ve glansta tunikal tabaka bulunmaz (24).

2.2.1. Penisin Arterleri

Penise başlıca kan akımı genellikle internal iliak arterin bir dalı olan internal pudental arter yolu ile olur (şekil 2) (24). Bununla birlikte, birçok olguda, eksternal iliak, obturator, vezikal ve femoral arterlerden aksesuar arterler gelebilir (27). Bu aksesuar arterlere radikal prostatektomi ya da sistektomi sırasında verilen hasar cerrahi sonrası vasküler ED' ye sebep olabilir (28,29).

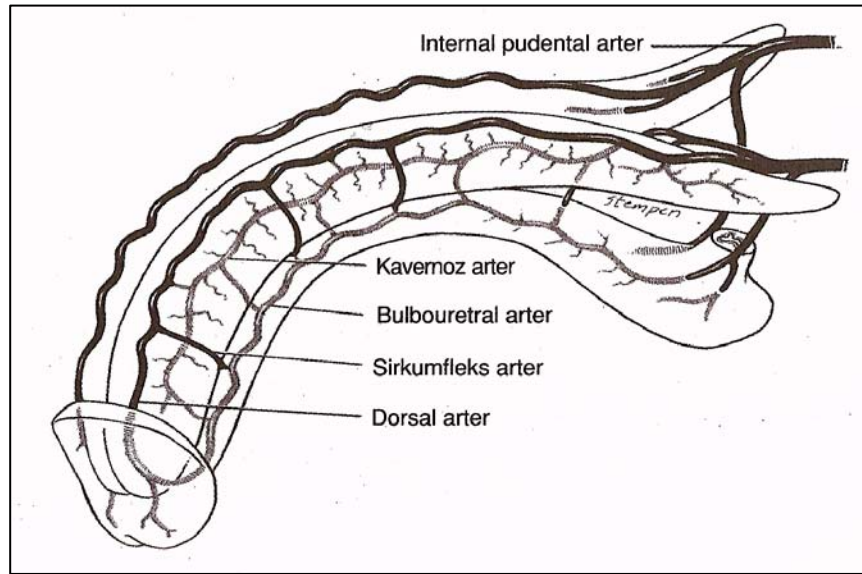
İnternal pudental arter; sakrospinal ligaman altından ve sakrotuberoz ligamanın üstünden geçtikten sonra perineal ve penil arter dallarına ayrılır. Penil arter, Alcock kanalında seyrettikten sonra, perineal membranın üzerinde erektil yapıları besleyen üç dala ayrılır (şekil 2).

Bulbouretral arter; perineal membranı delerek korpus spongiozuma posterolateral kenardan girer. Üretra, korpus spongiozum ve glansı besler.

Kavernozal arterler; korpus kavernoza penis hilumu bölgesinde girerek, erektil dokunun ortasında ilerler. Seyri esnasında heliksin arterlere ayrılarak, sinüzoidleri ve trabeküler dokuyu beslerler.

Dorsal arter; pubis ile penisin krusları arasından geçerek, korpus kavernozumların dorsaline ulaşır. Buck fasiyası içinde dorsal penil ven ve sinir ile birlikte seyrederek. Dorsal arterin glansa kadar olan seyrinde, korpus spongiozum ve üretraya giden sirkumfleks dalları ve kavernoza dalları verir.

Penisin arteriyel yapısı yüksek oranda varyasyon göstermektedir. Penil arter aksesuar olarak pudental arterin daha proksimalinden, obturator veya inferior vezikal arterden de köken alabilir. Bu durumlarda, penil arterler prostatın içinden veya anterolateralinde seyrederek penise ulaşır. Walsh ve arkadaşları, radikal prostatektomi yaptıkları hastalarda %4 oranında bu varyasyonu tespit etmiş ve postoperatif dönemde gelişen erektil disfonksiyonun bu durumdan kaynaklanabileceğini belirtmiştir (30).



Şekil 2: Penisin arteriyel anatomisi

2.2.2. Penisin Venleri

Üç korpusun venöz drenajı hemen tunika albugineanın altındaki periferik sinusoidlerden kaynaklanan ince venüllerden başlar. Bu venüller tunika ve periferik sinusoidlerin arasındaki trabekülalar içinde seyrederek ve emisser venler olarak çıkmadan önce subtunikal venöz pleksusu yaparlar. Penisin bölümlerine göre venöz dolaşım şu şekilde oluşur:

Birçok yüzeysel ven ciltaltında seyrederek ve penis köküne yakınlaşınca birleşerek tek (veya çift) yüzeysel dorsal veni yapar, daha sonra safen venlere dökülür.

Korpus kavernosumun ve spongiosumun emisser venleri dorsalde derin dorsal, lateralde sirkumfleks ve ventralde periüretral venlere dökülür. Derin dorsal ven koronal sulkustan başlayarak, glans penisin, korpus spongiosumun ve korpus kavernosumların distal üçte ikisinin venöz drenajını sağlar. Genellikle tek, nadiren birden fazla derin dorsal ven, periprostatik venöz pleksusa dökülmek üzere simfizis pubis arkasından yukarı doğru seyrederek.

Proksimal korpus kavernosumları drene eden emisser venler kavernoza ve krural venleri oluşturmak üzere birleşirler. Bu venler bulböz üretradan gelen periüretral venlerle birleşerek internal pudental veni oluştururlar (24).

2.2.3. Penisin Sinirleri

Hayvan deneyleri seksüel fonksiyon ve penil ereksiyonda medial preoptik alan (MPOA), hipotalamusun paraventriküler nükleusu (PVN) ve hipokampusun önemli merkezler olduğunu; bu merkezlerin uyarılmasının ereksiyonu başlattığını bu bölgelerdeki lezyonların ise kopulasyonu zorlaştırdığını göstermiştir (31). Hipotalamusta dopamin, norepinefrin, serotonin (5-hidroksitriptamin (5-HT)) gibi çeşitli nörotransmitterler belirlenmiştir. Dopaminerjik ve adrenerjik resertörlerin seksüel fonksiyonu uyardığı, 5-HT resöptörlerini inhibe ettiği öne sürülmüştür (32).

Penisin inervasyonu hem otonomik, hem de somatiktir. Spinal kord ve periferik ganglionlardan köken alan sempatik ve parasempatik lifler, kavernoza sinir aracılığı ile korpus kavernoza ve korpus spongiozuma ulaşırlar. Somatik sinirler ise bulbokavernoza ve iskiokavernoza kasları innerve ederler ve penil duyuyu iletirler (24).

Sempatik sinir lifleri medulla spinalisin alt torasik ve üst lomber bölgesinden çıktıktan sonra retroperitoneal olarak seyrederek. Bu lifler aortik bifürkasyonun altında yoğunlaşarak, superior hipogastrik pleksusu (Presakral sinir) oluşturur. Süperior hipogastrik pleksusu sol ve sağ hipogastrik sinir şeklinde terkeden sempatik lifler, distale doğru ilerleyerek birleşir ve rektumun yan kenarlarında inferior hipogastrik pleksusu (pelvik pleksus) oluştururlar.

Pelvik pleksus gövdesi S2 ve S4 spinal kordda olan parasempatik nöronlardan da lifler alır. Bu lifler pelvik sinir olarak adlandırılır (33). Pelvik pleksustan çıkan sinir lifleri penis, alt üriner sistem ve rektumu innerve eder.

Korpus kavernoza lifleri innerve eden lifler, pelvik pleksustan sonra kavernoza sinir adını alır. Üretra ve rektum arasında seyreden kavernoza sinir, üretranın kas tabakası komşuluğunda ürogenital diyaframa ulaşır. Ürogenital diyaframa, üretral sfinkterin 4-7 mm uzağından delerek geçen sol ve sağ kavernoza sinir, penisin dorsal siniri ile bağlantılar yaptıktan sonra korpus kavernoza liflerinin dorsomedialinden kavernoza doku içine girer.

Penisin somatosensoryal lifleri; glans, penis cildi, üretra ve korpus kavernoza liflerinden başlar. Glans peniste ince miyelin tabakalı A-delta ve demiyelinize C liflerinin serbest uçları ve korpusküler reseptörler vardır (34). Bu lifler birleşerek

penisin dorsal sinirini oluşturur Diğer sinir lifleri de eklenerek pudental sinir adını alır. Ağrı, ısı ve dokunma pudental sinir ile iletilir. Pudental sinir saf somatik değildir ve aynı zamanda otonomik sinir lifleri de içermektedir. Iskiorektal fossada pudental artere eşlik eden pudental sinir medulla spinalisin S2-S4 bölgesine ulaşır. Bu noktada bulunan somatomotor Onuf nükleusundan köken alan ve pudental sinir ile iletilen uyarılar iskiokavernoz kasları ve bulbokavernoz kasları da kontrol eder (33).

2.3. Ereksiyon ve Detümesansm Hemodinamisi ve Mekanizması

Ereksiyon; santral sinir sistemi, periferik sinir sistemi ve lokal faktörlerin (düz kas hücresi ve endotelyum) kompleks biçimde rol aldığı hemodinamik bir olaydır. Ereksiyon ve detumesans sırasında gerekli hemodinamik olaylar; kan akımındaki, intrakavernosal basınçtaki ve penis hacmindeki değişikliklerdir (35).

Penil erektil doku, özellikle de kavernöz düz kaslarla, arteriol ve arter duvarlarının düz kasları, erektil süreçte anahtar bir rol oynar. Flask durumda, bu düz kaslar kontraktedir, beslenme amacı ile sadece az miktarda arteriyel akıma izin verir. Seksüel uyarı kavernöz sinir terminallerinden nörotransmitterlerin salınımını uyarır. Ereksiyon sırasındaki vazodilatasyon nitrik oksit (NO) vasıtasıyla düz kas tabakasında guanil siklaz aktivasyonu ile başlar. cGMP artışı, intrasellüler kalsiyumun azalması ve kontraktil aparatın kalsiyuma desensitize olması ile devam eder (36). Oluşan bu düz kas gevşemesi aşağıdaki olaylara sebep olur (Resim) (35,37).

1. Hem diastolik, hem de sistolik fazlarda artmış kan akımıyla arteriyol ve arterlerde genişleme
2. Gelen kanın genişleyen sinüsoidlerde hapsedilmesi
3. Subtunikal venüler pleksusların tunika albuginea ve periferik sinusoidler arasına sıkışması, venöz dönüşte azalma
4. Tunikanın kapasitesine kadar genişlemesi, böylece iç sirküler ve dış longitudinal tabakalar arasındaki emisser venlerde dolaşımın daha da azalarak venöz dönüşün minimuma inmesi

5. Oksijen basıncında artma ve intrakavernöz basınçta yükselme sonucu penisin erektil duruma geçmesi (tam ereksiyon fazı)

6. İskiokavernöz adelelerin kasılması ile basınçta artış (rijid ereksiyon fazı)

Damarsal çalışmalar rijit ereksiyonun başlaması ve devam ettirilmesinde penisin venöz dönüşünün kısıtlanmasının esas faktör olduğunu göstermiştir (38). Bir hayvan çalışmasında detümesansın üç fazı bildirilmiştir. İlk fazda kapalı venöz sisteme karşın düz kas kontraksiyonunun başladığına işaret eden geçici bir kavernöz basınç artışı olur. İkinci fazda, bazal arteriyel akımın yeniden oluşması ve venöz kanalların yavaşça yeniden açılmasını işaret eden yavaş bir basınç azalması görülür. Üçüncü faz venöz dönüş kapasitesinin tamamen normal düzeye gelmesi ile hızlı bir basınç düşüşü gösterir (39).

Ereksiyonda, korpus spongiosum ve glans penis arteriyel akım artar; bununla birlikte, korpus spongiosum ve glanstaki basınç tunikanın özelliğinden dolayı venöz tıkanmanın minimal olması nedeni ile korpus kavernosumlardakinin sadece üçte biri ile yarısı arasındadır. Tam ereksiyon fazında, her ne kadar spongiosum ve glans bu fazda aslında geniş bir arteriovenöz şant gibi rol oynasa da, derin dorsal ve sirkumfleks venlerin Buck fasyası ile şişen korpus kavernosumlar arasında parsiyel sıkışması glansta tümesansa yardımcı olur. Rijid ereksiyon fazında, iskiokavernöz ve bulbokavernöz kaslar spongiöz ve penil verileri güçlü bir şekilde sıkıştırır ve böylece glans ve spongiöz cisimde daha fazla basınç artışı ve şişme meydana gelir (37).

2.4. Periferal Nörofizyolojisi ve Nörotransmitterler

Kavernöz trabekülalarda ve kavernöz arterlerin çevresinde α -adrenerjik sinir lifleri ve reseptörleri gösterilmiştir ve penil gevşeme ve detümesansın kontrolünü sağlayan başlıca nörotransmitterin norepinefrin olduğu genel olarak kabul edilmiştir (40,41). İnvitro birçok hayvan ve insan çalışmasında noradrenalin kaverno dokuda kontraksiyona yol açmıştır (42-46). Günümüzde sempatik kontraksiyonun postsinaptik α 1a, α 1b, α 1c adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu yoluyla olmaktadır (47,48).

Endotelin, endotelial hücrelerde üretilen güçlü bir vazokonstriktör olup, aynı zamanda detümesandan sorumlu bir nörotransmitter olduğu da öne sürülmüştür (49,50). Ayrıca tromboksan A₂, prostaglandin F_{2α}, lökotrienler ve anjiotensin II diğer vazokonstriktörler olarak bilinmektedir (51,52). Detümesans intrinsek miyojenik aktivite, adrenerjik nörotransmisyon, prostaglandin F_{2α} ve endotelin gibi endotelde üretilen kontraksiyon faktörleri ile sağlanmaktadır (35). Diğer taraftan ereksiyondan sonra oluşan detümesans NO salınımının durmasına, PDE vasıtasıyla ikincil habercilerin yıkılmasına, yada ejakülasyon sırasındaki sempatik aktivasyona bağlı olabilir.

İnsan erektil dokusunun elektriksel uyarımı sonucu asetilkolin salınımının olduğu gösterilmiştir (53). Asetilkolin başlıca etkin nörotransmitter olmayıp, dolaylı olarak penil ereksiyona şu yollarla katkıda bulunur:

1. Adrenerjik nöronların presinaptik inhibisyonu
2. Endotelial hücrelerden NO salınımının uyarılması (54)

NO ilk kez 1979 yılında periferel vasküler düz kaslarda güçlü bir gevşetici olarak gösterilmiştir (55). Ignarro ve ark., N-nitro-L-arginin (L-NA), N-amino-L-arginin, nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörleri, oksihemoglobin, NO temizleyicisi, ve metilen mavisi, çözünebilir guanil siklaz inhibitörü, izole tavşan KK'da elektrik alan stimülasyonu ile relaksasyon sağlamışlar ve NOS inhibitörlerinin etkisinin L-arginine ile geri çevrildiğini göstermişlerdir. Çalışma sonucunda penil ereksiyonun nonadrenerjik/nonkolinerjik (NANC) sinirlerinden kaynaklanan NO ile oluşturulabileceği hipotezini ortaya atmışlardır (56). Günümüzde NO'nun NANC nörotransmisyonundan ve endotelden salındığı ve penil ereksiyonu uyaran temel nörotransmitter olduğunu kabul edilmektedir. NO cGMP yapımını artırır ve bu da kavernoöz düz kasların gevşemesine neden olur (56-64).

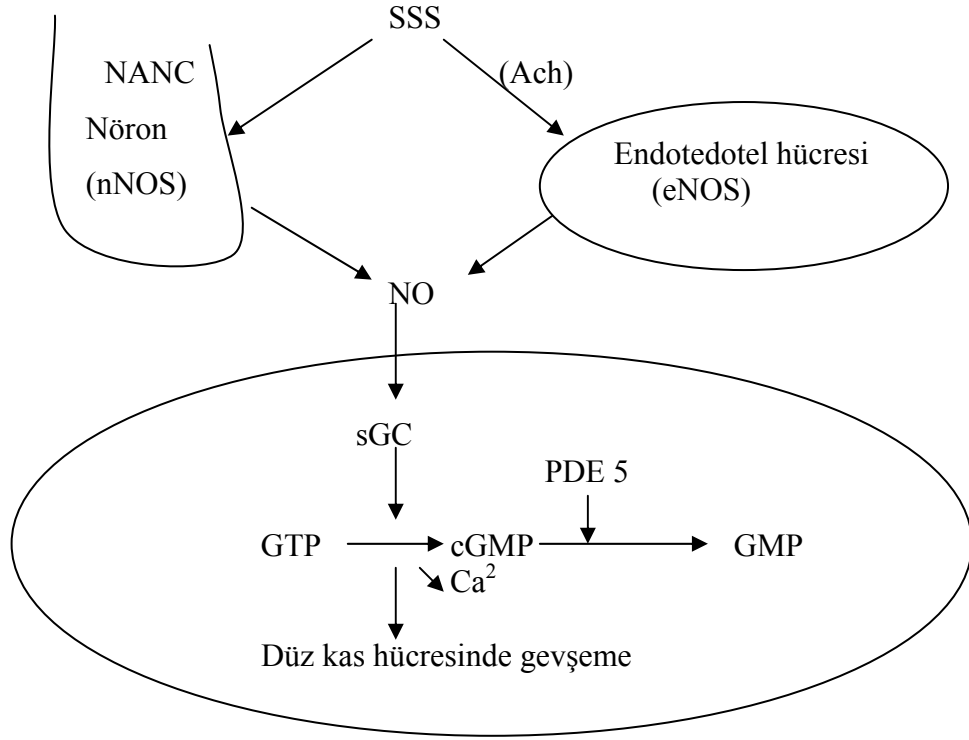
NO, endojen L-argininden NOS vasıtasıyla sentez edilir, bu sentez N-metil-L-arginin, N-nitro-L-arginin ve N-amino-L-arginin gibi L-argininin N-eklenmiş analoglarıyla inhibe edilebilir. NO hemoglobin tarafından inaktive edilir. NOS un üç ayrı formu bulunur: Nöronal (n NOS), indüklenebilir (i NOS) ve endotelial (e NOS). Benzer iki formdan nöronal NOS (nNOS) sinir sisteminde mevcutken, endotelial NOS (eNOS) vasküler sistemde bulunur. Her iki izoform da, aktiviteleri için kalsiyum ve kalmoduline ihtiyaç duyar. Üçüncü form; iNOS kalsiyumdan bağımsız

formdur. İnflamatuar mediyatörlerin ve bakteriyel ürünlerin indüksiyonunu takiben farklı türdeki hücrelerden izole edilebilir (65,66). nNOS kolinerjik sinirlerde, eNOS penisin endotelinde bulunur (67,68). Normal fizyolojik şartlarda, iNOS peniste eksprese olmaz. Bununla birlikte, inflamatuvar mediyatörlerle karşılaşıldığında, ürogenital düz kasta eksprese olduğu gösterilmiştir (69).

Mevcut çalışmalar; moleküler oksijen, androjen, uzun süre L-arjinin kullanımı ve tekrarlayan intrakavernozal prostaglandin E₁ enjeksiyonlarıyla NOS aktivitelerinin arttığını gösterirken, kastrasyon, denervasyon, hiperkolestrolemi ve diabetes mellitusun NOS aktivitelerinde düşmeye neden olduğunu göstermişlerdir (70-72).

Klasik nörotransmitterlerden farklı olarak, NO hücre içerisinde spesifik bir reseptöre bağlı değildir. Gaz molekülü olan NO sitoplazmada bulunan, çözülebilir guanilat siklaz (sGC) hedefleyerek hücre membranından geçer. NO'nun sGC'ye bağlanması proteinde değişikliklere neden olur ve aktivitesi artar (73). Aktive olan sGC, guanosin-5'-trifosfatın (GTP), guanosin-3', 5' siklik monofosfata (cGMP) dönüşümünü katalize eder. cGMP ökaryotik hücrelerde iyon kanalları, fosfodiesterazlar ve protein kinazlar olmak üzere üç farklı yönde sinyal verir. Bu etkileşimlerle intrasellüler cGMP konsantrasyonlarının artması, intrasellüler serbest Ca konsantrasyonunun düşmesiyle sonuçlanan ve kontraktıl tonus kaybının indüklenmesine neden olan olaylar zincirini başlatır. Bu olaylar, cGMP-bağımlı proteinkinazların aktivasyonu, hiperpolarizasyon, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının kapanması, intrasellüler organellerde kalsiyum sekestrasyonu ve kontraktıl aperlusta desentizasyonun engellenmesidir (Şekil 3).

NO kısa yarı ömrü olan, yüksek oranda reaktif bir moleküldür (74) ve sGC bağlanmaya ek olarak birçok non-enzimatik reaksiyona girebilir (75). Bunlarda ikisi *invivo* olarak önemlidir. İlki, sGC'in hem kısmına bağlandığı şekilde, NO aynı zamanda oksihemoglobinin hem kısmına bağlanır. İkinci olarak, kendisi serbest radikal olarak, NO diğer radikallerle, özellikle süperoksit, reaksiyona girer (74). Bu ikinci reaksiyon, erektil disfonksiyona oksidatif stresin etkisinde merkezi bir rol oynamaktadır (7).



Şekil 3: Penis kavernal düz kas gevşemesinde etkili mekanizmalar

2.5. Homosistein ve Hiperhomosisteinemi

2.5.1. Homosistein

Sülfür içeren bir aminoasit olan homosistein (Hcy), diyetle alınan ve endojen proteinlerden sentezlenen esansiyel bir aminoasit olan metioninin metil grubu alınmış bir türevidir. İlk kez 1932 yılında De Vigneaud tarafından metiyonin metabolizmasının bir ara ürünü olarak bulunmuştur. McCully, 1969 yılında, otopsi sonucunu değerlendirirken, yoğun arteriyel tromboz ve aterosklerozu olan çocuklarda plazma ve idrarda yüksek homosistein düzeylerinin görüldüğünü rapor etmiştir. Bu gözlemlerine dayanarak, yüksek plazma homosistein düzeyleri ile vasküler hastalıklar arasında bir ilişki olabileceği hipotezini ortaya atmıştır (76).

Normal hücre içi homosisteinin yaklaşık %50'si iki remetilasyon yoluyla tekrar metil grubu alarak metionine çevrilir ki, bu yollar;

- Vitamin B₁₂ bağımlı metiyonin sentetazın katalize ettiği bir reaksiyonda bir metil grubunun 5-metiltetrahidrofolat' tan (5-MTHF) homosisteine transferi.
- Betain veya trimetilglisinindeki bir metil grubunun geri dönüşümsüz olarak homosisteine transfer edilmesi.

Homosistein vitamin B₆ bağımlı sistasyon β sentetaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla sistatyona transsülfürlenebilir. Sistasyon, glutasyon gibi hücre içi tiol içeren bir çok majör biyolojik bileşiğin sentezinde gerekli olan sistinin kaynağıdır. En sonunda, sistasyon ve diğer sülfür içeren aminoasitler su ve sülfata metabolize edilerek idrarla atılırlar (77). Total plazma homosisteinin yaklaşık %80'i disülfid köprüleriyle albümine bağlıdır. Bağlı olmayan homosistein türleri ise başlıca "Homosistein-Sistin" ve "Homosistein-Homosistein" disülfidleri şeklinde bulunur. Dolaşımdaki tüm homosisteinin yalnızca %1'i serbest homosistein şeklinde bulunur. Total homosistein (tHcy) bütün bu serbest ve bağlı biyokimyasal homosistein türlerinin toplamını tanımlar. Normal olgularda ortalama plazma tHcy değeri 10 µmol/L olup 95 persentil ile 16 µmol/L civarındadır (78)

2.5.2. Hiperhomosisteinemi

Hiperhomosisteinemi (HHcy), total Hcy düzeyinin 15 µmol/L değerinin üzerinde olması olarak tanımlanır. Hiperhomosisteinemi, hafif (16-30 µmol/L), orta (31-100 µmol/L) ve ciddi (>100 µmol/L) olarak üç grupta tanımlanır (78).

Hiperhomosisteinemi, Hcy metabolizması için gerekli olan bir enzimdeki (sistasyon β sentetaz veya ısıya duyarlı metilentetrahidrofolat redüktazın (MTHFR)) veya bir kofaktördeki (folat, vitamin B12, veya vitamin B6) anormallik sonucu oluşur. Hafif HHcy sıklıkla B vitamin eksikliği, özellikle folat, vitamin B12, veya vitamin B6 sonucu görülür. B vitaminleri sistasyon β sentetaz ile homosisteinin sistationa transsülfürasyonu (vitamin B6), ve metiyonin sentetaz ile homosisteinin metionine remetilasyonu (folik asit, vitamin B12) için gerekli kofaktörlerdir. Metiyoninden zengin olan hayvansal gıda ağırlıklı beslenmenin hiperhomosisteinemi yaptığı bildirilmiştir. Sigara, alkol alımı, kahve tüketimi de yine hiperhomosisteinemi

ile ilişkilidir. Genetik faktörler, bazı ilaçlar ve renal yetmezlikte nedenler arasındadır (79). Hiperhomosisteineminin nedenleri günümüzde ayrıntılı biçimde düzenlenmiştir (Tablo 1) (78).

Tablo-1: Hiperhomosisteineminin nedenleri

Kalıtısal

Transsülfürasyon bozuklukları

- Sistasyon β sentetaz eksikliği(nadir)

Remetilasyon bozuklukları

- Vitamin B₁₂transport bozukluğu (nadir)
- Vitamin B₁₂ koenzim sentez bozukluğu (nadir)
- Metionin sentetaz bozukluğu (nadir)
- 5, 10 MTHF eksikliği veya bozukluğu (nadir)

Kazanılmış

Vitamin eksiklikleri

- Vitamin B₁₂
- Vitamin B₆

Renal yetmezlik

Hipotiroidi

Akut lenfoblastik lösemi

Psöriazis

İlaçlar

- Metotreksat (dihidrofolat reduktaz inhibitörü)
 - Fenitoin veya karbamezepin (Folat antagonisti)
 - Nitrik oksit (metionin sentaz inaktivatörü)
 - Metüksantin (Vitamin B₆ inhibitörü)
 - Nikotinik asit
-

Yüksek kan Hcy değerleri erken ateroskleroz için bağımsız risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (10,11). Seksen kadar klinik ve epidemiyolojik çalışmanın gözlemi hiperhomosisteineminin aterosklerotik damar hastalığı ve arteriyel ve venöz tromboembolizm için risk faktörü olduğunu göstermiştir. Hafif ve orta HHcy koroner, serebral, veya periferik arteriyel okluziv hastalığı olan hastaların yaklaşık %12–47'sinde mevcuttur (80). Homosisteine bağlı ateroskleroz için birçok akla yatkın mekanizma ileri sürülmüştür. Bunlar; endoteliyal disfonksiyon (81), bozulmuş akımla sağlanan vazodilatasyon (82), vasküler düz kas hücrelerinde artmış proliferasyon (83), artmış koagülasyonu içermektedir (84).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı ve Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma, “1142-TU-05” proje numarası ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimince desteklenmiştir.

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 200-250 gram olan Wistar Albino cinsi toplam 26 adet erkek sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi. Sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (22° C)'da yeteri kadar su ve yem ile toplam 1 ay süreyle beslendiler.

1. Grup I: Standart Yemle beslenen grup (Kontrol grubu, n=8).

Ortalama ağırlıkları 209 gr olan ratlardan oluşturulmuştur. Bu grup deney sonunda başlangıçtaki sayılarını korumuştur. Standart diyet (pellet yem) ile 1 ay süresince beslenmişlerdir.

2. Grup II: Günlük 0,5 gr/kg Metionin eklenen grup (n=9).

Ortalama ağırlıkları 222 gr olan ratlardan oluşturulmuştur. 0,5 gr/kg L-Metiyonin suda çözülerek 1 ay süreyle her gün sabah saat 10-11 arasında gavaj ile verildi. Gruptaki ratların ağırlıkları her hafta kaydedildi. Verilecek doz grubun ortalama ağırlıklarının haftalık ölçümleri ile ayarlandı.

3. GrupIII: Günlük 1 gr/kg Metionin eklenen grup (n=9) (85).

Ortalama ağırlıkları 219 gr olan ratlardan oluşturulmuştur. 1gr/kg L-Metiyonin suda çözülerek 1 ay süreyle her gün sabah saat 10-11 arasında gavaj yoluyla verildi. Gruptaki ratların ağırlıkları her hafta kaydedildi. Verilecek doz grubun ortalama ağırlıklarının haftalık ölçümleri ile ayarlandı.

Sıçanlar 1 ayın sonunda, aldıkları diyet ve tedavi uygulamasının ardından, bir gece aç bırakıldılar. Her birinin atan kalbinden % 10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.) ve % 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında EDTA'lı tüplere 1.5-2 cc miktarında kan örneği alındı. Penis shaftı dikkatlice diseke edildi ve penis kökünden ampute edildi. Penil shaftı soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra sıvı nitrojen (-80°C) ile hızlıca donduruldu (snap-freeze). Kan örneklerinden soğuk santrifüj ile plazma ayrıştırıldı. Dokular ve plazmalar biyokimyasal çalışma yapılana kadar -80°C' de derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler

1-Soğutmalı santrifüj	:Eppendorf MR 5415 (Almanya)
2-Santrifüj	: Nüve-NF 815 (Türkiye)
3-Derin dondurucu	: Scientific Snijders (Hollanda)
4-Hassas terazi	: Scaltec (İsviçre)
5-Vorteks	: Nüve NM 100(Türkiye)
6-Otomatik pipetler	: Eppendorf (Almanya), Gilson(Fransa)
7-Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1201V 1600 (Japonya)
8- Hemogram Cihazı	: Coulter Max M (İngiltere)
9- Homojenizatör	: Ultra Turrax T25 (Almanya)
10- pH metre	: Hanna Instruments (Portekiz)
11-Manyetik karıştırıcı	: Nüve (Türkiye)
12- Görüntüleme Cihazı	: KODAK Image Station 2000 MM(Amerika)
13-Elektroforez cihazı	: EC Apparatus Corporation 250-90 (ABD)
14-HPLC	: Thermo Finnigan HPLC

3.1.3. Kimyasal Maddeler

Homosistein tayini için kullanılanlar:

- HPLC için plazma homosistein kiti Receipe GmbH (Almanya)

Süperoksid Dismutaz tayini için kullanılanlar:

- Potasyum dihidrojen fosfat KH_2PO_4 Merck (Almanya)

- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat Merck (Almanya)
- CAPS, Sigma (Almanya)
- Iodonitrotetrazolyum violet, Sigma (Almanya)
- Ksantin, Merck (Almanya)
- Ksantin oksidaz, Sigma (Almanya)
- Titripleks III, Merck (Almanya)

Glutasyon Peroksidaz Tayini İçin Kullanılanlar:

- Glutasyon redüktaz, Fluka (İsviçre)
- β -NADPH, Sigma (Almanya)
- Kümen hidroperoksit, Sigma (Almanya)
- Potasyum bikarbonat NaHCO_3 Sigma
- Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya)
- Glutasyon-redükte, Sigma (Almanya)
- Titripleks III, Merck (Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya)

SDS-PAGE ve Western Blot için kullanılanlar:

- Akrilamid : bisakrilamid %30 T, %2.6 C Sigma (Almanya)
- Tris Merck (Almanya)
- Glisin Merck (Almanya)
- SDS Merck (Almanya)
- APS Merck (Almanya)
- TEMED Merck (Almanya)
- 2-Merkaptoetanol Merck (Almanya)
- Brom fenol blue Merck (Almanya)
- Sodyum klorür Merck (Almanya)
- Tween 20 Merck (Almanya)
- Bovin Serum Albumin Merck (Almanya)
- EDTA Merck (Almanya)
- EGTA Merck (Almanya)
- Leupeptin Sigma (Almanya)
- Aprotinin Sigma (Almanya)

- Benzamidin Sigma (Almanya)
- Triton X-100 Sigma (Almanya)
- Immobilon P Sigma (Almanya)
- Kromotografi filtre kağıdı Whatman (İngiltere)
- Metanol Merck (Almanya)
- Hidroklorik asit Merck (Almanya)
- Anti iNOS Chemicon International (Amerika)
- Anti-nNOS Chemicon International (Amerika)
- Anti eNOS ABR (Amerika)
- Monoklonal anti-rabbit IgG Sigma (Amerika)
- BCIP/NBT Sigma (Almanya)
- Prestained Molecular Weight Marker Sigma (Amerika)

3.1.4. SDS-PAGE ve Western-Blot İçin Kullanılan Çözeltiler:

1- 4 x Lower Buffer: 1.5 M Tris HCl, pH: 8.8

36.3 g Tris 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH'ı 8.8'e ayarlanır. Soğutulup pH'ı tekrar 8.8'e ayarlanır. 200 ml'ye distile suyla tamamlanır.

2- 4 x Upper Buffer: 0.5 M Tris HCl, pH: 6.8

12.1 g Tris, 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH'ı 6.8'e ayarlanır. Soğutulup pH'ı yeniden 6.8'e ayarlanır. 200 ml'ye distile suyla tamamlanır.

Lower jel: (% 7.5'luk)

Distile su	4450 µl
Acril : bisacril % 30 T, % 2.6 C	2500 µl
4 × lower buffer (tris HCl, pH: 8.8)	2500 µl
% 10 SDS	100 µl
% 10 APS	450 µl
TEMED	10 µl

Upper jel: (% 4'lük)

Distile su	2920 µl
Acril : bisacril % 30 T, % 2.6 C	670 µl
4 × Upper buffer (tris-HCl, pH: 6.8)	1250 µl
% 10 SDS	50 µl
% 10 APS	200 µl
TEMED	10 µl

3- Homojenizasyon buffer: 50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 µg/ml Leupeptin, 25 µg/ml Aprotinin, 10 µM benzamidin ve % 1'lik Triton X-100 bulunacak şekilde total hacim 30 ml'ye tamamlandı.

4- Sample buffer:

Upper buffer (0.5 M Tris-HCl, pH: 6.8)	2.0 ml
Gliserol	1.6 ml
% 10 SDS	3.2 ml
2-Merkaptoetanol	0.8 ml
% 0.1(w/v) Brom fenol blue	0.4 ml

5- Running buffer: 15 gr Tris, 72 gr Glisin, 5 gr SDS, pH 8.3'e ayarlanıp distile su ile 1 lt'ye tamamlanır. 5 kat sulandırılarak kullanılır.

6- Transfer buffer: 0.606 gr Tris, 2.882 gr Glisin ve 1 ml % 10 SDS, distile su ile 160 ml'ye pH: 8.2-8.4 olacak şekilde tamamlanır. 40 ml metanol eklenir.

7- TTBS (Tris-Tween-Buffer Saline): 12.1 gr Tris, 17.5 gr NaCl, 2 ml Tween 20 (pipetle yavaşça çekilir, yoğun bir madde olduğu için) pH: 7.5 olarak ayarlanıp 2 litreye distile suyla tamamlanır.

8- Primer antikolar: Anti-eNOS (1:500), Anti-nNOS (1:1000), taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

9- Sekonder antikor: Antirabbit IgG (Alkalen fosfataz konjuge) 1:10.000 oranında, taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.2. METOD

3.2.1. Hiperhomosisteinemi Oluşturulması

Hiperhomosisteinemi sağlamak için L-metiyonin (Sigma) suda çözülerek sıçanlara 30 gün boyunca hergün oral gavaj yoluyla verildi. Metiyonin, S-adenozil metiyonin (SAM) ve S-adenozil homosistein (SAH) üzerinden Hcy oluşturmak üzere metabolize olur. Ek olarak, metiyonin ve ara ürünü (SAM) Hcy metabolizmasını inhibe eder ve plazma total Hcy düzeylerinde yükselmeye neden olur (86)

Verilecek metiyonin miktarı Grup III'de her rat için 1 g/kg/gün (85), Grup II'te her rat için 0.5 g/kg/gün şeklinde ayarlandı. Ratlar her hafta tartılarak verilecek metiyonin dozu haftalık hesaplandı.

3.2.2. Homojenizasyon

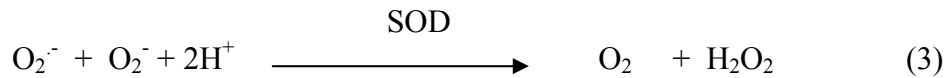
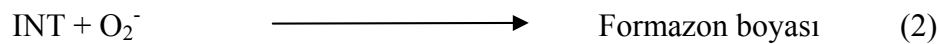
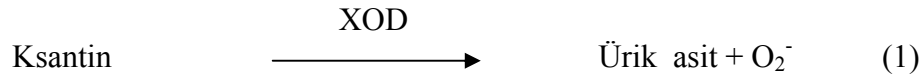
Rat penisleri önce tartıldı. Tartılan penisler 1/5 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edildi. İkinci adımda 30 sn. buz üzerinde sonike edilerek homojenizasyon tamamlandı. Örneklerden bir kısmı Western Blot analizi için her grupta 3 numune olacak şekilde birleştirildi Homojenize edilen örnekler 15000 g'de +4°C'da soğutmalı santrifüjde 20 dk santrifüj edildi. Homojenize edilen örneklerin süpernatantlarında Lowry yöntemi kullanılarak protein tayini yapıldı (87). Daha sonra örneklerde SOD, GSH-Px ile SDS-PAGE ve Western Blot yöntemi ile NOS düzeyleri çalışıldı.

3.2.3. Süperoksid Dismutaz Aktivitesi Ölçümü

Deneyin prensibi Sun ve arkadaşlarının metoduna dayanmaktadır (89).

SOD çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit (O_2^-) radikalinin H_2O_2 'ye dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. Ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen O_2^- radikallerinin (reaksiyon 1), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-

nitrofenol)-5-fenil tetrazolyum klorit (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazon boyasının (reaksiyon 2), 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak, reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi.



Deneyin Yapılışı: 0.5 ml süpernatant alınıp, % inhibisyonun %30-60 arasında olması için 0.1 mM fosfat tamponu ile dilüe edildi. 0.025 ml süpernatanta 0.850 ml 0.05 mM ksantin çözeltisi (0.025 mM INT içeren) ilave edildi. 0.125 ml ksantin oksidaz (80U/L) ilave edildikten hemen sonra 505 nm'de 37 °C' de 30 saniyelik gecikme fazının ardından havaya karşı başlangıç absorbansı (A₁) ve 3 dakika sonra da son absorbans (A₂) okundu. Aynı işlemler kör denemeyle de tekrarlandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A(\text{numune})/\text{dk}}{\Delta A(\text{kör})/\text{dk}} \times 100$$

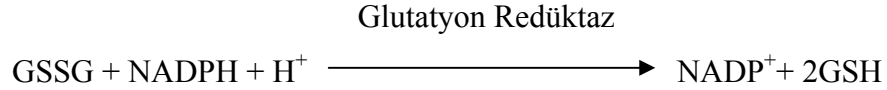
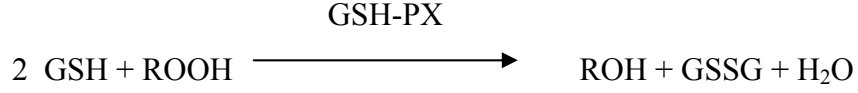
Standart (5.2 U/mL) çalışılarak hazırlanan % inhibisyon-konsantrasyon grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar saptandı. Enzim aktivitesi U/ml olarak bulundu. Bu değerler homojenizasyon sırasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpılıp dokunun protein değerine bölünerek U/gr birimi şeklinde sonuçlar verildi (87).

3.2.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Ölçümü

Deneyin prensibi Paglia ve Valentine' nin metoduna dayanmaktadır (90).

Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksid ile glutasyonun oksidasyonunu katalizler. Okside glutasyon, NADPH varlığında glutasyon redüktaz tarafından indirgenir. Bu arada NADPH, NADP⁺ ye oksitlenir. NADPH'nin azalmasına bağlı

olarak 340 nm'de meydana gelen absorbans değişimi ölçülerek enzim aktivitesi hesaplanır.



Deneyin yapılışı: Bir deney tüpünde 1 ml; glutasyon (4 mM), glutasyon redüktaz (≥ 0.5 U/L) ve β -NADPH (0.34 mM) çözeltilerini içeren reaktif ile 20 μ l numune karıştırılıp, ölçümden hemen önce 40 μ l kümen hidropersit (0.18 mM) ilave edildi. Enzim aktivitesini ölçmek için 340 nm'deki absorbans değişimi hesaplandı. U/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi, homojenizasyon esnasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpıldıktan sonra doku protein değerine bölünerek sonuçlar U/gr birimi olarak ifade edildi.

3.2.5. SDS-PAGE Yöntemi

Laemmli'nin yöntemi esas alınarak çalışıldı (91). % 7.5'lik lower gel ve % 4'lük upper gel hazırlanıp, kuyucuk başına son konsantrasyonu 50 μ gr protein olacak şekilde doku homojenatı sample buffer'la 1/1 oranında karıştırılarak uygulandı.

3.2.6. Western Blot Yöntemi

SDS-PAGE prosedürü ile örnekler jel üzerinde proteinlerine ayrıldı ve daha sonra polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana (immobilon-P) transfer edilmek üzere transfer tankına alındı. Transfer prosedürü sonrası anti-eNOS ve anti-nNOS içeren solüsyonlarda bir gece boyunca bekletildi. Daha sonra sekonder antikorla 1 saat süre ile inkübe edilen membranlar taze hazırlanan BCIP/NBT solüsyonunda yeterli boyanma sağlanana kadar bekletildi. Oluşan bantlar KODAK Image Station

2000 MM cihazı kullanılarak tarandı. Elde edilen bant yoğunlukları her bir reseptör subtipi için kendi arasında karşılaştırıldı.

3.2.7. Plazma Homosistein Düzeyinin Tespiti

Plazma Hcy düzeyleri HPLC (High-performance Liquid Chromatographic) metodu kullanılarak ölçüldü (92).

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS 11.0 for Windows” paket programı kullanılarak yapıldı. Datalar “ANOVA” Bonferroni veya LSD *post hoc* çoklu karşılaştırma testi değerlendirildi. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verildi. P değerinin 0.05’den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Deney grubundaki hayvanlarda 1 aylık beslenme sonrasında belirgin ağırlık artışı saptandı, ancak gruplar arasındaki ortalama ağırlıklar benzerdi. Grup I, II ve III'ün ilk ve son tartıları karşılaştırıldığında p değerleri sırasıyla 0,003, 0,001, 0,014 şeklinde bulundu. Grupların haftalara göre ortalama ağırlıkları tablo 2'de verilmiştir.

	1. hafta	2. hafta.	3. hafta	4. hafta
Grup I (gr) <i>Ort ± SD</i>	209,2±8,2	213,4±11,6	229,8±17,8	238,4±23,2
Grup II (gr) <i>Ort ± SD</i>	222,8±8,06	227±8,94	227,12±9,23	239,25±10,36
Grup III (gr) <i>Ort ± SD</i>	219,8±11,51	223,3±13,08	227,7±13,89	236,4±15,21

Tablo 2: Grupların ağırlık ortalamaları ve standart deviasyonları

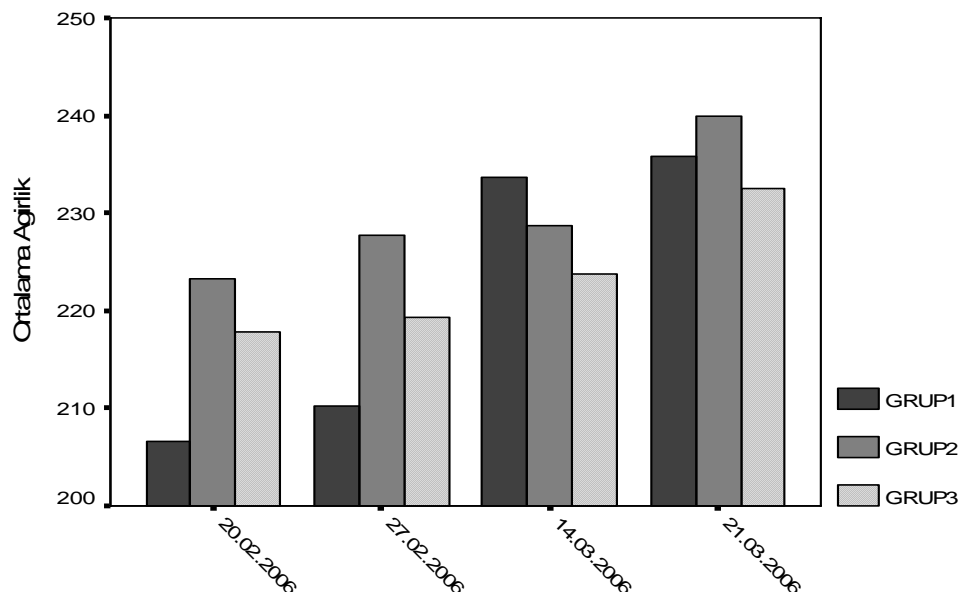
Grup I: Kontrol (n: 8)

Grup II: 0,5 gr/kg/gün L-metiyonin uygulanan (n: 9)

Grup III: 1 gr/kg/gün L-metiyonin uygulanan (n: 9)

Ölçüm tarihlerine göre ratların ağırlık artış ilişkileri şekil 4'te gösterilmiştir.

Şekil 4: Gruplardaki ağırlık artışlarının birbirleriyle olan ilişkisi



4.1. Grupların Kan Hcy Değerlerinin Karşılaştırılması

Grupların plazma Hcy düzeyleri ve karşılaştırmaları tablo 3’de özetlenmiştir. Grup II’ de (0,5 gr/kg/gün dozunda Metiyonin uygulanan grup) Hcy düzeyleri yükselmiş bulundu. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamsızdı ($p=0,96$). 1gr/kg/gün metiyonin uygulanan grupta plazma Hcy seviyeleri ortalaması 61,47 $\mu\text{mol/l}$ olarak tespit edildi ve kontrol grubunun yaklaşık 10 katı kadar artma saptandı ($p<0,05$).

	Grup I <i>Ort ± SD</i>	Grup II <i>Ort ± SD</i>	Grup III <i>Ort ± SD</i>
Hcy ($\mu\text{mol/l}$)	6.49 ± 0.90	6.67 ± 1.25	61.47±11,37

Grup I-II’ ün karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : 0,96

Grup I- III’ ün karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : 0.000

Grup II- III’ ün karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : 0,000

Tablo 3: Plazma total Hcy düzeyleri ve karşılaştırması

Grup I: Kontrol (n: 8)

Grup II: 0,5 gr/kg/gün L-metiyonin uygulanan (n: 9)

Grup III: 1 gr/kg/gün L-metiyonin uygulanan (n: 9)

Hcy: Homosistein

4.2. Grupların Doku Antioksidan Düzeylerinin Karşılaştırılması

Kontrollerle karşılaştırıldığında, SOD düzeylerinde hem Grup II hem de Grup III’ de istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. Grup I ve II arasında $p=0,002$ iken Grup I ve III arasında $p=0,000$ bulundu. Grup II ve III arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p= 0,260$).

	Grup I <i>Ort ± SD</i>	Grup II <i>Ort ± SD</i>	Grup III <i>Ort ± SD</i>	P değeri
SOD (U/gr prot)	0,2621±0,02	0,6604±0,32	0,836±0,26	0,002 (P1) 0,000 (P2) 0,260 (P3)
GSH-Px (U/gr prot)	0,022±0,003	0,028±0,008	0,034±0,004	0,116 (P4) 0,001 (P5) 0,201 (P6)

Grup I-II’ ün SOD değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P1

Grup I-III’ ün SOD değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P2

Grup II-III’ ün SOD değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P3

Grup I-II’ ün GPx değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P4

Grup I-III’ ün GPx değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P5

Grup II-III’ ün GPx değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P6

Tablo 4: Antioksidan enzim aktiviteleri ve karşılaştırılması

Grup I: Kontrol (n: 8)

Grup II: 0,5 gr/kg/gün L-metiyonin uygulanan (n: 9)

Grup III: 1 gr/kg/gün L-metiyonin uygulanan (n: 9)

Grup I' de GSH-Px düzeyi ortalaması 0,022 U/gr tespit edilirken, aynı değer Grup II ve III için sırasıyla 0,028 U/gr protein ve 0,034 U/gr protein saptandı. Grup I ile karşılaştırıldıklarında Grup II' de istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış saptanırken, Grup III' de bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0,039$ ve $p=0,000$).

4.3. Grupların eNOS ve nNOS Seviyelerinin Karşılaştırılması

Western blot yöntemi ile saptanan eNOS ve nNOS protein düzeyleri tablo 5'te gösterilmektedir. eNOS Grup II ve Grup III' de kontrole göre düşük saptanmıştır ve bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır. Grup II ve III değerleri arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=1,000$). nNOS seviyelerinde Grup II' de Grup I' e göre artış saptanmış, fakat artış istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p=0,135$). Bunun yanında Grup III' de Grup I' e göre anlamlı bir azalma tespit edildi ($p=0,018$).

	Grup I <i>Ort ± SD</i>	Grup II <i>Ort ± SD</i>	Grup III <i>Ort ± SD</i>	P değeri
eNOS (optik dansite)	687,66±218,94	214,33±22,94	254,66±22,14	(P1) 0,012 (P2) 0,018 (P3) 1,000
nNOS (optik dansite)	118,66±18,03	150,00±4,58	75,6667±19,00	(P4) 0,135 (P5) 0,018 (P6) 0,002

Grup I-II' nin eNOS değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P1
Grup I-III' ün eNOS değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P2
Grup II-III' ün eNOS değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P3
Grup I-II' nin nNOS değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P4
Grup I-III' ün nNOS değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P5
Grup II-III' ün nNOS değerlerinin karşılaştırılması ile elde edilen P değeri : P6

Tablo 5: Grupların NOS izoenzim düzeyleri ve karşılaştırılması

Grup I: Kontrol (n: 8)

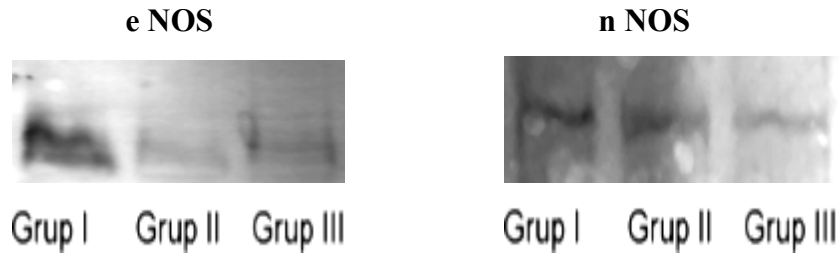
Grup II: 0,5 gr/kg/gün L-metiyonin uygulanan (n: 9)

Grup III: 1 gr/kg/gün L-metiyonin uygulanan (n: 9)

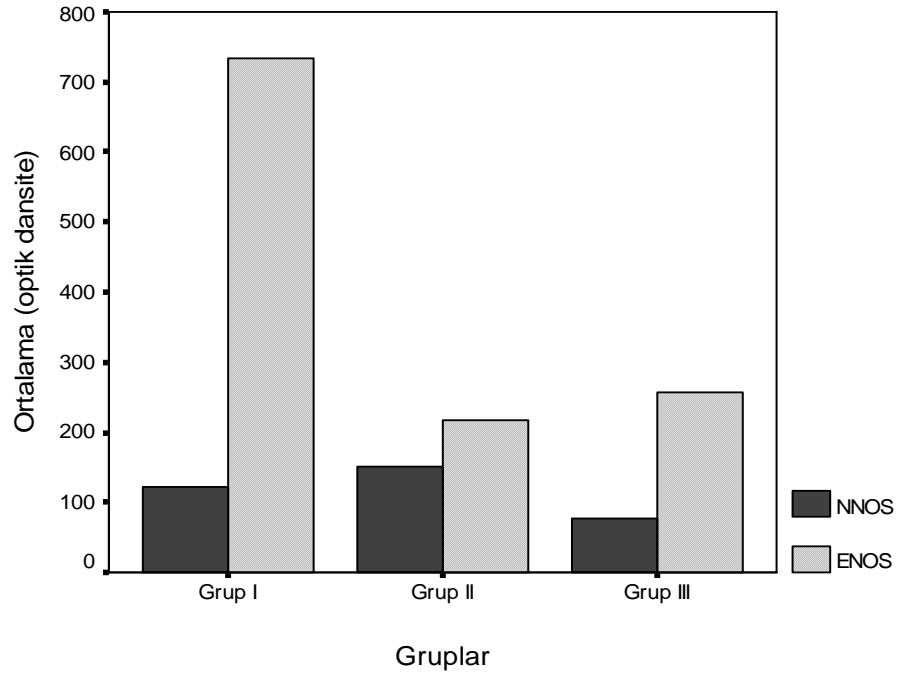
eNOS: endotelial nitrik oksit sentaz nNOS: nöronal nitrik oksit sentaz

eNOS ve nNOS'a ait Western Blot analizi örnek batları şekil 5'te gösterilmektedir. eNOS'a ait şekilde Grup I bantı diğer gruptaki bantlardan belirgin şekilde daha kalın gözlenmektedir. Şekil 6'da grupların ortalama değerleri grafiksel olarak gösterilmiştir.

Şekil 5: eNOS ve nNOS'a ait Western Blot analizi örneği



Şekil 6: Gruplara göre eNOS ve nNOS ortalama seviyelerinin grafiksel gösterimi



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İleri kardiyovasküler hastalığı (KVH) olan hastalarda ED geliştiğinin kabul görmesi araştırmaları iki patoloji arasında ortak noktaları bulmaya itmiştir. Bununla birlikte, yapılan çalışmaların sonuçları ED' nin sistemik aterosklerozun bir erken belirtisi olabileceği ve diğer organlarda klinik olarak önemli vasküler hastalıklardan önce oluşabileceğini düşündürmektedir. Araştırmalar kardiyovasküler hastalıklar için bilinen bazı risk faktörlerinin (örn. diabetes mellitus, dislipidemi, sigara) aynı zamanda ED içinde geçerli olduğunu göstermektedir (2, 4-7). Chung ve ark. ED' si olan hastalarda yaptığı penil doppler çalışmasında, bu hastaların penil damar yataklarının vazodilatasyon kabiliyetinin kardiyovasküler risk faktörleri ile ters ilişkisi olduğunu göstermiştir (8). Kawanishi ve ark. ED' si ve anormal penil Doppler ultrasonografi olan erkeklerin iskemik kalp hastalığı için artmış riskleri olduğunu göstermiştir (9) Endotelial disfonksiyon, bahsedilen kardiyovasküler risk faktörleri için ortak paydayı oluşturmaktadır ve ED ile aralarındaki ilişki açısından çok önemli olduğu düşünülmektedir (2, 4-7).

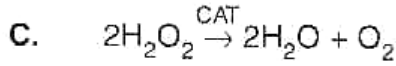
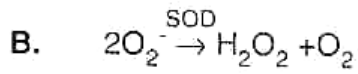
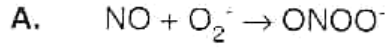
5.1. Antioksidan sistem ve vasküler oksidatif stres

Oksidatif stres hücrelerin aşırı miktarda moleküler oksijen veya ROS (Reaktif oksijen türleri) maruz kalması anlamına gelmektedir. Bu olay ROS-oluşturucu ve ROS-koruyucu sistemler arasındaki dengesizlikten oluşmaktadır (4, 93). ROS arasında esas olan süperoksitdir (O_2^-) ve moleküler oksijenden bir elektron azalarak oluşur. Süperoksit ve diğer ROS 'leri değişik kaynaklardan vasküler dokularda ve kan hücrelerinde oluşurlar (93-99). Süperoksit, endotelial ve vasküler düz kas hücrelerinde NADH/NADPH oksit, ksantin oksit, eNOS, lipooksijenaz ve COX enzimleri ile oluşur. Bu enzimlerin oluşumunun yükselmesi vasküler hastalıklar ve bunla ilgili risk faktörleriyle birliktedir (94,101,102).

Oksidatif stresten korunmada bazı enzim sistemleri mevcuttur ve bunlar süperoksit ve diğer ROS'ları uzaklaştırır. Bunların başlıcaları süperoksit dismutaz (SOD; süperoksiti hidrojen peroksite dönüştürür), katalaz (CAT; hidrojen peroksiti

suya dönüştürür), glutatyon peroksidaz (GSH-Px; hidrojen peroksiti suya dönüştürür) ve oksidazdır (Şekil 7). Diğer doğal olarak oluşan antioksidanlar ROS-temizleyicileri olarak bilinen, vitamin C ve E, transisyonel metal bağlayıcı proteinler ve NO'nun kendisidir (94).

Şekil 7: Antioksidan enzimler ve fonksiyonları (95)



Süperoksitin oluşturduğu patolojik etkilerin merkezinde NO' in inaktive olması yer alır (102) (Şekil 7-A) ve bu etkileşimin aterogenenezde önemli rol oynadığı genel olarak kabul görmüştür (94,98,99,105,106). Oluşan peroksinitritinde kavernal vasküler düz kas hücrelerinde relaksasyon etkisi vardır, fakat bu etkisi NO' dan daha az potanttir (94,107). Peroksinitrit yine reaktif hidroksil radikallerini oluşturarak endotelial hasara katkıda bulunur (94). NO seviyelerinde düşme vasküler duvara trombosit ve lökositlerin adezyonunu arttırmakta ve yine bu hücrelerin salgıladıkları tromboksan A₂, lökotrienler ve serotonin vazokonstrüksiyona neden olmaktadır (96). Süperoksitin kendisi, kalsiyum mobilizasyonuna neden olarak vazokonstrüksiyona neden olabilmektedir (11). Süperoksit ve peroksinitrit aynı zamanda endotel hücreleri üzerinde apoptotik etki ile endotelde zayıflama ve buna bağlı NO bağımlı gevşemede azalmaya neden olmaktadır (94,96).

Serum Hcy seviyeleri ateroskleroz gelişimi ile birlikte (106). Hcy anjiopatik etkisini esas olarak süperoksit (O₂⁻) ve hidrojen peroksidi (H₂O₂) içeren reaktif oksijen türlerinin oluşturulmasıyla yapmaktadır (97,98,100). Homosisteinden süperoksit oluşturulması bakır iyonları tarafından katalize edilir (11), yine bakırın kendisinde Feton reaksiyonu ile süperoksit oluşturabilir. Bakır iyonları aynı zamanda lipit peroksidasyonu ve hidroksil üretimini arttırarak oksidatif stresi arttırmaları.

Homosisteinin vasküler sisteme etkileriyle ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen penis dokusundaki etkileriyle ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır (18,19). Hiperhomosisteineminin korpus kavernosum (KK) düz kasında da benzer etkilerinin olduğu, dolayısıyla HHcy' nin ED için ek bir vasküler risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (7, 18, 19). Mevcut iki çalışma tavşan korpus kavernosum doku banyoları kullanılarak yapılmış ve Hcy seviyeleri her iki çalışmada da 100 µmol/L ve üzerinde tutulmuştur.

Khan MA ve ark., tavşan kavernal düz kasında bakır ve Hcy'nin etkisini yayınlamıştır (18). Hcy (100µmol/L) karbakol aracılı, endotel bağımlı kavernal düz kas gevşemesini azaltmıştır ve bu etki Cu iyonları eklenmesi ile artırılmıştır. Bu inhibitör etki SOD ve CAT eklenmesi ile kısmi olarak azaltılmıştır. Bu durum süperoksit ve hidrojen peroksidin bağımsız olarak NO aracılı gevşemede etkili olduğunu düşündürmektedir. Hcy ve bakırın, süperoksit üzerinden, ED için bağımsız bir risk faktörü olabilecekleri belirtilmiştir.

Jones RW ve ark. metiyoninden zengin diyet (%2) ile tavşanlarda erken fakat kalıcı HHcy sağlamıştır ve bu hayvanların kavernal şeritleri normal beslenen grubun kavernal şeritleri ile karşılaştırılmıştır (19). Bir ay sonundaki Hcy seviyeleri kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı artmıştı (HHcy grubunda ortalama 214 µmol/L, kontrolde grubunda 16 µmol/ L). Dört hafta sonrası yapılan çalışmada karbakole belirgin bozulmuş gevşeme yanıtı saptanmış ve bununda endotel kaynaklı NO aracılı kavernal gevşemenin bozulduğunu gösterdiği belirtilmiştir. Bu bozulma SOD veya katalaz inkübasyonlarının her ikisiyle geriye dönmüştür. Endotelden bağımsız NO aracılı gevşemeyi ifade eden Sodyum nitroprussid ile oluşturulan gevşeme veya NANC aracılı elektriksel alan stimülasyonu ile oluşturulan gevşeme HHcy' den etkilenmemiştir. Yine aynı çalışmada, kavernal cGMP seviyelerinde belirgin azalma saptanırken, kavernal dokudaki süperoksit düzeylerinde 5 kattan fazla artış bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda Bagi Z. ve ark. daha önce tanımladığı rat hiperhomosisteinemi modelinden yola çıkılarak Grup III' de bulunan ratlara 1gr/kg/gün L-metiyonin oral gavaj yoluyla uygulandı ve diğer yukarıdaki çalışmalardan daha düşük ve orta derecede bir hiperhomosisteinemi durumu amaçlandı (85). Grup II' deki ratlara 0,5 gr/kg/gün L- metiyonin uygulayarak daha

düşük dozlardaki değişimleri gözlemeyi amaçladık. Bu uygulamalar kontrole göre Grup III' de Hcy düzeylerinde yaklaşık 10 katlık anlamlı artış sağlarken, Grup II' de anlamlı artış sağlamamıştır. 1 gr/kg/gün dozunda metiyonin uygulaması bizim çalışmamızda Bagi ve ark. çalışmasındakinden daha yüksek Hcy seviyesine neden olmuştur (ortalama $30 \pm 6 \mu\text{mol/l}$ 'a karşı $61.47 \pm 11,3 \mu\text{mol/l}$). Bunun sebebi bizim metiyonini içme suyuna katmayıp oral gavaj yolu ile uygulamamızdan kaynaklanabilir. Böylelikle rat başına verilen oral metiyonin dozu tam olarak ayarlanabilmiştir. Diğer iki çalışmadaki yüksek Hcy düzeyleriyle karşılaştırıldığında bizim çalışmamızdaki Hcy seviyeleri toplumda daha sık rastlanan hiperhomosisteinemi düzeylerindedir.

Çalışmamızda saptadığımız penis dokusundaki antioksidan enzim düzeyleri şimdiye kadar hiçbir çalışmada hiperhomosisteinematik rat modelinde çalışılmamıştır. Yalnız önceki iki çalışmada da HHcy ile bozulmuş olan KK relaksasyonunun SOD ve CAT ilavesi ile in vitro düzelebildiği gösterilmiştir. Ayrıca Jones RW ve ark. kavernal dokudaki süperoksit düzeylerinde 5 kattan fazla artış bildirilmiştir (19). Çalışmamızda Grup III' de kontrole göre SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Bu durum beklenen artmış oksidatif strese adaptif şekilde yükselmiş antioksidan mekanizmayı gösteriyor olabilir. Benzer sonuçlar HHcy gibi endotelial disfonksiyona yol açan hiperkolesterolemi modelinde belirtilmiştir (108). %2 kolesterol içeren diyetle 2 ay beslenen tavşanlarda kavernal dokudaki süperoksit seviyesinde yükselmeye bağlı KK düz kas gevşemesinde bozulma saptanmıştır. Aynı çalışmada, KK düz kas SOD aktivitesinde artış olduğu bununda bir kompanzasyon mekanizması olabileceği belirtilmiştir. Önemli hücre içi tamponlardan olan indirgenmiş glutatyon ve GSH-Px hücre içindeki sülfidril gruplarının indirgenmiş formda kalmasını, hidrojen peroksidin detoksifiye edilmesini sağlar. Homosisteinemi varlığında hücre içi tamponların indirgenmiş aktivitesinde belirgin azalma görülür (109). Çalışmamızda SOD' de gördüğümüze benzer bir artış kavernal doku GSH-Px düzeylerinde de mevcuttu. Yine bu artışın dokuda oluşan ROS seviyelerindeki artışa cevaben oluşabileceğini düşünmekteyiz. Buna bağlı olarak daha yüksek kan Hcy seviyelerinde ve kronik HHcy durumlarında bu enzimlerdeki tükenmeyle birlikte endotelial disfonksiyonda artış olabilir ve bu konuyla ilgili ileri çalışmalar gerektiğini düşünmekteyiz.

5.2. Hiperhomosisteinemi ve Penil NOS İzoenzim Düzeyleri

Akingba ve Burnett immünohistokimyasal olarak rat penil vasküler ve sinüsoidal endotelinde eNOS belirlemişlerdir. Western blot analizi ile rat penil şaftında nNOS ve eNOS mevcudiyetini göstermiş; nNOS için protein ekspresyonu öncelikle nöronal dokuda lokalize, eNOS kavernal düz kas ve endotele lokalize bulunmuştur (110). NOS izoform ekspresyonlarının birçok kimyasal ve fiziksel stimülasyonla değiştiği belirtilmiştir (111). Orşiektomiye takiben ve androjen replasmanı ile nNOS ve eNOS içeriklerinde değişiklik gözlenmiştir (112,113). Benzer şekilde alloxan ile oluşturulmuş diyabetik rat modelinde, sinüsoidal ve vasküler endoteldeki eNOS yoğunluğu azalmış saptanmıştır (110). Diyabetes mellitus (111,112) ve hiperkolesterolemisi (36) olan hastalarda, penisi innerve eden sinirlerdeki nNOS seviyeleri azalmıştır ve KK' un nörojenik vazodilatasyonu zayıflamıştır.

Asimetrik dimetilarginin (ADMA) metillenmiş arginin rezidülerini içeren proteinlerin proteolizinden oluşan endojen bir NO sentaz inhibitörüdür (113). Artmış plazma ADMA düzeyleri hiperkolesterolemi, HHcy, diyabetes mellitus ve hipertansiyonu olan hastalarda ortaya çıkan bir kardiyovasküler risk faktörüdür (113). NO oluşumunu inhibe etmesinin yanında, ADMA eNOS ayrışmasını artırarak direkt olarak oksidatif stresi artırıyor olabilir (113,114). Yüksek plazma ADMA değerlerinin rat HHcy modelinde (115) ve insanlarda oral metiyonin yüklenmesi ile oluşturulmuş akut HHcy'de (116,117) bozulmuş endotelial fonksiyonla korele olduğu gösterilmiştir. Bu gözlemler, HHcy'de ADMA yükselmesinin NO mevcudiyetini bozduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda, Western blot tekniği ile saptanan eNOS ve nNOS seviyeleri Grup III' de Grup I'e göre anlamlı azalmış bulunmuştur (her ikisi için $p=0,018$). Bu sonuç daha önce tartışılan yayınlardaki gibi HHcy durumunda NOS izoenzim seviyelerinde düşmeyi göstermektedir. Hcy'nin çok az miktarda arttığı Grup II' de eNOS anlamlı azalırken ($p=0,012$), nNOS seviyelerinde belirgin değişiklik saptanmamıştır ($p=0,135$). eNOS seviyesindeki bu erken düşüş endotel dokusunun Hcy düzeylerine hassasiyetinden kaynaklanabilir. Benzer şekilde Jones ve ark. endotelial NO bağımlı relaksasyondaki belirgin bozulmanın yanında NANC liflerin elektriksel alan stimülasyonu ile relaksasyon

sağladıklarını belirtmişlerdir. Aynı zamanda bu verinin, diabetes mellitustan farklı şekilde, HHcy durumunda kavernal fonksiyona nöropatik bir etkinin olmadığını gösterdiğini belirtmişlerdir (19). Tyagi N ve ark. kardiyal mikrovasküler endotelial hücreleri 0-24 saat boyunca 0-100 microM Hcy ile kültüre etmişler, bu uygulamayla bazal NO seviyelerinde bir değişiklik saptamamışlardır. Fakat Hcy belirgin şekilde uyarılabilir NOS'u (iNOS) uyarırken ve eNOS seviyelerini düşürürken, nNOS seviyelerinde bir değişiklik yapmamıştır (118). Bu çalışmada bizim verilerimize benzer şekilde eNOS'un Hcy seviyelerinden daha kolay etkilendiğini, nNOS düzeyindeki değişikliğin daha yüksek Hcy seviyesinde olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda NOS izoenzim seviyelerinin doku NO seviyeleri ile korelasyonunun olmaması HHcy durumunda NO seviyelerindeki değişikliklerin NO yapımından mı yoksa peroksinitrit oluşumunda kullanımıyla mı azaldığını ayırt etmemizi engellemiştir.

Sonuç olarak; oluşturulan rat hiperhomosisteinemi modelinde, Hcy düzeylerindeki orta derecedeki yükselme kavernal doku antioksidan enzimlerinde yükselmeye neden olmuş, bu durumun artmış bir oksidatif strese cevaben oluşmuş olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamız bildiğimiz kadarıyla literatürde ılımlı HHcy oluşturulmuş rat korpus kavernalında eNOS ve nNOS izoenzim seviyelerindeki değişimleri gösteren ilk verileri sağlamıştır. Bu veriler ışığında Hcy seviyelerindeki az miktardaki yükselme bile KK dokusundaki eNOS seviyelerini anlamlı düşürebilmektedir. Orta derecedeki HHcy (31-100 µmol/L) durumlarında hem eNOS hem de nNOS seviyelerinde anlamlı düşme görülmektedir. Vasküler bir risk faktörü olarak hiperhomosisteinemi ve ED ilişkisinin gerek deneysel gerekse klinik çalışmalarla aydınlatılmasıyla etiyolojiye yönelik ED tedavisinde faydalı veriler elde edilebileceğine inanmaktayız.

ÖZET

Rat Hiperhomosisteinemi Modelinde Kavernozaal Disfonksiyonun Antioksidan Sistem Ve Nitrik Oksit Sentaz İzoenzimleri İle İlişkisi

Sınırlı sayıdaki çalışma, hiperhomosisteineminin korpus kavernosumda endotelial disfonksiyon oluşturduğunu ve bunun erektil disfonksiyon nedeni olabileceğini belirtmiştir. Bu çalışmada, hafif ve orta düzeyde hiperhomosisteinemi oluşturulmuş ratların korpus kavernosum dokusundaki antioksidan düzeylerindeki değişiklikleri ve bunun NOS izoenzim düzeyleri üzerine olan etkisini incelemeyi amaçladık.

Deney grupları; kontrol grubu (n=8), 0,5 mg/kg/gün metiyonin verilen grup (n=9) ve 1 gr/kg/gün metiyonin verilen grup (n=9) şeklinde oluşturuldu. Deneyin 1. ayı sonunda ratların anestezi altında kanları ve penis dokuları alınarak deney sonlandırıldı. Plazmada homosistein seviyeleri çalışıldı. Korpus kavernosum dokusunda glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz aktiviteleri ve Western Blot yöntemi ile eNOS, iNOS seviyeleri çalışıldı.

Grup II ve III'de kontrol grubuna göre plazma Hcy seviyelerinde artma gözlenirken, yalnız Grup III'deki yükselme anlamlıydı. Kontrollerle karşılaştırıldığında, SOD düzeylerinde hem Grup II hem de Grup III'de istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. Glutasyon peroksidaz Grup II'de istatistiksel olarak anlamsız bir artış gösterirken, Grup III'de anlamlı bir artış gösterdi.

eNOS Grup II ve Grup III'de kontrole göre düşük saptandı ve bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlıydı. nNOS seviyelerinde Grup II'de Grup I'e göre artış saptanmış, fakat artış istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Bunun yanında Grup III'de Grup I'e göre belirgin bir azalma tespit edildi.

Bu çalışma, Hcy düzeylerindeki orta derecedeki yükselmenin kavernosal dokuda antioksidan enzim aktivitelerinde yükselmeye ve buna ek olarak eNOS ve nNOS seviyelerinde düşmeye neden olduğunu göstermiştir. Etiyolojiye yönelik erektil disfonksiyon tedavisi açısından, hiperhomosisteinemi ve erektil fonksiyon ilişkisinin ortaya konulması için daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: antioksidanlar, erektil disfonksiyon, homosistein, NOS.

SUMMARY

The Relation of Cavernosal Dysfunction with Antioxidant System and Nitric Oxide Isoenzymes in a Rat Model of Hyperhomocysteinaemia

Limited number of studies pointed out that hyperhomocysteinemia causes endothelial dysfunction and it could be a reason for erectile dysfunction. In this study, our aim was to study the effect of mild and moderate hyperhomocysteinemy on antioxidant and NOS levels of rat corpus cavernosum tissue.

Study groups formed as control group (n=8), 0,5 gr/kg/day methionine given group (n=9) and 1 gr/kg/day methionine given group (n=9). At the end of the first month of the study, the blood and penis tissues of the rats were collected under anesthesia. Homocystein levels were studied at plasma. Gluthation peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) activities and eNOS, iNOS levels, with Western blot analyse, were studied at rat corpus cavernosum tissue.

Compared to the control group, plasma Hcy levels were increased in group II and III, but this increase was only significant in group III. There was a statically significance in SOD levels both in group II and group III. While GSH-Px increase was not statically significant in group II, it is observed significant in group III.

eNOS was decreased both in group II and group III, and these results were statically significant. Group II nNOS levels were higher than group I, but the difference wasn't statically significant. Furthermore, there was a significant decrease in group III compared to the control group.

Our study demonstrated that, a moderate increase in plasma homocystein levels causes an increase in antioxidant activities and additionally a decrease in eNOS and nNOS levels. In terms of etiology based erectile dysfunction treatment, to identify the relation between hyperhomocysteinaemia and erectile function, there is a need for further studies.

Keywords: antioxidants, erectile dysfunction, homocystein, NOS.

KAYNAKLAR

1. Aytac IA, Mcknlay JB, Krane RJ: The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int.* 84: 50-56, 1999.
2. 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.* Jan; 151(1):54-61, 1994.
3. Morley JE et al. Relationship of penile branchial pressure index to myocardial infarction and cerebrovascular accidents in older men. *Am J Med*; 84: 445-448, 1988.
4. Jeremy JY, Angelini GD, Khan M et al. Platelets, oxidant stress and erectile dysfunction: an hypothesis. *Cardiovasc Res*; 46: 50-4, 2000
5. Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, Khan MA, Jeremy JY, Morgan RJ. Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? *Cardiovasc Res*; 43: 658-65, 1999.
6. Sullivan ME, Keoghane SR, Miller MA. Vascular risk factors and erectile dysfunction. *BJU Int*; 87: 838-45, 2001.
7. Jones RWA, Rees RW, Minhas S, Ralph D, Persad RA, Jeremy JY. Oxygen free radicals and the penis. *Expert Opinion Pharmacotherapy*; 3: 889-97, 2002.
8. Chung WS, Shim BS, Park YY. Hemodynamic insult by vascular risk factors and pharmacologic erection in men with erectile dysfunction: Doppler sonography study. *World J Urol*; 18: 427-430, 2000.
9. Kawanishi Y et al. Screening of ischemic heart disease with cavernous artery blood flow in erectile dysfunctional patients. *Int J Impot Res*; 13: 100-103, 2001.
10. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nature Med*; 2: 386-9, 1996.
11. Emsley AM, Jeremy JY, Gomes GN, Angelini GD, Plane F. Investigation of the inhibitory effects of homocysteine and copper on nitric oxide-mediated relaxation of the rat isolated aorta. *Br J Pharmacol.* 1999.
12. McDowell I, Lang D. Homocysteine and endothelial dysfunction: a link with cardiovascular disease. *J Nutr*; 130 (Suppl. 2): 369S-72S, 2000.
13. Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu J, Creager MA. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium dependent vasodilatation in humans. *Circulation*; 95: 1119-21, 1997.
14. Fau D, Peret J, Hadjiisky P. Effects of ingestion of high protein or excess methionine diets by rats for two years. *J Nutr*; 118: 128, 1988.
15. Lentz LR, Sobey CG, Piegors DJ et al. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*; 98: 24-9, 1996.
16. Lang D, Kraden MB, Moat SJ et al. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependant relaxation in rabbit aortas. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 20: 422-7, 2000.
17. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*; 320: 454-6, 1986.

18. Khan M, Thompson C, Elmsley A et al. The interaction of homocysteine and copper markedly inhibits the relaxation of rabbit corpus cavernosum: new risk factors for angiopathic erectile dysfunction? *BJU Int*; 84: 720–4, 1999.
19. Jones RW, Jeremy JY, Koupparis A, Persad R, Shukla N. Cavernosal dysfunction in a rabbit model of hyperhomocysteinaemia. *BJU Int. Jan*;95(1): 125-30, 2005.
20. NIH consensus conference: Impotence. NIH consensus development panel on impotence. *JAMA*; 270: 83-90, 1993.
21. Kinsey AC, Pomeroy WB, Martin CE: Sexual behavior in the human male. WB Saunders, Philadelphia, 236-237, 1948.
22. Akkus E, Kadioğlu A, Esen A et al: Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Turkey: A population based study. *Eur Urol*; 41: 298-304, 2002.
23. Alp T, Vatandaşlar F: Anatomı In Tellaloğlu S, Kadioğlu A (eds): Erkek seksüel disfonksiyonu. İstanbul, Nobel Kitabevi, 31-38, 2000.
24. Brooks JD: Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia, İn Walsh PC, Retik BA, Vaughan Jr ED, Wein AJ (eds): *Campbell's Urology*, WB Saunders, Philadelphia,, 41-80, 2002.
25. Hsu GL, Brock G, Martinez-Pineiro L, et al: The three-dimensional structure of the human tunica albuginea: Anatomical and ultrast-ructural levels. *Int J Impot Res*; 4: 117-129, 1992.
26. Goldstein AMB, Padma-Nathan H: The microarchitecture of the intracavernosal smooth muscle and the cavernosal fibrous skeleton. *JUrol*: 144: 1145-1146, 1990.
27. Breza J, Aboseif SR, Orvis BR, et al: Detailed anatomy of penile neurovascular structures: Surgical significance. *J Urol*; 141: 437-443, 1989.
28. Aboseif S, Shinohara K, Breza J, et al: Role of penile vascular injury in erectile dysfunction after radical prostatectomy. *Br J Urol* 73: 75-82, 1994.
29. Kim ED, Blackburn D, McVary KT: Post-radical prostatectomy penile blood flow: Assessment with color flow Doppler ultrasound. *J Urol*; 152: 2276-2279, 1994.
30. Walsh PC, Lepor H, Eggleston JC: Radical prostatectomy with preservation of sexual function: anatomical and physiological considerations. *Prostate*; 128: 492-497, 1983.
31. Marson L, Platt KB, McKenna KE. Central nervous system innervation of the penis as revealed by the transneuronal transport of pseudorabies virus. *Neuroscience*; 55:263, 1993.
32. Foreman MM, Wernicke JF: Approaches for the development of oral drug therapies for erectile dysfunction. *Semin Urol*; 8: 107-112, 1990.
33. Benson GS, Boileau M: The penis: Sexual function and dysfunction. in Gillenwater JJ, Grayhack JT, Howards SS, Mitchell ME (eds): *Adultand Pediatric Urology*, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 1935-1936, 2002.
34. Halata Z, Munger BL: The neuroanatomical basis for the protopathic sensibility of the human glans penis. *Brain Res*; 371: 205-230, 1986.
35. Anderson KE, Wagner G. Physiology of penile erection. *Physiol. Rev.* , 75: 191, 1995.
36. Simonsen U, Garcia-Sacristan A, Prieto D. Penile arteries and erection. *J Vasc Res.* Jul-Aug; 39(4): 283-303, 2002.
37. Dean RC, Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am.*, Nov; 32(4):379-95, 2005.

38. Fournier GR Jr, Juenemann KP, Lue TF, Tanagho EA. Mechanism of venous occlusion during canine penile erection: an anatomic demonstration. *J Urol*; 137:163-7, 1987.
39. Bosch RJ, Benard F, Aboseif SR, et al: Penile detumescence: Characterization of three phases. *J Urol*; 146: 867-871, 1991.
40. Hedlund H, Andersson K: Comparison of the responses to drugs acting on adrenoceptors and muscarinic receptors in human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. *J Auton Pharmacol*; 5: 81-88, 1985.
41. Diederichs W, Stief CG, Lue TF, Tanagho EA: Norepinephrine involvement in penile detumescence. *J Urol*; 143: 1264-1266, 1990.
42. Carati CJ, Goldie RG, Warton A, Henry PJ: Pharmacology of the erectile tissue of the canine penis. *Pharmacol Res Comm*; 17: 951 -966, 1985.
43. Dail WG, McGuffee L, Little S: Responses of smooth muscle strips from penile erectile tissue to drugs and transmural nerve stimulation. *J Auton Pharmacol*; 7: 287-293, 1987.
44. Holmquist F, Hedlung H, Andersson KE: Effects of the alpha-1 adrenoceptor antagonist R-YM12617 on isolated human penile erectile tissue and vas deferens. *Eur J Pharmacol*; 186: 87-93, 1990.
45. McConnel J, Benson GS, Wood J: Autonomic innervation of the mammalian penis: a histochemical and physiological study. *J Neural Transmission*; 45: 227-238, 1979.
46. Diederichs W, Stief CG, Lue TF, Tanagho EA: Norepinephrine involvement in penile detumescence. *J Urol*, 143: 1264-1266, 1990.
47. Christ GJ, Maayani S, Valcic M, Melman A: Pharmacologic studies human erectile tissue: Characteristics of spontaneous contraction and alterations in alpha-adrenoceptor responsiveness with age; disease in isolated tissues. *Br J Pharmacol*; 101: 375-381, 1990.
48. Traish AM, Netsuwan N, Daley J, et al: A heterogeneous population of alpha 1 adrenergic receptors mediates contraction of human corpus cavernosum smooth muscle to norepinephrine. *J Urol*; 153: 222-227, 1995
49. Holmquist F, Andersson K, Hedlund H: Actions of endothelin on isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *Acta Physiol Scand*; 139: 113-122, 1990.
50. Saenz de Tejada I, Garson MP, de las Morenas A, et al: Endothelin: Localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum. *Am J Physiol*; 261:H1078-H1085, 1991.
51. Azodzo KM, Kim N, Brown ML, et al: Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J Urol* 147: 220-225; 1992.
52. Kifor I, Williams GH, Vickers MA, et al: Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function: L Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. *J Urol*; 157: 1920-5, 1997.
53. Blanco R, Saenz de Tejada I, Goldstein I, et al: Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum: II. Acetylcholine synthesis. *Am J Physiol*; 254:H468-H472, 1988.

54. Saenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzoi K, et al: Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med*; 320: 1025-1030, 1989.
55. Draznin MB, Rapoport RM, Murad F: Myosin light chain phosphorylation in contraction and relaxation of intact rat thoracic aorta. *Int J Biochem*; 9:17-928, 1986.
56. Ignarro U, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukoto JM, Rajfer J: Nitric oxide and cyclic GMP formation: upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*; 170: 843-850, 1990
57. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*; 257: 401-403, 1992.
58. Kim N, Azadzoi KM, Goldstein I, Saenz de Tejada I: A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J Clin Invest*; 88: 112-118, 1991.
59. Pickard RS, Powell PH, Zar MA: The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. *Br J Pharmacol*; 104:755-759, 1991.
60. Burnett AL, Nelson RJ, Calvin DC, et al: Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol Med.*; 2:288-296, 1996.
61. Knispel HH, Goessl C, Beckmann R: Nitric oxide mediates neurogenic relaxation induced in rabbit cavernous smooth muscle by electric field stimulation. *Urology*; 40: 471-476; 1992.
62. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, et al: Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, non-cholinergic neurotransmission. *N Engl J Med*; 326: 90-94, 1992.
63. Trigo-Rocha F, Aronson WJ, Hohenfellner M, et al: Nitric oxide and cGMP mediators of pelvic nerve-stimulated erection in dogs. *Am J Physiol*; 264(Heart Circ Physiol 33):H419-H422, 1993.
64. Trigo-Rocha F, Hsu GL, Donatucci CF, Lue TF: The role of cyclic adenosine monophosphate, cyclic guanosine monophosphate, endothelium and nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission in canine penile erection. *J Urol*; 149: 872-877, 1993.
65. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*; 43: 109-142, 1991.
66. Moncada S, Higgs EA: Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J*; 9: 1319-1330, 1995
67. Burnett AL, Tillman SL, Chang TS, et al: Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol*; 150:73-76, 1993.
68. Dail WG, Barba V, Leyba L, Galindo R: Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Celi Tissue Res*; 282: 109-116, 1995.
69. Celtek S, Moncada S: Modulation of noradrenergic responses by nitric oxide from inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*: 204-210, 1997.
70. Moncada S, Higgs EA, Furchgott RF: International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev*; 49: 137-142, 1997.

71. Ignarro U, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukoto JM, Rajfer J: Nitric oxide and cyclic GMP formation: upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*; 170: 843-850, 1990.
72. Leone AM, Wiklund NP, Hokfelt T, Brundin L, Moncada S: Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. *Neuroreport*; 5: 733-736, 1994.
73. Hobbs AJ: Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci*; 18, 484-491, 1997.
74. Beckman JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good the bad and the ugly. *Am. J. Physiol.*, 40: C 1424 – 1437, 1996.
75. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A et al.: Nitric oxide a signalling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34: 879-886, 1999.
76. McCully KS: Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: historical perspectives. *Clin Chem Lab Med.*; 43(10):980-6. Review, 2005.
77. Brattström L, Lindgren A, Israelson B, et al.; Homocysteine and cysteine: Determinants of plazma levels in middle-aged and elderly subjects. *J Intern Med*; 263: 663-41, 1994.
78. Kocabalkan F, Baykal Y, Bozoğlu E. Yaşlılarda kardiyovasküler risk faktörü olarak homosistein. *Geriatrici*; 3(2), 69-73, 2000.
79. Selhub, J., Jacques, P. F., Wilson, P.W.F., Rush, D. & Rosenberg, I. H. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *J. Am. Med. Assoc.* 270: 2693–2698, 1993.
80. Manilow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocysteine, diet cardiovascular diseases. *Circulation*; 99: 178–82, 1999.
81. Weiss, N., Heydrick, S., Zhang, Y. Y., Bierl, C., Cap, A. & Loscalzo, J. Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 34–41, 2002.
82. Matthias, D., Becker, C. H., Riezler, R. & Kindling, P. H. Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis* 122: 201–216, 1996.
83. Tsai, J. C., Perrella, M. A., Yoshizumi, M., Hsieh, C. M., Haber, E., Schlegel, R. & Lee, M. E. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 6369–6373, 1994.
84. Durand, P., Lussier, C. S., Blache, D. Acute methionine load-induced HHcy enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. *FASEB J.* 11: 1157–1168, 1997.
85. Bagi Z, Cseko C, Toth E et al. Oxidative stress-induced dysregulation of arteriolar wall shear stress and blood pressure in hyperhomocysteinemia is prevented by chronic vitamin C treatment, *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* 285 227-228, 2003.
86. N. Li, Y.F. Chen and A.P. Zou, Implications of hyperhomocysteinemia in glomerular sclerosis in hypertension, *Hypertension* 39 (2), 443–448, 2002.
87. Lowry O, Rosenbrough N, Farr L: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
88. Drapper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186: 421-431, 1990.

89. Sun Y, Larry WO, Ying Li. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 34(3): 497-500, 1988.
90. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70(9): 158-169; 1967.
91. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 227: 680-689, 1970.
92. Cornwell, P. E., Morgan, S. L., Vaughn, W. H. Modification of a high-performance liquid chromatographic method for assay of homocysteine in human plasma. *J. Chromatogr.* 671: 136-139, 1993.
93. Zalba G, Beaumont J, San Jose G, Fortuno A, Fortuno Ma, Diez J: Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol. Biochem.* 56(1): 57-64, 2000.
94. Beckman JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good the bad and the ugly. *Am. J. Physiol.* 40:C1424-C1437, 1996.
95. Young IS, Woodside JV: Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 54:176-186, 2001.
96. Darley-Usmar V, White R: Disruption of vascular signalling by the reaction of nitric oxide with superoxide: implications for cardiovascular disease. *Exp. Physiol.* 82:305-316, 1997.
97. Lught DW, Carrier MJ, Anggard EE: Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 47: 457-464, 2000.
98. Warnholtz A et al.: Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis. *Circulation* 99: 2027-2033, 1999.
99. Hink U, Li H, Mollnau H et al.: Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus, *Circ. Res.* 88(2): E14-22, 2001.
100. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 454-456, 1986.
101. Kojda G, Harrison D: Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 43: 562-571, 1999.
102. Witztum JL: The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 344: 793-795, 1994.
103. Tomaian DJFK JR, Vita JA: Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide, *Cardiovasc. Res.* 47: 426-435, 2000.
104. Khan MA, Thompson CS, Mümtaz FH et al., The effect of nitric oxide and peroxynitrite on rabbit cavernosal smooth muscle. *World J. Urol.* 19(3): 220-224, 2001.
105. Katusic ZS, Vanhoutte PM: Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor, *Am. J. Physiol.* 257: H33-H37, 1989.
106. Cartledge IJ, Eardley I, Morrison JFB: Impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation by glycosylated human haemoglobin. *BJUInt.* 85: 735-741, 2000.
107. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG: A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 274: 1049-1057, 1995.

108. Kim SC, Kim IK, Seo KK, Baek KJ, Lee MY; Involvement of superoxide radical in the impaired endothelium- dependant relaxation of cavernous smooth muscle in hypercholesterolaemic rabbits. *Urol. Res.*: 25: 341-346, 1997.
109. Welch GN, Upchurch Jr. GR, Keaney Jr. KF, et al. Homocysteine decreases cell redox potential in vascular smooth muscle cells. *J Am Coll Cardiol.*; 27: 164, 1996.
110. Akinga AG, Burnett AL, Endothelial nitric oxide synthase protein expression, localization, and activity in penis of alloxan induced diabetic rat. *Mol Urol* 5, 189-197, 2001.
111. Vernet, D., Cai, L., Garban, H., Babbitt, M. L., Murray, F. T., Rajfer, J., et al. Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp (type 1) and BBZ/WORdp (type II) rats with erectile dysfunction. *Endocrinology* 136, 5709–5717, 1995.
112. El-Sakka, A. I., Lin, C. S., Chui, R. M., Dahiya, R., & Lue, T. F. Effects of diabetes on nitric oxide synthase and growth factor genes and protein expression in an animal model. *Int J Impot Res* 11, 123– 132, 1999.
113. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 824–33.
114. Vallance P. The asymmetrical dimethylarginine/dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway in the regulation of nitric oxide production. *Clin Sci* 2001; 100: 159–60.
115. Fu Y-F, Xiong Y, Guo Z. A reduction of endogenous asymmetric dimethylarginine contributes to the effect of captopril on endothelial dysfunction induced by homocysteine in rats. *Eur J Pharmacol*; 508: 175, 2005.
116. Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetric dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Clin Sci*; 100: 161–7, 2001.
117. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O, Cooke JP. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*; 108: 933–8, 2003.
118. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stres. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 289(6): H2649-56, Dec 2005.