

**T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKUT İSKEMİK PRIAPİZM MODELİNDE KLOROJENİK ASİTİN İSKEMİ  
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE OLASI KORUYUCU ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**ASSESSMENT OF POSSIBLE PROTECTIVE EFFECTS OF CHLOROGENIC ACID  
ON ISCHEMIC REPERFUSION INJURY IN AN ACUTE ISCHEMIC PRIAPISM  
MODEL**

**Uzmanlık Tezi**

**Dr. Serdar Alparslan BOSTAN**

**Trabzon – 2023**

**T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKUT İSKEMİK PRIAPİZM MODELİNDE KLOROJENİK ASİTİN İSKEMİ  
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE OLASI KORUYUCU ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**ASSESSMENT OF POSSIBLE PROTECTIVE EFFECTS OF CHLOROGENIC ACID  
ON ISCHEMIC REPERFUSION INJURY IN AN ACUTE ISCHEMIC PRIAPISM  
MODEL**

**Uzmanlık Tezi**

**Dr. Serdar Alparslan BOSTAN**

**Tez Danışmanları:**

**Prof. Dr. Rasin ÖZYAVUZ**

**Doç. Dr. İlke Onur KAZAZ**

**Trabzon – 2023**

## TEŐEKKÖR

Bu tez alıőması,

KTÖ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimince desteklenmiőtir (TTU-2021-9732).

## ÖZET

### AKUT İSKEMİK PRIAPİZM MODELİNDE KLOROJENİK ASİTİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE OLASI KORUYUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

#### Giriş:

Peniste oluşan iskemik priapizm durumunda venöz obstrüksiyon ve korpus kavernozaum içerisinde staz meydana gelmektedir. Müdahalede geç kalınması durumunda ise bu, kavernozaal düz kaslarda nekroz, irreversibl korporal fibrozis ve erektil disfonksiyona yol açabilmektedir. Birbiriyle ilişkili birçok mekanizma sonucu devam eden süreçte priapizm sonlanır ve iskemi reperfüzyon hasarı oluşur. Klorojenik asit, iyi bilinen polifenol bileşiklerden biri olup, hücrelerin oksidatif strese karşı serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmasına veya detoksifikasyonunun sağlanmasına ve çeşitli işlev bozukluklarının önlenmesine yardımcı olmaktadır. Kahve çekirdeklerinde doğal biçimde bulunan antioksidan özelliği kuvvetli bileşenlerdir.

#### Amaç:

Sıçanlarda oluşturulan penil iskemi-reperfüzyon modelinde uygulanan klorojenik asitin, priapizm+reperfüzyon hasarı üzerine olası olumlu etkilerinin histolojik ve biyokimyasal açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

#### Gereç ve Yöntem:

Bu deneysel çalışmada Spraque Dawley tipi, 350-400 gr ağırlığında toplam 18 adet erişkin erkek rat kullanılmıştır (3 grup; her bir grupta 6 rat; kontrol, priapizm+reperfüzyon, priapizm+ reperfüzyon+klorojenik asit). Alınan penektomi materyalinde doku TOS, TAS, OSI, GSH, MPO, GRP78, ATF6, CHOP, MDA, SOD, GPx seviyelerindeki değişiklikler ile kurban edilen ratlardan alınan penis dokusunun histolojik özellikleri (kavernöz sinüs konjesyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, tunika albugineada ayrılma ve/veya hemoraji) değerlendirilmiştir.

**Bulgular:**

Biyokimyasal veriler içerisinden istatistiksel olarak anlamlı bulunan değer; doku GRP78' dir. Çalışmamızda histolojik veriler açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunan veri ise tunika albugineada oluşan ayrılma ve/ veya hemoraji olarak izlenmiştir.

**Sonuç:**

Klorojenik asitin, priapizm/ reperüzyon durumunda dokularda oluşabilecek biyokimyasal ve histolojik hasarı engellemede etkili olabileceği kanısı uyanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:**

Priapizm, Klorojenik asit, Reperfüzyon hasarı

## **SUMMARY**

### **ASSESSMENT OF POSSIBLE PROTECTIVE EFFECTS OF CHLOROGENIC ACID ON ISCHEMIC REPERFUSION INJURY IN AN ACUTE ISCHEMIC PRIAPISM MODEL**

#### **Introduction**

In the case of ischemic priapism in the penis, venous obstruction and stasis in the corpus cavernosum occur. Delay in the treatment, may lead to necrosis of cavernous smooth muscles, irreversible corporal fibrosis and erectile dysfunction. As a result of many interrelated mechanisms, priapism ends in the ongoing process and ischemia reperfusion damage occurs. Chlorogenic acid is one of the well-known polyphenol compounds, which helps to protect cells from the harmful effects of free radicals against oxidative stress or to provide detoxification and prevent various dysfunctions. The antioxidant properties found naturally in coffee beans are strong components.

#### **Objective**

It is aimed to evaluate the possible positive effects of chlorogenic acid on priapism+reperfusion injury in a penile ischemia-reperfusion model created in rats from a histological and biochemical point of view.

#### **Materials and Methods:**

In this experimental study, a total of 18 adult male rats of the Sprague Dawley type, weighing 350-400 g, were used (3 groups; 6 rats in each group; control, priapism+reperfusion, priapism+ reperfusion+ chlorogenic acid).

Changes in tissue levels of TOS, TAS, OSI, GSH, MPO, GRP78, ATF6, CHOP, MDA, SOD, GPx in the penectomy material taken and histological characteristics of the penis tissue taken from the sacrificed rats (cavernous sinus congestion, inflammatory cell infiltration, separation and/or hemorrhage in the tunica albuginea) were evaluated.

## **Findings**

The value found to be statistically significant from biochemical data is tissue GRP78. In our study, the data that were statistically significant in terms of histological data were for separation and/ or hemorrhage values in the tunica albuginea.

## **Result**

It has been concluded that chlorogenic acid may be effective in preventing biochemical and histological damage that may occur in tissues in case of priapism/reperfusion.

**Keywords:** Priapism, Chlorogenic acid, Reperfusion injury



# İÇİNDEKİLER

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| İÇİNDEKİLER .....                                                                    | vi |
| 1.GİRİŞ.....                                                                         | 1  |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                               | 3  |
| 2.1. Penis Anatomisi.....                                                            | 3  |
| 2.1.1. Korpus Kavernozum .....                                                       | 3  |
| 2.1.2. Korpus Spongiozum .....                                                       | 4  |
| 2.1.3. Penisin Arteryal Dolaşımı .....                                               | 4  |
| 2.1.4. Penisin Venöz Dolaşımı .....                                                  | 5  |
| 2.1.5. Penisin Lenfatik Drenajı .....                                                | 5  |
| 2.1.6. Penisin İnnervasyonu .....                                                    | 5  |
| 2.2. Penisin Histolojisi .....                                                       | 6  |
| 2.3. Ereksiyon Fizyolojisi .....                                                     | 6  |
| 2.4. Priapizmin Fizyopatolojisi .....                                                | 8  |
| 2.4.1. Kavernozaal Düz Kas Relaksasyonunda Artışa Yol Açan Mekanizmalar .....        | 9  |
| 2.4.2. Kavernozaal Düz Kas Kontraksiyonunda Azalmaya Yol Açan Mekanizmalar .....     | 11 |
| 2.5. İskemi ve Reperfüzyon .....                                                     | 12 |
| 2.5.1. Mekanizmalar .....                                                            | 12 |
| 2.5.2. Antioksidanların Rolü .....                                                   | 18 |
| 2.6. Klorojenik Asit .....                                                           | 23 |
| 2.6.1.Klorojenik Asitin Yapısı ve Organizmadaki Etkileri.....                        | 23 |
| 2.6.2.Klorojenik Asitin Farmakokinetiği ve Emilimi.....                              | 24 |
| 2.6.3.Klorojenik Asitin Etki Mekanizmaları .....                                     | 25 |
| 2.6.4.Klorojenik Asitin Antioksidan Etkisi.....                                      | 25 |
| 2.6.5.Klorojenik Asitin Antiinflamatuvar Etkisi .....                                | 25 |
| 2.6.6.Klorojenik Asitin Hasarlı Bölgede Ters Nötrofil Göçü Etkisi .....              | 25 |
| 2.6.7.Klorojenik Asitin Yan Etkileri .....                                           | 26 |
| 3. MATERYAL VE METOD .....                                                           | 27 |
| 3.1. Çalışma Grupları.....                                                           | 27 |
| 3.2. Biyokimyasal İnceleme Yöntemi .....                                             | 29 |
| 3.2.1 Doku MDA Düzeylerinin Belirlenmesi .....                                       | 30 |
| 3.2.2 Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyelerinin Belirlenmesi .....                | 32 |
| 3.2.3 Doku Glutasyon Peroksidaz (GPx) Seviyelerinin Belirlenmesi.....                | 33 |
| 3.2.4 Doku Glukoz ile Düzenlenen Protein 78 (GRP78) Seviyelerinin Belirlenmesi ..... | 34 |

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.5 Doku Aktifleştirici Transkripsiyon Faktör 6 (ATF6) Seviyelerinin Belirlenmesi .....    | 36 |
| 3.2.6 Doku C/EBP Homolog Protein (CHOP) Seviyelerinin Belirlenmesi .....                     | 37 |
| 3.2.7 Doku Miyeloperoksidaz (MPO) Seviyelerinin Belirlenmesi.....                            | 39 |
| 3.2.8 Doku Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Belirlenmesi .....                                  | 40 |
| 3.2.9 Toplam Oksidan Durumun (TOS) Belirlenmesi.....                                         | 42 |
| 3.2.10 Toplam Antioksidan Durumun (TAS) Belirlenmesi.....                                    | 42 |
| 3.2.11 Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Hesaplanması .....                                   | 42 |
| 3.3. Histopatolojik İnceleme Yöntemi.....                                                    | 42 |
| 3.4. İstatistiksel İnceleme Yöntemi .....                                                    | 43 |
| 4. BULGULAR.....                                                                             | 44 |
| 4.1. Biyokimyasal Bulgular: .....                                                            | 44 |
| 4.2. Histopatolojik Bulgular .....                                                           | 47 |
| 4.2.1. Kontrol Grubu Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları .....                            | 47 |
| 4.2.2. Priapizm/Reperfüzyon Grubu Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları .....               | 48 |
| 4.2.3. Priapizm/Reperfüzyon + Klorojenik Asit Grubu Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları.. | 49 |
| 5. TARTIşMA.....                                                                             | 53 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                                                    | 57 |
| 7. KAYNAKLAR .....                                                                           | 58 |

## KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

|                               |                                                 |
|-------------------------------|-------------------------------------------------|
| AC                            | Adenilat siklazı                                |
| ADA                           | Adenozin deaminaz                               |
| ADK                           | Adenozin kinaz                                  |
| ATF6                          | Aktifleştirici Transkripsiyon Faktör 6          |
| CGA                           | Klorojenik asit                                 |
| BIP                           | Binding immunoglobulin protein                  |
| C                             | Kompleman                                       |
| cAMP                          | Siklik adenozin monofosfat                      |
| CHOP                          | C/EBP Homolog Protein                           |
| DNA                           | Deoksiribonükleik asit                          |
| DPA                           | Dorsal penil arter                              |
| ELISA                         | Enzyme-linked immunosorbent assay               |
| eNOS                          | Endotelyal nitrik oksit sentetaz                |
| ENT                           | Equilibrative Nükleotit Transporter             |
| ERAD                          | ER-ilişkili degradasyon                         |
| ET                            | Endotelin-1                                     |
| ETZ                           | Elektron transport zinciri                      |
| FAD                           | Flavin adenin dinükleotid                       |
| GM-CSF                        | Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör |
| GRP78                         | Glikoz regüle protein-78                        |
| GSH                           | Glutasyon S-Transferaz                          |
| GSHPx                         | Glutasyon peroksidaz                            |
| GSSG                          | Glutasyon disülfid                              |
| GST                           | Glutasyon S-transferaz                          |
| GTP                           | Guanozin trifosfat                              |
| H&E                           | Hematoksilen-eozin                              |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen peroksit                               |
| HO                            | Hemoksijenaz                                    |
| HO1-CO                        | Hemoksijenaz 1-karbonmonoksit                   |
| IFN $\gamma$                  | İnterferon gama                                 |
| iNOS                          | İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz            |
| IR                            | İskemi reperfüzyon                              |
| KDH                           | Ksantin dehidrojenaz                            |
| KO                            | Ksantin oksidaz                                 |
| MCP                           | Monosit kemoatraktan protein                    |
| MDA                           | Malondialdehit                                  |
| MPO                           | Myeloperoksidaz                                 |
| NAD <sup>+</sup>              | Nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu   |
| NADPH                         | Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat           |
| NE                            | Norepinefrin                                    |

|                |                                               |
|----------------|-----------------------------------------------|
| <b>nNOS</b>    | <b>Nöronal nitrik oksit sentetaz</b>          |
| <b>NO</b>      | <b>Nitrik oksit</b>                           |
| <b>NO3</b>     | <b>Nitrat</b>                                 |
| <b>NO-cGMP</b> | <b>Nitrik oksit-siklik guanozinmonofosfat</b> |
| <b>NOS</b>     | <b>Nitrik oksit sentetaz</b>                  |
| <b>O2-</b>     | <b>Süperoksit</b>                             |
| <b>OH-</b>     | <b>Hidroksil</b>                              |
| <b>OH-</b>     | <b>Hidroksil radikali</b>                     |
| <b>OSI</b>     | <b>Oksidatif stres indeksi</b>                |
| <b>PAF</b>     | <b>Platelet aktive eden faktör</b>            |
| <b>PDE</b>     | <b>Fosfodiesteraz enzimi</b>                  |
| <b>PDE5</b>    | <b>Fosfodiesteraz tip 5</b>                   |
| <b>PNL</b>     | <b>Polimorf nüveli lökositler</b>             |
| <b>ROO</b>     | <b>Peroksil radikali</b>                      |
| <b>ROS</b>     | <b>Reaktif oksijen türleri</b>                |
| <b>SAHH</b>    | <b>S-adenozinhomosistein hidrolaz</b>         |
| <b>sGC</b>     | <b>Solubl guanilat siklazi</b>                |
| <b>SOD</b>     | <b>Süperoksit dismutaz</b>                    |
| <b>SOR</b>     | <b>Serbest Oksijen Radikal</b>                |
| <b>TAS</b>     | <b>Toplam antioksidan kapasite ölçümü</b>     |
| <b>TBA</b>     | <b>Tiyobarbitürik asit</b>                    |
| <b>TGF-b</b>   | <b>Transforming growth faktör beta</b>        |
| <b>TNF-a</b>   | <b>Tümör nekroz faktör alfa</b>               |
| <b>TOS</b>     | <b>Toplam oksidan kapasitesi</b>              |
| <b>UPR</b>     | <b>Katlanmamış protein cevabı</b>             |

## ŞEKİLLER

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2. 1 Penisin Enine Kesiti(17) .....                                     | 3  |
| Şekil 2. 2 Penisin arterleri .....                                            | 4  |
| Şekil 2. 3 Penisin venleri .....                                              | 5  |
| Şekil 2. 4 Penisin innervasyonu .....                                         | 6  |
| Şekil 2.5 Flask haldeki korpus kavernozum(26) .....                           | 7  |
| Şekil 2. 6 Ereksiyon haldeki korpus kavernozum(26) .....                      | 7  |
| Şekil 2. 7 Adenosin aracılı hücre içi sinyalleşmenin çalışma modeli(43) ..... | 10 |
| Şekil 2. 8 Klorojenik asidin kimyasal yapısı(119).....                        | 24 |
| Şekil 2. 9 CGA' nın ana metabolik yolu(124).....                              | 24 |



## GRAFİKLER

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Grafik3. 1</b> Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği.....                                     | 31 |
| <b>Grafik3. 2</b> SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği .....                                         | 33 |
| <b>Grafik3. 3</b> GPx ölçümünde kullanılan standart grafiği .....                                         | 34 |
| <b>Grafik3. 4</b> GRP78 ölçümünde kullanılan standart grafiği.....                                        | 36 |
| <b>Grafik3. 5</b> ATF6 ölçümünde kullanılan standart grafiği .....                                        | 37 |
| <b>Grafik3. 6</b> CHOP ölçümünde kullanılan standart grafiği .....                                        | 39 |
| <b>Grafik3.7</b> MPO ölçümünde kullanılan standart grafiği .....                                          | 40 |
| <b>Grafik3. 8</b> GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği .....                                         | 42 |
| <b>Grafik 4.1</b> GRP78 değerlerine ilişkin histogram (GRP78 ng/mg protein cinsinden sunulmaktadır) ..... | 45 |
| Doku TOS ve doku OSI için elde edilen histogramlar ise Grafik 4.2 ve Grafik 4.3' te izlenmektedir. ...    | 45 |
| <b>Grafik 4. 2</b> TOS değerlerine ilişkin histogram .....                                                | 46 |
| (Tos µmol hidrojen peroksit eşdeğeri/L cinsinden sunulmaktadır.) .....                                    | 46 |
| <b>Grafik 4. 3</b> OSI değerleri ile ilişkin histogram.....                                               | 46 |
| (OSI Arbitrary Unit cinsinden sunulmaktadır.) .....                                                       | 46 |

## RESİMLER

|                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Resim 3. 1</b> Konstriktör bant kullanılarak oluşturulan ereksiyon modeli.....                                                                                                                                                                                            | 28 |
| <b>Resim 3. 2</b> Penis diseksiyonu .....                                                                                                                                                                                                                                    | 29 |
| <b>Resim 4. 1</b> Kontrol grubundaki bir deneğe ait penis kesiti. Üretelyum (u), kavernöz sinüs (cs), (H&E x100) .....                                                                                                                                                       | 47 |
| <b>Resim 4. 2</b> Kontrol grubundaki bir deneğe ait penis kesiti. Bağ doku-kollajen lifler (köşeli çift ayraç) ve düz kas (çentikli ok) (Masson trikrom x200). .....                                                                                                         | 47 |
| <b>Resim 4. 3</b> Priapizm/ reperfüzyon grubundaki bir deneğe ait penis kesiti. Ürotelyum (u), korpus spongiosumu çevreleyen tunika albugineada ayrılma ve hemoraji (ok), kavernöz sinüs konjesyonu (yıldız) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başı) (H&E x100). ..... | 48 |
| <b>Resim 4. 4</b> Priapizm/ reperfüzyon grubundaki bir deneğe ait penis kesiti. Bağ doku-kollajen lifler (köşeli çift ayraç) ve düz kas (çentikli ok) (Masson trikrom x200). .....                                                                                           | 48 |
| <b>Resim 4. 5</b> Priapizm/ reperfüzyon + klorjenik asit grubundaki bir deneğe ait penis kesiti. Ürotelyum (u), kavernöz sinüs konjesyonu (yıldız) ve korpus spongiosumu çevreleyen tunika albugineada ayrılma (ok), (H&E x100). .....                                       | 49 |
| <b>Resim 4. 6</b> Priapizm/ reperfüzyon + klorjenik asit grubundaki bir deneğe ait penis kesiti. Bağ doku-kollajen lifler (köşeli çift ayraç) ve düz kas (çentikli ok) (Masson trikrom x200). .....                                                                          | 50 |

## TABLÖLAR

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2. 1</b> Kavernozal düz kaslarda relaksasyon ve kontraksiyonu sağlayan başlıca yollar(37). ....                                      | 8  |
| <b>Tablo 2. 2</b> Adenozin reseptörlerinin fizyolojik etkileri.....                                                                           | 10 |
| <b>Tablo 2. 3</b> Norepinefrinin reseptör üzerinden etkileri.....                                                                             | 11 |
| <b>Tablo 2. 4</b> Endotelin reseptör görevleri .....                                                                                          | 12 |
| <b>Tablo 3.1</b> Deney grupları.....                                                                                                          | 27 |
| <b>Tablo 4. 1</b> Kontrol grubu ile priapizm/ reperfüzyon grubuna ilişkin biyokimyasal veriler* .....                                         | 44 |
| <b>Tablo 4. 2</b> ‘Priapizm / reperfüzyon grubu’ ile ‘Priapizm / reperfüzyon + klorojenik asit grubu’ na ilişkin biyokimyasal veriler * ..... | 45 |
| <b>Tablo 4.3</b> Histolojik verilere ait skorlar .....                                                                                        | 51 |
| <b>Tablo 4.4</b> Kontrol grubu ile priapizm/reperfüzyon grubuna ilişkin histolojik veriler.....                                               | 51 |
| <b>Tablo 4.5</b> Priapizm/reperfüzyon ve priapizm/reperfüzyon + klorojenik asit gruplarına ilişkin histolojik veriler .....                   | 52 |



# 1.GİRİŞ

Priapizm tanım olarak cinsel istek, orgazm ve uyarıdan bağımsız yaklaşık 4-6 saat süren uzamış ereksiyon halidir. Priapizm tedavisine başlamadan önce priapizmin etiyolojisinin ortaya konulması gerekmektedir. Priapizm, patofizyolojik olarak 3 başlık altında incelenmektedir: Priapizmin, iskemik, non-iskemik ve tekrarlayan (stuttering) olmak üzere 3 ana tipi vardır(1). İskemik (veno-oklüzif, düşük akımlı) priapizm en sık karşılaşılan tiptir. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar göstermiştir ki, hipoksi ve asidoz 4 saat sonra kavernoza fibrozise neden olmaktadır ve bu süreden önce priapizmin tedavi edilmesi kavernoza fibrozisi önleyebilmektedir(2). Kavernoza kan gazı analizleri sıklıkla hipoksi, hiperkapni ve asidoz ile karakterizedir. İskemik priapizmde, kavernoza düz kasta ultrastruktural değişiklikler 12 saat sonra, fokal nekroz 24 saat sonra, son olarak geniş nekroz ve fibroblast benzeri hücrelerin transformasyonu ise 48 saat sonra görülmektedir(3). Tedavi edilmezse veya tedavide geç kalınırsa (>24 saat) kavernoza düz kaslarda nekroz, irreversible korporal fibrozis ve erektil disfonksiyon meydana gelmektedir(4). Uzamış anoksi korporal düz kas kasılmasında anlamlı azalma, düz kas ölümüne ve korpus kavernoza fibrozise neden olmaktadır. İskemik priapizmin deneysel hayvan modellerinde lipid peroksidasyonunun reaktif oksijen radikalleri tarafından verilen zararın belirleyicisi olduğu, iskemik priapizm süresince ve daha sonrasında hemooksijenaz üretimini artırdığını göstermişlerdir(5,6). İskemi bağımlı fibrozisin artışı içeren patofizyolojik mekanizmalar hipoksi bağımlı büyüme faktörlerinin upregülasyonlarıdır. TGF-beta doku onarımında hayati önem taşıyan bir sitokindir. Bununla birlikte oksidatif stresin ortaya çıktığı durumlar ve hipoksi sırasında aşırı miktarları doku hasarına ve skar dokusuna ve TGF-beta'nın upregülasyonuna neden olabilmektedir. Priapizmin sonlanması ile birlikte iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı meydana gelmektedir. Reperfüzyon iskemik dokunun korunması için gerekli olmasına rağmen, reperfüzyonun kendisi İ/R hasarını meydana getiren patofizyolojik süreci başlatmaktadır(6). TGF-b1 iskemik priapizmde fibrozise neden olan araçlardan birisidir. TGF-b1 nötralize edici antikorlar kısa süreli priapizm durumlarında TGF b1'in fibrotik etkilerini azaltmıştır(7).

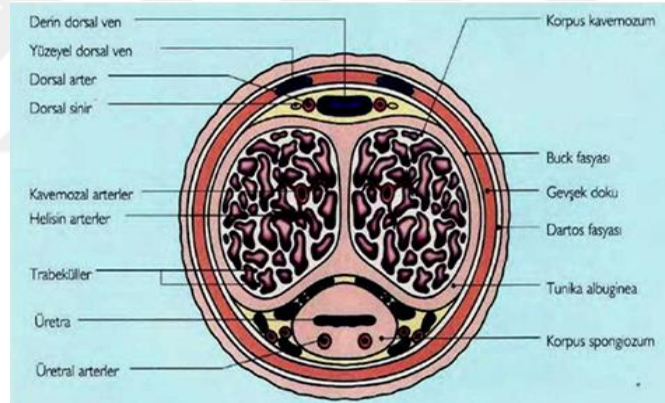
Biyolojik membranlarda bulunan reaktif oksijen türleri, poliansatüre yağ asitlerinde (PUFA) oksidasyon yaparak lipit peroksidasyonunu başlatmaktadır(8). Peroksidasyon işlemi sonucunda meydana gelen lipit peroksitleri (Siklik peroksit, lipit peroksit ve siklik endoperoksit) sekonder veya son ürünler olan Malondialdehit (MDA), 4-Hidroksinonenal (HNE) ve hegzenal isimli aldehitlere dönüşmekte ve doku düzeylerinde artışa sebep olmaktadır(9,10).

Klorojenik asit (CGA) insan diyetindeki en yaygın polifenollerden biridir ve doğal polifenolik bir antioksidandır. Klorojenik asit, elma, yaban mersini, çay, kahve, patates dahil olmak üzere birçok meyve ve sebzede bulunan aktif bir maddedir. Yeşil kahve, doğada bulunan ana klorojenik asit kaynağıdır. Klorojenik asit, antioksidan, antiapoptotik, antienflamatuar, antifibroz etkiye sahiptir(11). Klinisyenlerin İ/R hasarı sonrası oluşan hasarı azaltabilecek ajanlara olan ihtiyaçları ve bu konudaki çalışmalara duyulan ilgi hala güncelliğini korumaktadır. Yapılan literatür taramalarında klorojenik asidin pek çok İ/R modelinde doku hasarını azaltıcı etkileri ortaya konulmuştur(12,13). Bununla birlikte deneysel testis İ/R modelinde klorojenik asidin oksidatif stres ve iskemiye bağlı gelişen ER stresi üzerine etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışmalar bulunmamaktadır (14,15). Buna rağmen klorojenik asidin penis kavernöz dokusunda oluşan hasara karşı olası etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Penis Anatomisi

Penis, iki adet kavernöz, bir adet spongioz cisimden ve bu yapıları çevreleyen fasial yapılarından meydana gelmiş, erkeklerde anatomik ve fizyolojik olarak genitoüriner sistemin son parçası olan kompleks bir yapıdır. Korpus penis ve perinide yer alan dıştan izlenmeyen radiks penis olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Penis tabakaları içten dışa doğru sıralanırsa; korpus spongiozumdan, korpus kavernozum, tunika albuginea, buck fasyası, dartos tabakası ve deriden meydana gelmektedir. (Şekil 2.1) Penis ayrıca glans penis, distal üretranın 2/3'ü, bir çift korpus kavernozum, korpus spongiozum, iskiokaverno ve bulbospongioz kaslarını da içermektedir(16).



Şekil 2. 1 Penisin Enine Kesiti(17)

#### 2.1.1. Korpus Kavernozum

Penil ereksiyonun sağlanmasında asıl sorumlu yapı olup, çok sayıda alt tabakadan oluşan, distal tarafan birbirine bağlı bir çift yapıdır. Pubik kemğin altından iki ayrı krus şeklinde ilerler. Bu iki krus yine ayrı olarak iskiyon pubisteki tuberositas iskiü üzerine yapışırlar. Simfizis pubis ile kavernöz cisimler arasındaki ligamentum suspensoryum, kruslardan sonra ikinci fiksasyon noktasını oluşturur. Ereksiyon haline gelen peniste korpus kavernozum içerisinde bulunan sinüzoidler kan ile dolar ve sertleşme sağlanır. İki korpus kavernoza arasında bulunan septumdaki

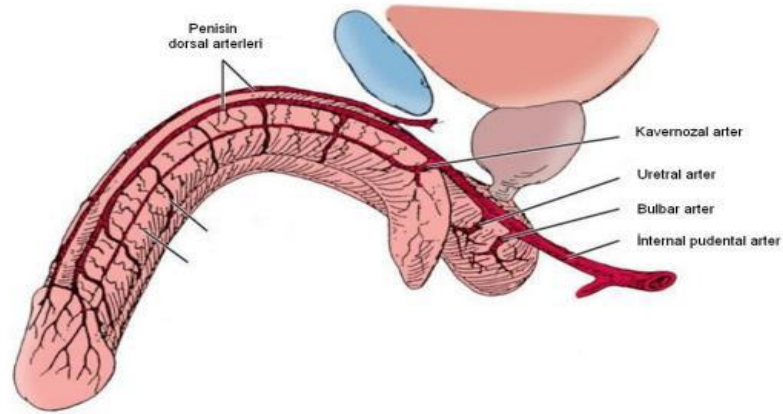
fenestrasyonlar, karşılıklı sinüzoidler arasında kan geçişini sağlamakla görevlidir(16,17)

### 2.1.2. Korpus Spongiosum

Distal üretranın üçte ikilik bölümü içerir ve glans penisi oluşturur. İki kavernoöz cisim arasından seyrederek. Dış tabaka veya intrakorporeal kolonların bulunmamasından dolayı, erekte haldeki basınç spongios cisimde düşük kalır. Dıştan tunika albuginea ile sarılmıştır. Bu kılıf elastik liflerden oldukça zengindir(18).

### 2.1.3. Penisin Arteriyel Dolaşımı

Penis arterial dolaşımını internal iliak arterden köken alan internal pudental arter sağlar. Bu arterlerin her biri üç dala ayrılarak seyrederek. (Şekil 2.2) Bunlar sırasıyla sinüzoidleri ve erektile dokuyu besleyen derin penis arteri, ereksiyonda glansın dolgunluğundan sorumlu olan penis dorsal arteri, üretra ve spongiosumu besleyen bulboüretal arterdir (19).

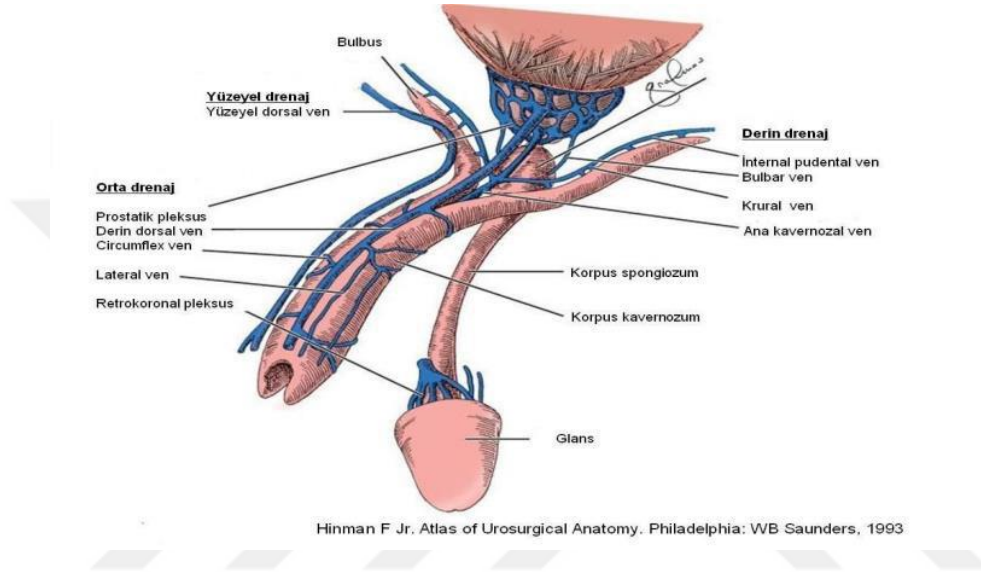


Redman JF. Anatomy of the genitourinary system. In: Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Duckett JW (eds). Adult and Pediatric Urology, 2nd ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1991, pp. 3-62

Şekil 2. 2 Penisin arterleri

#### 2.1.4. Penisin Venöz Dolaşımı

Buck fasyasını lateralinde bulunan yüzeyel dorsal ven safen vene drene olur. Bu ven prepisyumun ve glansın periferal kısmının venöz drenajını sağlar. Buck fasyası altında, dorsal arterlerin arasından ise derin dorsal ven ilerler. Korpus kavernosumlardan ve spongiosumdan köken alan sirkumfleks venler, derin dorsal vene drene olurlar. Penisin crura ve hilumunu ise kavernöz venler boşaltırlar. (Şekil 2.3) Kavernozaal yapıların venöz kanı preprostatik pleksus ve internal venler aracılığıyla internal iliak vene olur(20).



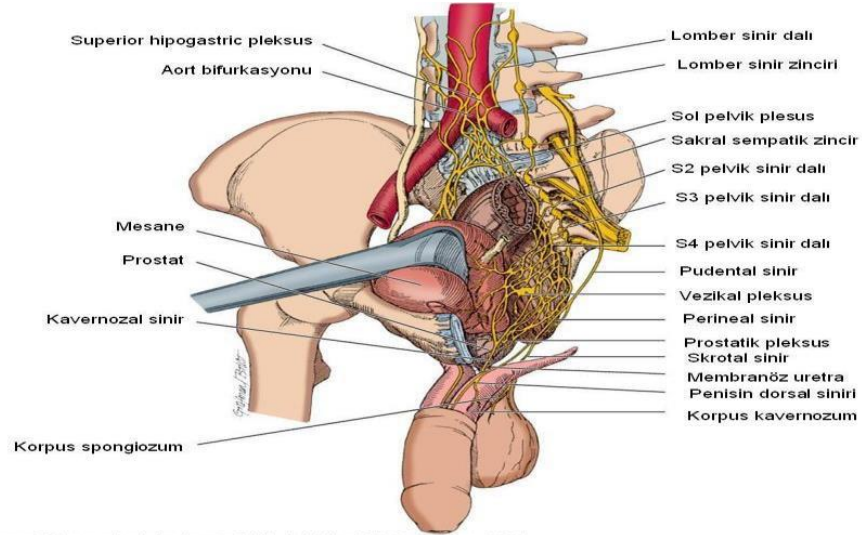
Şekil 2. 3 Penisin venleri

#### 2.1.5. Penisin Lenfatik Drenajı

Penis cildinin lenfatik drenajı subinguinal ve yüzeyel inguinal lenf nodlarına olur. Üretranın proksimalinden gelen lenfatikler hipogastrik ve ana iliak lenf nodlarına drene olurlar. Glans penisin lenfatik drenajı ise subinguinal ve eksternal iliak lenf nodlarına olur(21).

#### 2.1.6. Penisin İnnervasyonu

Penisin innervasyonu otonomik ve somatik sistemler sayesinde sağlanmaktadır. İnnervasyon iki önemli sinir grubu aracılığıyla sağlanır. Bunların birincisi plexus pudendalis'ten çıkan nervus pudendus'tur. N. pudendus pelvis tabanı kaslarına motor dallar verir ardından N. dorsalis penis olarak uzanır. Diğer sorumlu sinir ise N.corporis cavernosi penis majör" ve "N.corporis cavernosi penis minör" dür(22). (Şekil 2.4)



Hinman F Jr. Atlas of Urosurgical Anatomy. Philadelphia: WB Saunders, 1993

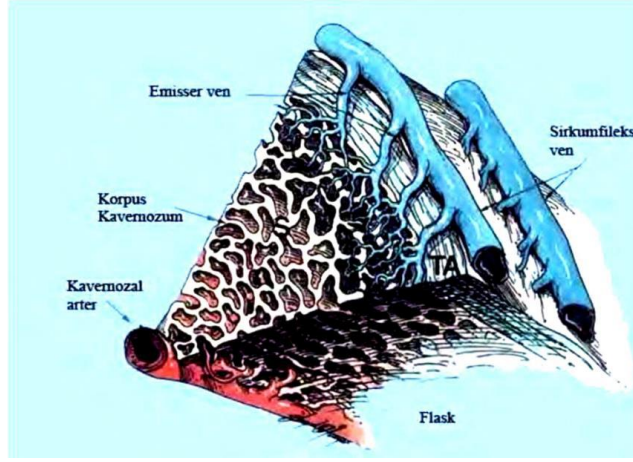
**Şekil 2. 4** Penisin innervasyonu

## 2.2. Penisin Histolojisi

Penis başlıca korpus kavernosumlar (erektile dokudan oluşur), korpus spongiosum ve üretrayı içerir. Kavernoza cisimler, süngerimsi cisim ve glans penis; düz kas, intrakavernoza destek ve endotelle kaplı sinüzoidlerden oluşur. Sempatik ve parasempatik, non-kolinergik sinir uçları sıklıkla damarların çevresinde ve düz kasların yakınında görülür. Penil üretranın çoğunluğu yalancı çok katlı silindirik epitelle döşelidir. Glans peniste ise çok katlı yassı epitel görülür. Mukozanın altında elastik doku, bağ doku ve düz kastan oluşan submukozal alan mevcuttur. Mukus salgılayan Littre bezleride bu alanda izlenmektedir(23). (Şekil 2.1)

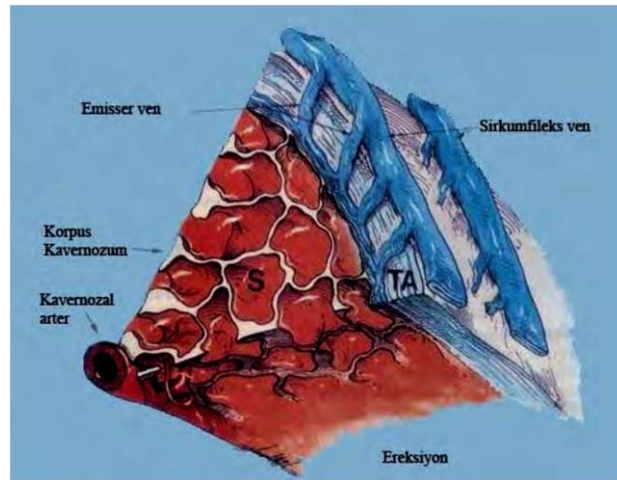
## 2.3. Ereksiyon Fizyolojisi

Ereksiyon, duyuşal uyarıları sentral sinir sistemi ve hipotalamo- hipofize aksa işleyen bir sistem sayesinde sağlanmaktadır(24). Seksüel ya da taktile uyarılar neticesinde sinir sistemi (merkezi, spinal ve periferik) ve vasküler endotel, kavernoza arterioller, venüller, sinüzoidal düz kasların birbiriyle olan etkileşimleri sonucu ereksiyon meydana gelmektedir(25). Omurilikten penise ulaşan parasempatik lifler ile ereksiyon sağlanır. Bu parasempatik sinir liflerinden, asetilkolin yerine nitrik oksit salgılanmaktadır.



**Şekil 2.5** Flask haldeki korpus kavernozum(26)

Başlıca psikojenik, refleksojenik, nokturnal olmak üzere üç çeşit ereksiyon bulunur. Fizyolojik açıdan ereksiyona baktığımızda flask (Şekil 2.5), tūmesans, tam ereksiyon, rijid ereksiyon, detūmesans olmak üzere beş evresi bulunmaktadır(27). Alfa- adrenerjik sistemin aktive olması ile flask fazda sinüzoidallerin kontrakte olduğu görülmektedir(28). Uyarı ile birlikte nörotransmitter sağlanması arterlerde gevşeme, venöz dönüşte azalma ve sinüzoidallerde kanın toplanması ile birlikte tūmesans fazına geçilir, kavernoöz cisimlerdeki basıncın artması ile de ereksiyon hali sağlanır. Buna ek olarak iskiyokavernöz kasının kasılmasında (100 mmHg civarında devam ettirilir) tam ereksiyonu sağlar(25). Şekil(2.6) Bu fazda penise kan akımı ve venöz drenaj olmaz, bir nevi priapizmin kısa fizyolojik bir örneği gerçekleşmiş olur(29). Arteriallerde oluşan akımın azalması ve venöz dönüşün başlaması ile ereksiyon bozulur ve son evre olan detūmesansa geçilir(30).



**Şekil 2. 6** Ereksiyon haldeki korpus kavernozum(26)

## 2.4. Priapizmin Fizyopatolojisi

Priapizm etiyoloji ve klinik gidişine göre 3 ana başlık altında sınıflandırılabilir. Bunlar iskemik (veno-okluzif, düşük akımlı), non-iskemik (yüksek akımlı, non iskemik yüksek, iyi oksijenasyonlu veya arteriyel priapizm) ve tekrarlayan (intermittan) priapizm şeklinde sınıflandırılır(4). İskemik priapizm ise bir çeşit kas kompartman sendromudur.

### İskemik Priapizm;

Olgularının büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır( %95 )(31). Ana sebep idiyopatik olsa da, ilaç, alkol, travma ve orak hücre anemisinde sebepleri arasında gösterilmektedir(32). Priapizme ağrı ve rijid ereksiyon eşlik eder. Aspire edilen kavernoza dokulardaki kan iskemik paternde olup (hipoksi, hiperkapni, asidoz) acil tedavi gerekmektedir. Olgularda tedavide 24 saat geçilirse, düz kaslarda nekroz, irreversibl korporal fibrozis ve erektil disfonksiyon gelişir(31).

### Yüksek akımlı Priapizm;

Burada kavernoza arter akımlarında düzensizleşme ve buna bağlı olarak izlenen kalıcı ereksiyon durumu mevcuttur. Daha nadir görülür ve genelde kruslara veya korpusa olan travmalarla ilişkilendirilir(33–35).

### Tekrarlayan Priapizm;

Aralıklarla seyreden ağrılı ereksiyon ve detümesans durumu mevcuttur. Orak hücre anemili hastalarda daha sık görülür. Patofizyolojisi net değildir(36).

Kavernoza düz kaslarda relaksasyon ve kontraksiyonu sağlayan başlıca yollar tabloda belirtildiği üzere incelenecektir (37). (Tablo 2.1)

**Tablo 2. 1** Kavernoza düz kaslarda relaksasyon ve kontraksiyonu sağlayan başlıca yollar(37).

| <b>Kavernoza relaksasyon</b>                            | <b>Kavernoza kontraksiyon</b>                |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Nitrik oksit-siklik guanozinmonofosfat (NO-cGMP) yolağı | Fosfodiesteraz tip 5 (PDE5) enzim aktivitesi |
| Adenozin yolağı                                         | Norepinefrin (NE)                            |
| Hemoksijenaz 1-karbonmonoksit (HO1-CO) yolağıdır        | Endotelin-1 (ET)                             |
|                                                         | Rho-kinaz                                    |

Priapizm etiyolojisi incelendiğinde penis düz kas tonusu üzerinde kontraksiyonda etkili olan mekanizmalarda azalma, relaksasyonda etkili mekanizmalarda ise artma beklenmektedir(7,38,39).

#### **2.4.1. Kavernozaal Düz Kas Relaksasyonunda Artışa Yol Açan Mekanizmalar**

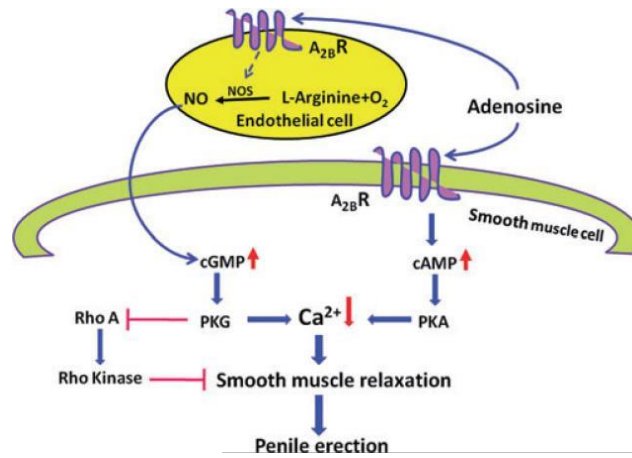
##### **NO-cGMP yolağı:**

Bu mekanizma penil ereksiyonda ve korpus kavernoza düz kaslarının gevşemesi ile ereksiyonun sağlanmasında en önemli non-adrenerjik, non- kolinerjik yoldur(40). Sildenafil kullanıma bağlı olarak gelişen NO aktivitesinin azalması ve ereksiyonun başarıyla sağlanmasında buna desteklemektedir(40,41). Kavernozaal düz kasın gevşemesi için asetilkolin, endotel ve sinir hücrelerinden nitrik oksit sentetaz (NOS) salınımını uyarır. NOS'un 3 formu olup sırasıyla nöronal nitrik oksit sentetaz (nNOS); ereksiyonun başlamasından, endotelial nitrik oksit sentetaz (eNOS); sürdürülmesi sağlar. Ayrıca immün hücreler ve makrofajlardan salınan indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS)' da sentezlenir. Sentezlenen NO düz kas hücresi içerisinde solubl guanilat siklazı (sGC) aktive etmektedir. sGC ise ereksiyon sırasında guanozin trifosfattan (GTP) cGMP oluşumunu sağlamaktadır. cGMP' nin bu mekanizmada iki görevi bulunmaktadır. Bunlardan ilki endoplazmik retikulumda kalsiyum sekestre ederken, diğeri ise voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını inhibe ettirmektir. Buna bağlı olarak hücre içerisinde CA düşmesine bağlı olarak düz kaslarda gevşeme sağlanır ve tımesans ortaya çıkar. Bu mekanizmadaki değişen etkinliklerin olması priapizm patofizyolojisinde etkili olabileceği düşünülmüştür(42).

##### **Adenozin yolağı:**

Vasküler dokularda oksijen ihtiyacına göre kontraksiyon ya da relaksasyon sağlayabilmektedir. Buna bağlı olarak priapizm de adenozininde etkili olabileceği gösterilmiştir(43). Hipoksik ortamda, artan oksijen ihtiyacına bağlı olarak ekstrasellüler ortamda ATP'den adenozin sentezlenmektedir. Hücre içinde ise AMP'den adenozin sentezlenmektedir. Bu iki ortamda sentezlenen adenozin miktarı equilibrative nükleotit transporter (ENT) ile dengede tutulmaktadır(43). Adenozin fizyolojik etkilerini A1, A2 , A3 reseptörleri üzerinden yapmaktadır.(44,45). (Tablo 2.2)(Şekil 2.8) Adenozin görevini tamamladıktan sonra ise adenozin deaminaz (ADA) enzimi aracılığıyla inosine, ayrıca intrasellüler adenozin kinaz (ADK) enzim aracılığıyla AMP'ye ve s-adenozinhomosistein hidrolaz (SAHH) aracılığıyla da adenozinhomosisteine metabolize olmaktadır(43). Buna

bağlı olarak priapizm patofizyolojisinde sentezlemede artış, yıkımında azalma olması olası bir etken olarak izlenmektedir.



Şekil 2. 7 Adenosin aracılı hücre içi sinyalleşmenin çalışma modeli(43)

Tablo 2. 2 Adenozin reseptörlerinin fizyolojik etkileri

|                 | A1 reseptörü                                                                                                                                                         | A2 reseptörü                                                                                                         | A3 reseptörü                                                                                                                                                        |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ADENOZİN</b> | G1 ve G0 proteinlerine bağlanarak, ATP'den cAMP oluşumunu aktive eden adenilat siklazı inhibe etmekte ve azalan cAMP düz kasta kontraksiyona eğilimi arttırmaktadır. | G5 proteinine bağlanarak adenilat siklazı (AC) aktive etmektedir. Adenilat siklaz ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü sağlar. | G1 ve Gq proteinlerine bağlanarak, ATP'den cAMP oluşumunu aktive eden adenilat siklazı inhibe etmekte ve azalan cAMP düz kasta kontraksiyona eğilimi arttırmaktadır |

### HO-1-CO yolağı:

Canlı hücrelerde çok önemli işlevi olan hemoproteinlerin yapısında bulunmaktadır(46). Heme proteini, düz kasta ve endotelde bulunan hemoksijenaz (HO) enzimi ile yıkılmaktadır ve bu enzimin üç izoformu bulunmaktadır. İnsanlardaki en önemli izoform HO1 hipoksi, stres ve reaktif oksijen ürünlerinin varlığında yükselmekte ve heme proteinini yıkarak CO, Fe(II) ve biliverdinin açığa çıkmaktadır(46). İskemi sonucu artan HO1 aktivitesi ile CO seviyelerinde artış izlenir, bu guanilat siklazı aktive ederek c-GMP seviyesinin artmasına, K kanal aktivitesini artırarak ya da sitokrom p450 monooksijenaz yolunu inhibe ederek düz kas relaksasyonunu sağlamaktadır. Jin YC ve arkadaşları ratlarda yapılan deneysel priapizm modellerinin 24 saatlik geç dönemlerinde kavernoza dokuda HO-1 aktivitesini kontrol grubuyla kıyasladıklarında altı kat yüksek oranlarda belirlemişlerdir(5).

## 2.4.2. Kavernozal Düz Kas Kontraksiyonunda Azalmaya Yol Açan Mekanizmalar

### Konvansiyonel PDE5 Yolunda Disregülasyon

Penis düz kas gevşemesi ve ereksiyon sağlanmasında en etkin rol cGMP üzerinden sağlanır. cGMP ise PDE yolağı üzerinden hidrolize edilerek inaktif formu olan GMP'ye dönüşür. PDE'nin peniste en aktif izoenzim formu PDE5'tir. Bu yüzden penil düz kas relaksasyon ve kontraksiyon düzenlenmesinde cGMP kadar PDE5 enzimi de etkin rol oynamaktadır. Dolayısıyla bu iki mekanizma arasında oluşan aksaklıklar erektil disfonksiyon veya priapizme neden olabilmektedir(47,48). Ayrıca orak hücre anemili hastalarda Bialecki ve Bridges yaptığı araştırmalara göre, 50 mg sildenafilin tekrarlayan priapizm ataklarını önlediği bildirmiştir(49). Bunu destekler nitelikteki bir diğer çalışmada ise Burnett ve arkadaşları da günlük 25 veya 50 mg sildenafil veya haftada 3 defa 5 mg tadalafil tedavisi ile 3-11 ay takip sonucunda, orak hücre anemili hastalarda priapizm nüksünde belirgin azalma görüldüğünü belirtmişlerdir(50).

### Azalmış Norepinefrin (NE) Cevabı:

Norepinefrin, penil arteriyel ve sinüzoidal düz kaslar üzerinde kontraksiyon yaparak tūmesansı sonlandıran mediatörlerin başında gelir. Penil arteriyel düz kaslarda alfa adrenerjik lifler ve reseptörlerinin beta reseptörlerinden on kat daha yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir(51). Norepinefrin, düz kas hücre zarında alfa 1 ve alfa 2 reseptörleri üzerinden etki göstermektedir ( Tablo 2.3) (52).

**Tablo 2. 3** Norepinefrinin reseptör üzerinden etkileri

|                     | <b>Alfa 1 reseptör</b>                                                                                                                  | <b>Alfa 2 reseptör</b>                                                                  |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Norepinefrin</b> | G-proteine bağlı fosfolipaz C aktivasyonu sağlanmakta, hücre içi depolardan kalsiyum iyonu salınması vazokonstriksiyona sağlanmaktadır. | Adenilat siklaz enzimini inhibe eder, cAMP oluşumunu azaltarak penil detūmesans sağlar. |

### Endotelin Etkinliği:

Endotelin, endotel hücrelerinden salgılanan vücudun en güçlü vazokonstrüktör maddelerinden biridir. Etkisini temel olarak iki reseptör üzerinden gösterir. Bu iki reseptörün

yerleşim yerleri ve endotelin peptidleri bağlama affiniteleri birbirinden farklıdır( Tablo 2.4) (53,54).

**Tablo 2. 4** Endotelin reseptör görevleri

| <b>Endotelin</b> | <b>ETA</b>                                                                                                             | <b>ETB</b>                                                                                                                  |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  | Damar düz kas hücrelerinde bulunup vazokonstriksiyonu uyarmaktadırlar. Bu cevap fosfolipaz C aktivasyonu ile sağlanır. | Endotelial hücrelerde bulunur ve NO, PGI2 üretimini artırmak yoluyla vazodilatasyona ve antiproliferatif etkilere yol açar. |

ET1, ETA reseptörleri üzerinden vazokonstriktör oluşturmaktadır. Hipoksi gibi patolojik durumlarda ET-1 bir savunma mekanizması rolü üstlenerek, ETB reseptörü üzerinden vazodilatasyon ortaya çıkartmaktadır. Kavernozal düz kaslarda oluşan iskemi sonucunda ET1'in ETB reseptörleri üzerinden düz kas relaksasyonu yapması, ereksiyonun uzamasında etkin olmaktadır(55).

## **2.5. İskemi ve Reperfüzyon**

### **2.5.1. Mekanizmalar**

Dokulara kan sağlayan damarların, bir pıhtı veya mekanik bir nedenle tıkanıp doku beslenmesinin bozulmasına iskemi denir. Doku kanlanmasının ilaç veya mekanik etkenler ile yeniden sağlanmasına ise reperfüzyon denmektedir. Reperfüzyon sonucu iskeminin verdiği hasar daha da genişleyebilir ve bu durumda iskemi – reperfüzyon hasarı (IR) olarak adlandırılır(56).

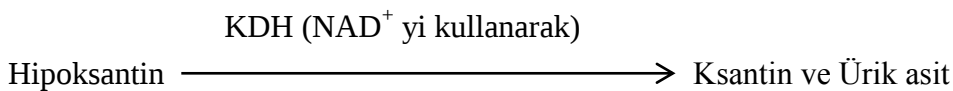
İskemik süreç boyunca hücre düzeyinde oluşan iyon değişimleri, proinflatuar sitokinlerin lökosit adezyon molekülleri yapımında artma , antioksidan yapılarda azalma hücrenin reperfüzyon sırasında meydana gelecek hasara karşı savunmasız kalmasını sağlar(56). Reperfüzyon sonunca apoptoz kaspaz-8 ve kaspaz 3 aracılığı ile başlarken, bu süreç aynı zamanda mitokondrinin çeper yapısında hasara sebep olur. Buda nükleer DNA' nın yıkılarak sonunda hücre ölümüne ve sitokrom C' nin sitoplazmaya salınımına neden olur(57,58). İskemi-reperfüzyonda ortaya çıkan hasardan başlıca sorumlu olan Serbest Oksijen Radikal (SOR) sorumludur. Bunların oluşumu da genel olarak 4 biyokimyasal mekanizma sonucu meydana gelmektedir(8,59).

- I) Ksantin oksidaz aracılı
- II) Mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ)
- III) Nitrik oksit sentaz
- IV) Fagositik hücre aracılı

İskemik dönemde dokuya gelen kan akımı azalır veya durur. Buna hücrel oksidatif fosforilasyon azalması, adenosin 5'-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezinin azalması eşlik etmektedir(60). Mitokondriyal üretimin durması, hücre içerisindeki ATP yıkımının artmasına ile oluşan enerji kaybı, membrandaki enerji bağımlı iyon pompalarında fonksiyon bozukluğuna ve hücre içi metabolizmanın anaerobik faza doğru kaymasına neden olmaktadır. Laktat ve hidrojen birikimi ile hücre içi pH düşer ve asidoz oluşur. Hücre içi artan hidrojen yükünü dengelemek için  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  pompası ile artan hidrojen hücre dışına atılır ve  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  pompası ile de kalsiyum hücre içine yer değiştirir(61). Hasarlanan endoplazmik retikulumdan hücre içine kalsiyum salınımı artar. Hücrede enerji azalmasına bağlı olarak da hücre membranında bulunan  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATP az pompası inhibe olur. Sonuç olarak hücre içinde  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  iyon konsantrasyonları artmaktadır. Hücre içinde artan  $\text{Ca}^{2+}$  iyonunu, hücre için sitotoksiktir(62,63).

Oluşan bu durum hücre içindeki iyon dengesinin değişimine, buda antioksidan enzim oluşumunda azalmaya sebep olur. Reperfüzyon gibi bir dönemde ise hücre buna dayanıksız hale gelir. İskemi döneminde hücrelerde adenosinin artması ve bunun hücre dışına geçerek inozin ve hipoksantin'e parçalanmasıyla sonuçlanır. Dokuda biriken bu pürin metabolitleri ksantin dehidrojenazın (KDH), ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlar altında hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı  $\text{NAD}^+$  (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu) dir.

#### **Normal şartlarda:**



Hipoksi ya da iskemi durumunda ise  $\text{KDH} \rightarrow \text{KO}$ 'a dönüştüğünden hipoksantin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır(64). Son iki basamakta ürün olarak reaktif oksijen türlerinden  $\text{O}_2^-$  (süperoksit) oluşur. Normal fizyolojik koşullarda oluşan  $\text{O}_2^-$ , süperoksit dismutaz (SOD) ile

önce hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), sonra katalaz etkisi ile suya dönüşür. Son iki basamakta ürün olarak reaktif oksijen türlerinden  $O_2^-$  (süperoksit) oluşur. Normal fizyolojik koşullarda oluşan  $O_2^-$ , süperoksit dismutaz (SOD) ile önce hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), sonra katalaz etkisi ile suya dönüşür.

Ancak IR'de ksantin oksidaz etkisi ile oluşan  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$ , antioksidan kapasiteyi geçer ve ortamdaki etkin olarak temizlenemez.  $H_2O_2$  daha sonra  $Fe^{+2}$  gibi geçiş metalleri veya süperoksit radikalleri ile (Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları) reaksiyona girer ve en güçlü radikal olarak bilinen OH meydana gelir(65). Reaktif oksijen türleri miktarındaki bu artış sonuçta hücre membranlarındaki lipid yapılarında hasar, hücre içi proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulma ve DNA'da yapısal hasar meydana getirerek hücre zedelenmesine yol açar(66).

#### İskemide:

ATP  $\longrightarrow$  parçalanır  $\longrightarrow$  AMP ve Adenozin

Adenozin hücre dışına çıkar  $\longrightarrow$  İnozin ve Hipoksantin

AMP  $\longrightarrow$  Hipoksantin

KDH  $\longrightarrow$  KO

#### Reperfüzyon ile:

Hipoksantin +  $H_2O$  +  $O_2$   $\longrightarrow$  Ksantin +  $H^+$  +  $O_2^-$

Ksantin +  $H_2O$  +  $O_2$   $\longrightarrow$  Ürik Asit +  $H^+$  +  $O_2^-$

İskemi-reperfüzyon (IR) hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık olan hücresel ve humoral olaylar serisidir(67,68).

I) Serbest oksijen radikalleri

II) Polimorf nüveli lökositler (PNL)

III) Kompleman sistemi

IV) Endotel hücreleri

### **Serbest Oksijen Radikalleri**

Serbest radikaller son yörüngesinde en az bir tane eşlenmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır(69). Serbest radikaller eşlenmemiş elektron bulundurduklarından dolayı diğer maddelerle kolaylıkla reaksiyona girebilmektedir. Serbest oksijen radikalleri biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar. Her ne kadar vücudun bağışıklık sistemi içerisinde aktif rol oynasalar da dengesiz üretimi doku hasarına ve hücre ölümüne neden olmaktadır(70,71).

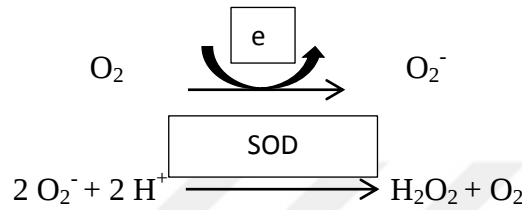
Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidratlar vb. önemli yapılarına etki edip ve bu yapıları bozabilmektedir. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali (OH $^-$ ), nitrik oksit (NO), peroksil radikali (ROO) ve radikal olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli sebebi olarak gösterilmektedir(72).

Biyolojik sistemlerden oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak gösterilebilir(73). Eksojen kaynaklar ise UV ışınlar, mikrodalga ışınları, X-rays, organik madde yakılması, hava ve su kirleticiler, temizlik ürünleri ve asbest olarak sıralanabilir(74).

Süperoksit çoğunlukla hücrenin mitokondrisi içerisinde oluşur. Hücrelere giren oksijenin %90'ı elektron transport zincirinde suya indirgenirken, %1-2'lik bir kısım ETZ'den (başlıca kompleks I ve III) elektron kaçağına bağlı olarak süperoksite dönüşür. Normalde oluşan bu süperoksitler, SOD enzimi tarafından hızlıca dismutasyona uğratılır. İskemi durumunda ise ETZ'nin de moleküler oksijen yokluğuna bağlı olarak elektron akışı durduğundan bu kompleksler (özellikle kompleks I) indirgenmiş düzeyde kalır. ETZ'den sızan elektronlar rezidüel oksijenle reaksiyona girerek süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) üretimine yol açarlar. Reperfüzyonda ise moleküler oksijenin gelişi ile ETZ'den elektron sızıntısı artar ve patolojik süreç süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) üretiminin artışı ile devam eder(75,76). Süperoksit radikali, elektron transport sisteminde hem kompleks I hem de kompleks III'te üretilir. Anyonik forma geçtiğinde ise mitokondrinin iç membranından kolaylıkla geçer. Kompleks

İ'e bağılı  $O_2^-$  özellikle matriksin içine bırakılır ve sağlam mitokondriden kaçak ortaya çıkmaz(77).

Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir(78).



Hidrojen peroksitin hücre içinde metabolizması farklı yollardan gerçekleşebilir. Hidrojen peroksitin,  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+}$  veya diğer geçiş elementleri (Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek  $OH^\cdot$ 'ye dönüştürülür. Bu reaksiyona “fenton reaksiyonu” denir. Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir. Biyomoleküller ile daha güçlü reaksiyona girmesinden dolayı biyolojik sistemlere diğer ROS'lardan daha fazla zarar verebilir. Herhangi bir  $OH$  süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Bu nedenle  $OH$  radikalının oluşumunun önlenmesi, bu radikalın süpürülmesinden daha etkilidir(79,80).

### Polimorf Nüveli Lökositler (PNL)

İnflamasyon esnasında polimorf nüveli lökositler olay yerine hızlıca göç etmektedir. Bu göçü endotel hücreleri ve adhezyon molekülleri sayesinde yaparlar. Bunlara selektin denir ve L, P, E selektin olmak üzere üç grupta incelenilirler. İskemi, özellikle de reperfüzyon aşamasında ven endoteline artmış nötrofil adhezyonu mevcuttur(81). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki reperfüzyonda mikrovasküler permeabiledaki artıştan başlıca nötrofillerin sorumludur(80). Polimorf nüveli lökositler yüksek düzeylerde serbest oksijen radikali üretebilir ve iskemi reperfüzyon hasarında çeşitli rolleri vardır. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada mikrovasküler oklüzyon, sitokin salınımında artış, vasküler permeabilite artışı, sitotoksik enzim salınması ve SOR salınımı gösterilmiştir(82).

Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde uyarılmış endotel hücrelerinden fazla miktarda  $O_2^-$  oluşurken, NO oluşumu ise azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması; endotel hücrelerinden platelet aktive eden faktör (PAF), tümör nekroz faktör alfa (TNF-a) gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin ise arttığı gözlenmektedir. (83)

Uyarılmış nötrofiller ortama salıverdikleri maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdıkları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar(84).

Bunu dışında yapılan bir çalışmada uyarılmış lökositlerin dokularda fosfolipaz A2'yi aktive edip degranülasyon sonucu lizozomal enzimleri saldırdığı ve serbest radikal oluşumunu sağladığını göstermiştir(85).

Aktive nötrofillerde ksantin-oksidaz'ın artması ile SOR'un salınması “solunum patlaması” denen olayı meydana getirir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlar ve dokudaki oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenir. Süperoksit iyonu, daha çok spontan dismutasyonla hidrojen perokside dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kolajenaz ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü artar(86).

## **Komplemanın Rolü**

Normal serumda düşük konsantrasyonda, inaktif ve çözünür halde bulunan, kompleks bir protein grubudur. Düzenli bir sıra ile birbirleri ile reaksiyona girerek protein-prtein kompleksi ve aktif parçalanma ürünleri meydana getirirler. Kompleman sistemi aktif hale geldikten sonra, proinflamatuvar maddeler olan C3a, C5a, iC3b ve C5b-9 meydana gelir.

Bunlardan C3a ve C5a anafolatoksinlerdir ve lökositleri aktive eder. Bunun yanında C5a makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)- 1, TNF-a, IL-1 ve IL-6 üretimini uyarak inflamatuvar yanıtı güçlendirir. Sonuç olarak Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1) İnterselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) E-selektin, P-selektin gibi lökosit adezyon molekülleri uyarılmış olur(87). Eş zamanlı olarak endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe edilir ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonus bozulur(88,89).

### **Endotel Hücresinin Rolü**

Oksidatif stres endotel hücrelerinde aktivasyona ve hücresel işlevlerin aktifliğini yitirmesine sebep olabilmektedir. Yapılan bir çalışma göstermektedir ki endotel hücreleri hem SOR hedefi, hem de SOR üretim kaynağı olabilmektedir(90). Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan ET'i ve NO'yu üretilmesini sağlar. NO arteriyel dolaşımında ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirir. Venlerde ise bunun tam tersi bir mekanizma söz konusudur. IR hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon ve venlerde ise vazodilatasyon görülür(90). Nitrik oksitlerin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, fakat metal içeren bileşikler ve radikaller hızla tepkimeye girerler. Lipit radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücresel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilmektedir(91).

### **2.5.2. Antioksidanların Rolü**

Antioksidanlar vücudumuzda serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltan veya ortadan kaldıran bileşiklerdir. SOR'ların oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan “antioksidan savunma sistemi” dört yolla etki göstermektedir:

1. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, “süpürücü etki”. Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler(73,92).
2. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya “inaktif şekle dönüştürücü etki”. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler(93)
3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller “zincir kırıcı etki” gösterirler(94)
4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde “onarıcı etki” gösterirler(95).

Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere iki grup olarak sıralanabilirler. Endojen kaynaklı antioksidanlar ise, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki alt grupta sınıflandırılabilir(71,74).

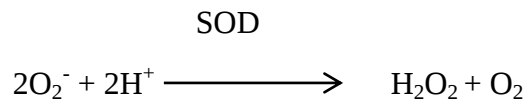
### **Endojen Antioksidanlar**

#### **Enzimatik Olan Endojen Antioksidanlar:**

Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GSHPx), Glutasyon S-Transferaz (GST), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve Hidroperoksidaz enzimatik savunma hattını oluşturan enzimsel antioksidanlardır(71).

#### **i) Süperoksit dismutaz (SOD):**

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) katalizleyen enzimatik, aynı zamanda ROS' a karşı savunmada ilk sırada yer alan bir antioksidandır(96).

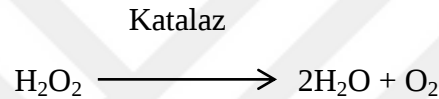


Süperoksit dismutaz' ın insan vücudunda üç ayrı formu bulunmaktadır. Bunlardan bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD) sitozolde ( hücrelerde en sık görülen formu ), manganez (Mn) içeren süperoksit dismutaz (Mn SOD) mitokondride ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC SOD) hücre dışı sıvılarda bulunur(97,98).

Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda O<sub>2</sub> üretilmesine rağmen hücre içi düzeyi SOD tarafında düşük tutulur. Ancak, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geçiş metalleri varlığında Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile son derece aktif OH radikaline dönüşmektedir. Bu durumda CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivitesi artarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> düzeylerini kontrol altına almaktadır(99).

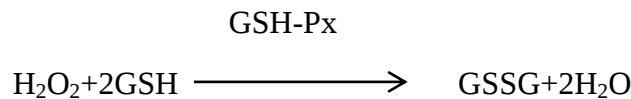
## ii) Katalaz:

Katalaz, büyük ölçüde peroksizomlar gibi hücre içi organellerde ve daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunan, Hidrojen peroksitin, H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub> 'ye dönüşümünü katalize eden, dört protein alt birimden meydana gelen ve her bir alt birimine, bir hem grubu ve bir NADPH molekülü bağlı olan bir enzimdir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin OH oluşumunu önlemek için ortadan kalkmasını sağlar (97,100,101).



## iii) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px):

Hücrelerin sitoplazmasında bulunup, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den kaynaklanan oksidatif hasara karşı hücreleri korur. Bu reaksiyon sonucu OH'ın oluşması engellenir. Glutasyon peroksidazı oluşturan her bir protein alt birim selenyum içermektedir(98).



Selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve organik hiperoksitlere karşı etkilidir. Bu metabolize etme reaksiyonları sırasında GSH, hidrojen verici olarak hareket ettiğinden dolayı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve hidroperoksitler indirgenirken GSH okside olur. Okside glutasyon, glutasyon disülfittir (GSSG). Glutasyon redüktaz enzimi varlığında okside glutasyon redükte glutasyon haline geri indirgenir. Bu indirgenme reaksiyonu esnasında GSH-R elektron vericisi olarak NADPH'yi kullanır(98,102).

## iv) Glutasyon redüktaz:

Glutasyon redüktaz, flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein bir enzimdir. Glutasyon redüktaz, NADPH'nin bir elektronunu okside glutasyonun disülfid bağlarına aktararak yeniden GSH'ye dönüştürülür(96).



#### **Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar:**

Enzim olmayan antioksidanlar arasında glutasyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, koenzim Q10, selenyum,  $\alpha$ -lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin sayılabilir(74,96,98,103,104).

Glutasyon canlılarda yüksek yoğunlukta bulunur. Antioksidan görevinin yanı sıra hücreleri redoks durumunda olmalarına, detoksifikasyon sistemlerinde, apoptoziste görev alır(105). Glutasyon iki önemli aşamada sentezlenir. Birinci aşamada glutamin-sistein ligaz (GCL), glutamin ve sisteini bağlayarak  $\gamma$ -glutamilsisteini oluştur. İkinci olarak glutasyon sentetaz (GSS),  $\gamma$ -glutamilsisteine glisini bağlayarak GSH molekülü oluştur. Glutamin-sistein ligaz, katalitik (GCLC) ve düzenleyici (GCLM) alt birimlerden oluşmaktadır. Glutamin-sistein ligazın katalitik alt birimi, katalitik aktivite için sistein ve glutaminin bağlanmasından sorumludur. Glutamin-sistein ligazın düzenleyici alt birimi ise GCLC'nin etkisini artırır(106,107). Glutasyon, GPx'in katalitik etkisiyle lipit peroksitleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'yi detoksifiye eder ya da O<sub>2</sub>- ve OH-'i temizler. Ayrıca GSH plazma membranından aminoasit transportunu sağlar ve bazı önemli antioksidanları yeniden oluşturur(98).

Melatoninin karanlık ortamlarda triptofan üzerinden sentezlenmektedir(108). Melatonin, protein ve lipidlerin yanı sıra hem çekirdek DNA'sını hem de mitokondriyel DNA'yı serbest radikallerden ve oksidatif hasardan korur. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive eder, O<sub>2</sub> radikalini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye kataliz eden SOD aktivitesini artır, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önler ve NO oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek, antioksidan etki gösterir. Yapılan bazı çalışmalar yaşlanma ile birlikte azalan melatonin seviyesinin, yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogeneğinde ve oksidan hasarda etkili olduğunu göstermektedir(109–111).

Koenzim Q10 mitokondri iç zarında bulunur. En az üç mitokondri enzimi (Kompleks I, II, III) için bir kofaktördür ve oksidatif fosforilasyonda rol oynar. Antioksidan olarak ise serbest radikalleri süpürür, protein ve lipid peroksidasyonunu baskılar. Koenzim Q10,  $\alpha$ -

tokoferol ile sinerjik olarak çalışır, aktif formlarını yeniden oluşturur ve vitamin C ile benzer bir mekanizmayla etkisini gösterir. İndirgenmiş formu ubikinol, oksidanları nötralize etmek için elektron verir ve çok güçlü bir antioksidan aktivitesi gösterir(112).

## **Eksojen Antioksidanlar**

### **i) Vitamin Olan Eksojen Antioksidanlar:**

Vitamin E, çok güçlü bir antioksidandır. Sekiz izometrik asimeri bulunup, insanda en biyoaktif formu  $\alpha$ -tokoferoldür. Bunun temel görevi ise lipit peroksidasyonuna karşı korumada bulunmaktır(74). Vitamin E, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipit peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonu, vitamin E'nin zincir kırıcı etkisiyle sonlandırılabilir. Vitamin E, selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar; selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır. (113)

Askorbik asit olarak da bilinen Vitamin C, suda çözünen en güçlü antioksidan moleküldür(114). İnsanlarda sentez edilemediğinden diyetle alınması gerekir. Vitamin C lipitlerde çözünen radikallerin temizlenmesi yoluyla üretilen  $\alpha$ -tokoferoksil radikallerinden  $\alpha$ -tokoferolu yeniden oluşturarak bir koantioksidan olarak hareket edebilir, ayrıca vitamin C'nin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir(115). C vitamini antioksidan etkisi yanında oksidan etki de gösterebilir.  $Fe^{+3}$ 'ü lipid peroksidasyonunu artıran  $Fe^{+2}$ 'ye dönüştürerek, oksidan bir davranış da göstermektedir(116).



Bunlar dışında  $\beta$ -karoten ve folik asitte bulunmaktadır.

### **ii) İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar**

**Ksantin oksidaz inhibitörleri:** Allopürinol, Oksipürinol, Pterin aldehyt, Tungsten

**NADPH oksidaz inhibitörleri:** Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, Rekombinant süperoksit dismutaz, Trolox-C (Vitamin E analogu)

**Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar:** (GSHPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)

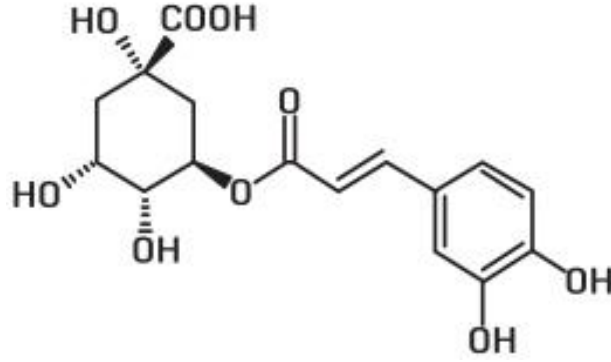
**Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar:** Mannitol, albümin, Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin), Nötrofil adezyon inhibitörleri, Sitokinler (TNF ve IL-1), Barbitüratlar, Demir şelatörleri.

## **2.6 Klorojenik Asit**

### **2.6.1.Klorojenik Asitin Yapısı ve Organizmadaki Etkileri**

Klorojenik asitler kahve çekirdeklerinde doğal biçimde bulunan antioksidan özelliği kuvvetli bileşenlerdir. Kahve çekirdekleri taze ve yeşil halde iken antioksidan özellikleri en yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Özellikle ısıtma işlemine maruz kaldıktan sonra bu özelliklerinden önemli ölçüde kayıp izlenmektedir. Bazı çalışmalarda kahve çekirdeğinin kavrulduktan sonra, klorojenik asit miktarının %95 oranında azalabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle kavrulmuş kahveler yerine, yeşil kahveye yönelmek daha doğru bir yol olarak izlenmektedir(117,118). Yeşil kahve çekirdeğinde klorojenik asit izomerlerinden IUPAC yönergelerine göre en fazla bulunan ise 5- kaffeoilkuinik asittir (5 CQA). CGA'nın antioksidan aktivite özelliğinin dışında, antibakteriyel, hepatoprotektif, antipiretik, nöroprotektif, anti- obezite, antiviral, anti-hipertansif, kardiyoprotektif benzeri terapötik rol oynayan görevleride gösterilmektedir. Buna ek olarak. CGA'nın hem genetik hem de sağlıklı metabolik ilişkili bozukluklarda lipid metabolizmasını ve glikozu modüle edebildiği gösterilmiştir(119).

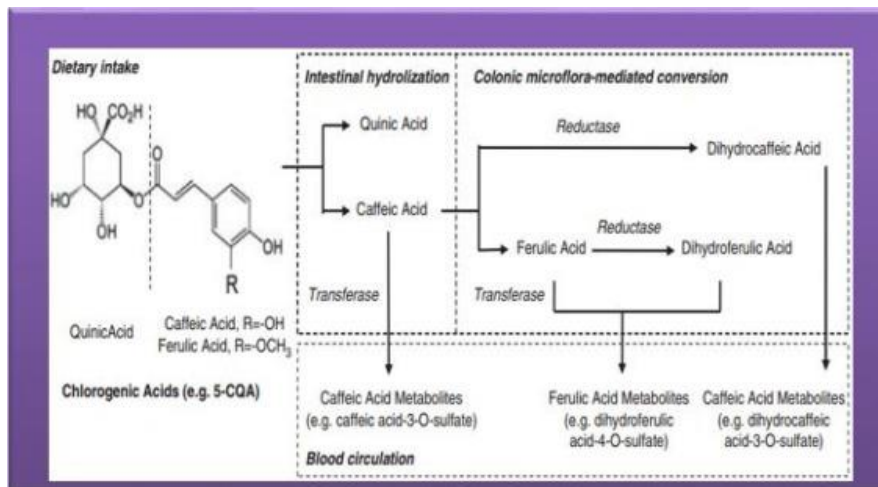
CGA iyi bilinen polifenol bileşiklerden biridir, molekül formülü C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub> olup, 354.311 g/ mmol' dür. (Şekil 2,8)



Şekil 2. 8 Klorojenik asidin kimyasal yapısı(119)

### 2.6.2.Klorojenik Asitin Farmakokinetiği ve Emilimi

İnsanlar ve hayvanlar üzerindeki çeşitli çalışmalarda CGA ve bileşenlerinin kan dolaşımında belirgin olduğu izlenmiştir(120,121). Başlıca CGA metabolitleri ferulik, izoferulik ve kafeik asittir. İçecek ve yiyeceklerle alınan CGA'nın üçte biri fizyolojik olarak plazmada yüksek performanslı likit kromatografisinde 5- CQA, 4-CQA ve 3 CQA şeklinde ince bağırsaktan emilir(122,123). Geri kalan üçte ikisi ise kalın bağırsağa geçmektedir(122). Burada fenolik asit metabolize olur ve emilir. İnce bağırsak quinic asidin FGA ve CGA'dan ayrılmasının ve sonrasında ferulik asit ve CA'nın biyokimyasal olarak salındığı yerdir. Oysa ki kolon kafeik asit ve ferulik asitin dihidrofenolik aside dönüşmesinde önemli ve onun absorpsiyonunda büyük rol oynar. (Şekil 2.10)



Şekil 2. 9 CGA' nın ana metabolik yolu(124)

### **2.6.3.Klorojenik Asitin Etki Mekanizmaları**

CGA' ların nasıl çalıştığı ortaya koymak için farklı mekanizmalar ortaya koyulmuştur. Bu mekanizmalarının bazıları CGA'nın anti-inflamatuvar ve anti-oksidan özellikleri ile ilişkilendirilmiştir(119). Bunun yanında kronik inflamasyon metabolik sendromla da ilgili olabilir(120). Bir çalışmada yüksek yağ içerikli beslenen ve obez farelerde CGA tedavisi Cd11c, Cd11b, Cd68 ve f4/80 gibi yağ dokusu makrofaj genlerinde ve bunlardaki MCP-1, TNF-a gibi proinflamatuvar gen ekspresyonlarını önemli ölçüde düşürmektedir. Ayrıca CGA'nın karaciğer hücrelerine yağ alımını sağlayan PPAR $\gamma$ ' yı inhibe ettiğini bulmuşlardır. Sonuç olarak CGA inflamasyonu baskıladığı, insülin direncini azalttığı, yağ birikimini ve vücut ağırlığını azaltıp bunu yaparken PPAR $\gamma$ 'yı inhibe ederek karaciğer yağlanmasında engel olduğu gösterilmiştir(125).

### **2.6.4.Klorojenik Asitin Antioksidan Etkisi**

Klorojenik asitin yapısında bulunan karboksil ve hidroksil grupları sayesinde serbest radikallerin etkisini düşürme özelliği gösterilmiştir. Dikkat edilmesi gereken bir nokta ise düşük dozlarda oksidan etki gösterdiği, yüksek dozlarda ise antioksidan etkilerinin görüldüğü çalışmalar mevcuttur. Ksantin oksidaz aktivitesini azaltarak etki gösterdiği de belirtilmiştir. Ayrıca antioksidan enzim sentezini arttırarak da etki göstermektedir(118).

### **2.6.5.Klorojenik Asitin Antiinflamatuvar Etkisi**

Klorojenik asitin birçok çalışmada toll like reseptör yolağını inhibe ederek baskılayabildiği ve TNF-a, IL-1, IL-6 sitokinlerinin seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir(118). Bunun yanında Dos Santos ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada klorojenik asidin antiinflamatuvar etkisinin yanında analjezik etkisi de gösterilmiştir(126).

### **2.6.6.Klorojenik Asitin Hasarlı Bölgede Ters Nötrofil Göçü Etkisi**

Nötrofiller, inflamatuvar bir uyarana yanıt veren ilk hücrelerdir. Bu hücreler, patojen istilasını sınırladıkları inflamatuvar bölgeye alınır. Tehdit etkisiz hale getirildikten sonra, başarılı bir çözüme ulaşmak için nötrofillerin apoptoz veya ters göç yoluyla uzaklaştırılması gerekir(127). Bununla ilişkili olarak Yang ve meslektaşları, klorojenik asidin bir zebra balığı modelinde lipopolisakkarit kaynaklı nötrofil alımını baskıladığını bildirmiştir(128). Weihao

Zhang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmaya göre de klorojenik asidin ters göçü indüklediğini, zebra balıklarının yaralanma bölgesinde nötrofil sayısında belirgin düşüş yaptığını göstermektedir. Ayrıca nötrofillerin, klorojenik aside maruz kaldıklarında apoptoz geliştiği belirtilmektedir(129).

Bunların dışında, yapılan bazı çalışmalarda ise tip 2 DM ve karaciğer yağlanma riskini azalttığı gösterilmiştir(130).

#### **2.6.7.Klorojenik Asitin Yan Etkileri**

Yeşil kahve çekirdeği, bundan ötürü özü ile alakalı alerjik raporlar olmasına karşın, bunun klorojenik asitten kaynaklı olmadığını gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur(131). Birçok bitkide olması nedeniyle araştırılmış ancak kendi başına zarara neden olduğu gösterilememiştir(132,133)

### 3. MATERİYAL VE METOD

Priapizm modelinde klorojenik asitin reperfüzyon hasarı üzerine olası koruyucu etkilerinin oksidan-antioksidan denge açısından değerlendirilmesi amaçlanan bu deneysel çalışma öncesinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmış, deney Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Çalışma Grupları

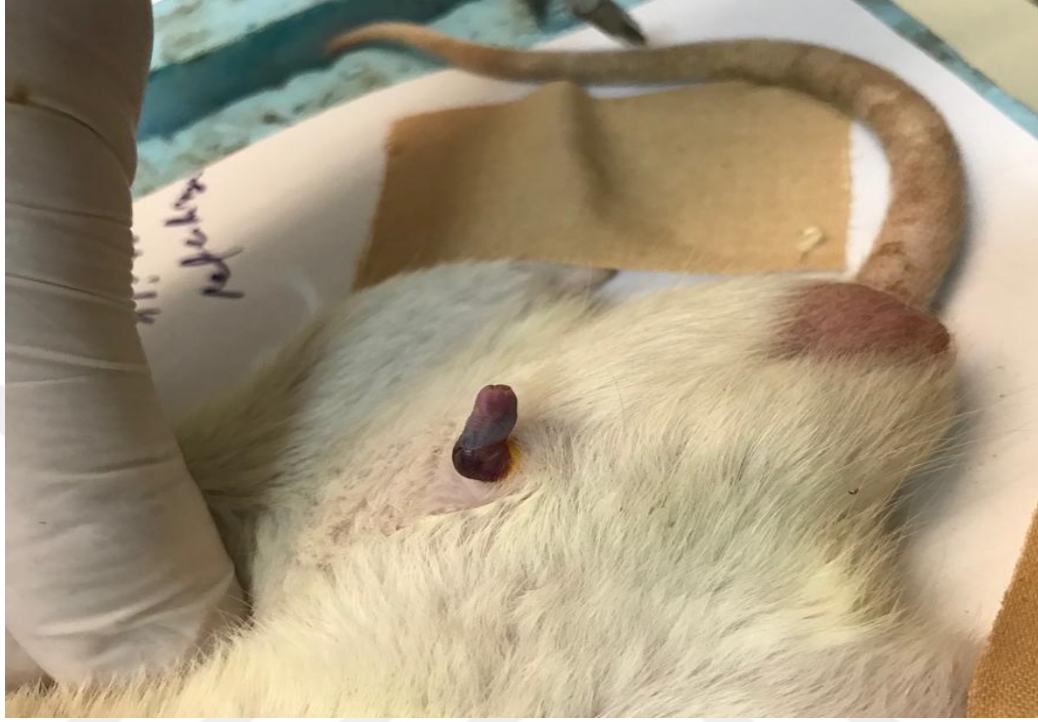
Bu deneysel çalışmada Spraque Dawley tipi, 300-350 gr ağırlığında, toplam 18 adet erişkin erkek rat kullanıldı. Ratlar kendi aralarında numaralandırıldıktan sonra kura çekilerek randomizasyon yapıldı. Randomizasyon yapıldıktan sonra çalışma, her bir grupta 6 rat (n=6) bulunacak şekilde 3 rat grubu üzerinden yürütüldü (Tablo 3.1). Tüm gruplar deney süresince standart oda sıcaklığı ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ışıklandırma (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) ve nem ( $50 \pm 10\%$ ) koşullarında tutuldu. Ratlar normal standart yem ve musluk suyu ile beslendi.

**Tablo 3.1** Deney grupları

| Deney ve kontrol grupları                     | Grup başına hayvan adedi |
|-----------------------------------------------|--------------------------|
| Grup 1 (Kontrol grubu)                        | 6                        |
| Grup 2 (Priapizm/Reperfüzyon)                 | 6                        |
| Grup 3 (Priapizm/Reperfüzyon+Klorojenik asit) | 6                        |
| Kullanılan toplam hayvan sayısı               | 18                       |

Tüm cerrahi işlemlerde anestezi, 80 mg/kg Ketamin ile birlikte 10 mg/kg Xylazin intraperitoneal verilerek yapıldı. İskemik priapizm, Şanlı modeli (Şanlı ve ark.) esas alınarak standart 50 cc lik çam uçlu irrigasyon enjektörü ile oluşturulan vakum ereksiyon cihazı ile elde edildi. Enjektör ucu flask penis taban çapına uygun hale getirildikten sonra, konstriktör band enjektör ucuna yerleştirildi. Anestezi altındaki ratların flask penis tabanına enjektör yerleştirildikten sonra piston yavaşça geri çekildi ve ereksiyon oluşana kadar 20 cc'lik negatif basınç oluşturularak ereksiyon sağlandı. Yeterli ereksiyon elde edildiğinde lastik konstriktör

bant penis köküne enjektörden itilerek yerleştirilip priapizmle uyumlu klinik oluşturuldu (Resim 3.1).



**Resim 3. 1** Konstriktör bant kullanılarak oluşturulan ereksiyon modeli

**Grup 1 (Kontrol) (n=6):** Kontrol grubu yalnızca penektomi uygulanan ratlarda doku TOS, TAS, OSI, GSH, MPO, GRP78, ATF6, CHOP, MDA, SOD, GPx değerindeki değişiklikler ile sakrifiye edilen penis dokusunun histolojik özellikleri değerlendirildi (Resim 3.2).

**Grup 2 (Priapizm / Reperfüzyon) (n=6):** 1 saatlik priapizm sonrası yarım saatlik reperfüzyon sağlanan gruba penektomi uygulandı, doku TOS, TAS, OSI, GSH, MPO, GRP78, ATF6, CHOP, MDA, SOD, GPx değerindeki değişiklikler ile sakrifiye edilen penis dokusunun histolojik özellikleri değerlendirildi.

**Grup 3 (Priapizm / Reperfüzyon + Klorojenik asit) (n=6):** 1 saatlik priapizm oluşturulan ratlarda, reperfüzyondan yarım saat önce klorojenik asit, 20 mg/kg 0.5 cc hacimde olacak şekilde transperitoneal olarak verildi ve yarım saatlik reperfüzyon sağlanan gruba penektomi uygulandı, doku TOS, TAS, OSI, GSH, MPO, GRP78, ATF6, CHOP, MDA, SOD, GPx değerindeki değişiklikler ile sakrifiye edilen penis dokusunun histolojik özellikleri

değerlendirildi. Bu gruptaki ratlara verilecek olan klorojenik asit dozu, daha önce yapılmış iskemi-reperfüzyon çalışması baz alınarak belirlenmiştir.

Tüm gruplardaki ratlara penektomi ve kan alımı sonrası eksanguinasyon yöntemi ile ötenazi uygulandı.



**Resim 3. 2** Penis diseksiyonu

### **3.2. Biyokimyasal İnceleme Yöntemi**

#### **Doku Örneklerinin Hazırlanışı**

Alınan dokuların her birinden yaklaşık 30'ar mg'lık kesimler yapıldı. Sonrasında bu dokular homejenizatör (IKA Ultra-Turrax T-25, Staufen im Breisgau, Almanya) yardımıyla 2 mL fosfat tamponu (PBS, pH:7.4) içerisinde 9500 rpm'de homojenize edildi. Homojenatlar 4000 1800xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlarda ilgili biyokimyasal parametrelerin ölçümü gerçekleştirildi.

### **Doku Örneklerindeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi**

Doku örneklerindeki protein miktarları üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ticari kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Cat No: 23227, Rockford, IL, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı. Doku malondialdehit (MDA) ve ELISA kitleri kullanılarak ölçülen tüm biyokimyasal parametrelerin seviyeleri standardize olması açısından hesaplanan örnek protein miktarlarına oranlanarak mg protein başına olacak şekilde verildi.

#### **3.2.1 Doku MDA Düzeylerinin Belirlenmesi**

MDA ölçümü, Mihara ve Uchiyama yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirildi. Bu metodun esası, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu molekülün renginin 532 nm'deki absorpsiyonunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır (1).

#### **Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

##### **1)Doku homojenizasyon tamponu (0.01 M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), pH 7.4):**

10 adet PBS tableti (Medicago, Uppsala, Sweden) içerisinde yaklaşık 900 mL saf su bulunan beherde çözüldü ve çözeltinin pH'sı, pH metrede (Hanna Instrument, HI 9321, USA) 7.4'e ayarlandı. pH'sı ayarlanan çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlandı.

##### **2)%1'lik $H_3PO_4$ çözeltisi:**

Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL %85'lik  $H_3PO_4$  (Sigma, St. Louis, MO, USA) alındı ve son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

##### **3) TBA çözeltisi:**

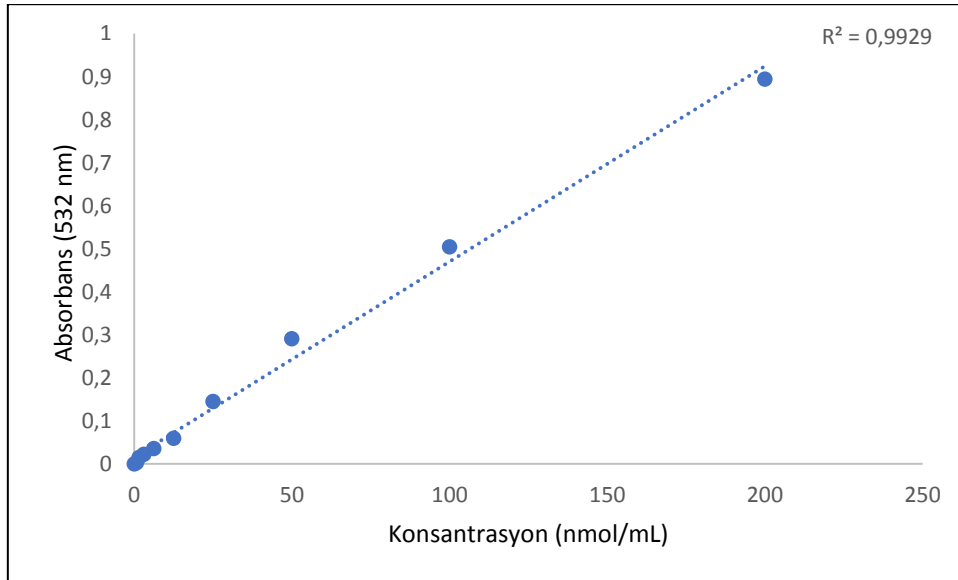
0.67 g TBA (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartıldı, 50 mL saf su ve 50 mL asetik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA) ilave edilerek magnetik bar yardımıyla karıştırılıp çözüldü.

#### 4) Standart çözeltiler:

82.5 µL 1,1,3,3 tetrametoksipropan (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.01 M 50 mL HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA) çözeltisine ilave edildi. Çözelti 50°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu şekilde hazırlanan ana stok çözeltisinden çeşitli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 ve 0.078 nmol/mL'lik standart çözeltiler ve kör hazırlandı.

#### Doku MDA Ölçümü:

1. 500 µL homojenata 3 mL %1'lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> eklenerek karıştırıldı.
2. Karışıma 1 mL %0.672'lik TBA eklenip karıştırıldıktan sonra 60 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi.
3. Süre sonunda tüpler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve sonrasında 1800xg'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonucu süpernatant kısımlardan 200'er µL alınıp 96 kuyucuklu pleyte yüklenerek mikropleyt okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 532 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek MDA standart grafiği çizildi (Grafik 3.1). Bu grafikten yararlanılarak doku MDA seviyeleri nmol MDA/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.

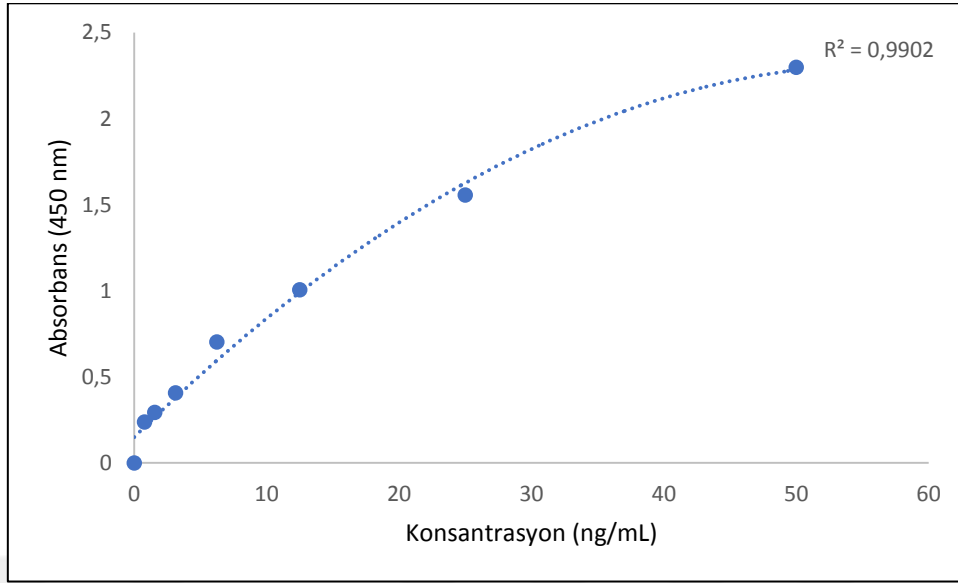


**Grafik3. 1** Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği

### 3.2.2 Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki SOD seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Fine Biotech, Katalog No: ER0332, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- SOD standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Antikorla kaplı pleyt işlem yapılmadan önce yıkama çözeltisi ile pleyt yıkayıcısı (BioTek, Winooski, USA) kullanılarak 2 kez yıkandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er µL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda (ShellLab/Sheldon S14-2, Cornelius, USA) 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er µL biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 3 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er µL streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa renklendirme için TMB substrat çözeltisinden 90'ar µL eklendi ve pleyt 37°C'de çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Referans dalga boyu olan 620 nm'deki ölçüm sonucunda, en yüksek standardın optik yoğunluğunun 0.9-0.95'e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa 50'şer µL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Süre sonunda örnek ve standart absorbansları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 450 nm dalga boyunda okundu.
- Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek SOD standart grafiği çizildi (Grafik 3.2). Bu grafikten yararlanılarak doku SOD seviyeleri ng/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar ng/mg protein olarak verildi.



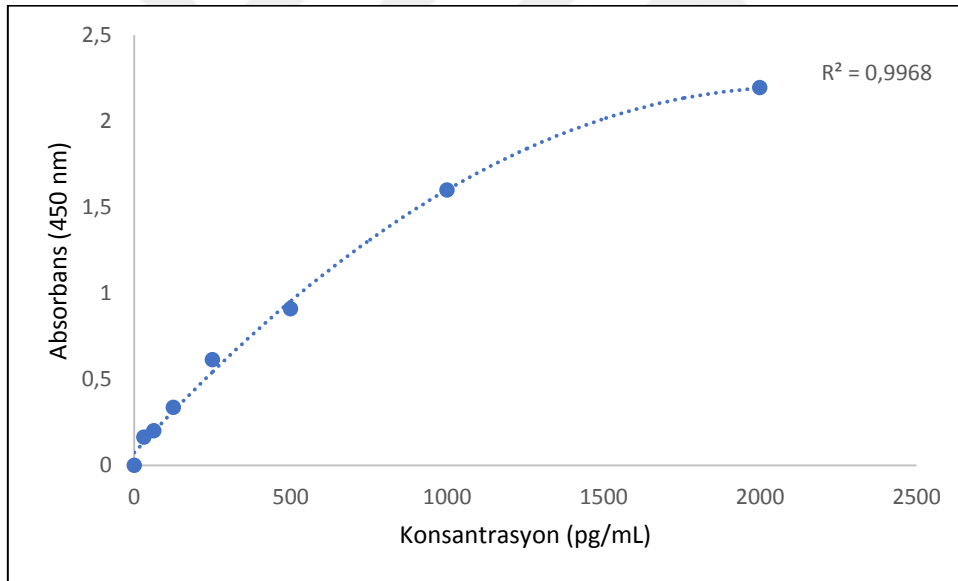
**Grafik3. 2 SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği**

### 3.2.3 Doku Glutasyon Peroksidaz (GPx) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki GPx seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Fine Biotech, Katalog No: ER274, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- GPx standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Antikorla kaplı pleyt işlem yapılmadan önce yıkama çözeltisi ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er  $\mu$ L olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er  $\mu$ L biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 3 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er  $\mu$ L streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon sonrasında pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa renklendirme için TMB substrat çözeltisinden 90'ar µL eklendi ve pleyt 37°C'de çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Referans dalga boyu olan 620 nm'deki ölçüm sonucunda, en yüksek standardın optik yoğunluğunun 0.9-0.95'e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa 50'şer µL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Süre sonunda örnek ve standart absorbansları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okundu.
- Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek GPx standart grafiği çizildi (Grafik 3.3). Bu grafikten yararlanılarak doku GPx seviyeleri pg/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar pg/mg protein olarak verildi.



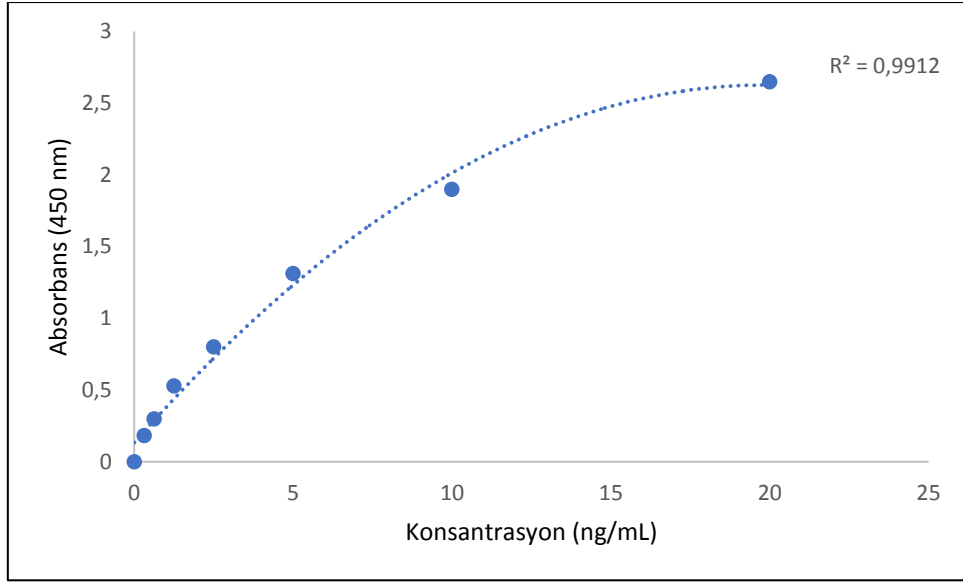
**Grafik3. 3 GPx ölçümünde kullanılan standart grafiği**

### 3.2.4 Doku Glukoz ile Düzenlenen Protein 78 (GRP78) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki GRP78 seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Fine Biotech, Katalog No: ER0562, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- GRP78 standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.

- Antikorla kaplı pleyt işlem yapılmadan önce yıkama çözeltisi ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er  $\mu\text{L}$  olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er  $\mu\text{L}$  biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 3 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonrasında pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa renklendirme için TMB substrat çözeltisinden 90'ar  $\mu\text{L}$  eklendi ve pleyt  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Referans dalga boyu olan  $620\text{ nm}$ 'deki ölçüm sonucunda, en yüksek standardın optik yoğunluğunun  $0.9-0.95$ 'e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa 50'şer  $\mu\text{L}$  renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Süre sonunda örnek ve standart absorbansları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede  $450\text{ nm}$  dalga boyunda okundu.
- Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek GRP78 standart grafiği çizildi (Grafik 3.4). Bu grafikten yararlanılarak doku GRP78 seviyeleri  $\text{ng/mL}$  olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına ( $\text{mg/mL}$ ) oranlandı ve sonuçlar  $\text{ng/mg}$  protein olarak verildi.
-



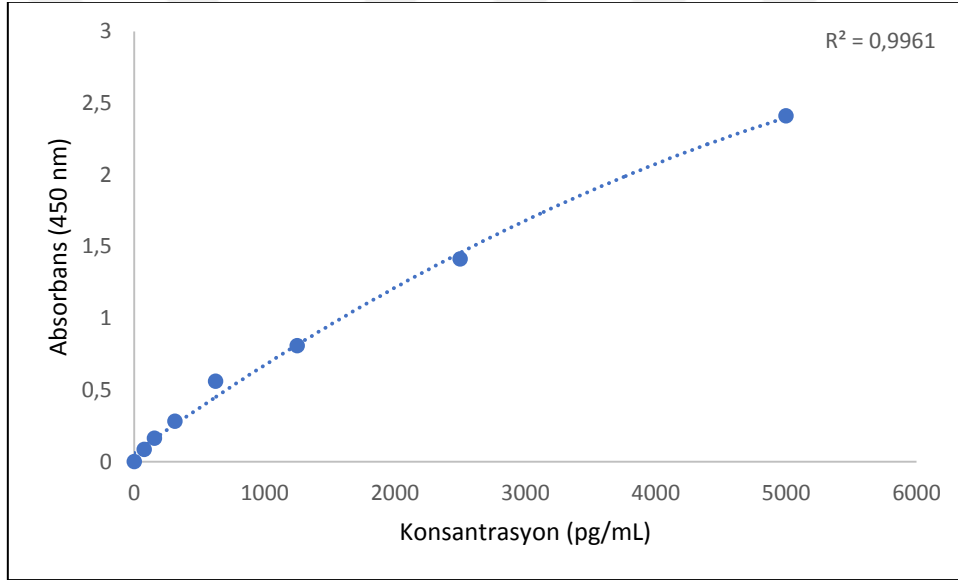
**Grafik3. 4** GRP78 ölçümünde kullanılan standart grafiği

### 3.2.5 Doku Aktifleştirici Transkripsiyon Faktör 6 (ATF6) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki ATF6 seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Fine Biotech, Katalog No: ER1645, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- ATF6 standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Antikorla kaplı pleyt işlem yapılmadan önce yıkama çözeltisi ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er  $\mu$ L olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er  $\mu$ L biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 3 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er  $\mu$ L streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonrasında pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.

- Her bir kuyucuğa renklendirme için TMB substrat çözeltisinden 90'ar µL eklendi ve pleyt 37°C'de çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Referans dalga boyu olan 620 nm'deki ölçüm sonucunda, en yüksek standardın optik yoğunluğunun 0.9-0.95'e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa 50'şer µL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Süre sonunda örnek ve standart absorbansları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okundu.
- Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek ATF6 standart grafiği çizildi (Grafik 3.5). Bu grafikten yararlanılarak doku ATF6 seviyeleri pg/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar pg/mg protein olarak verildi.



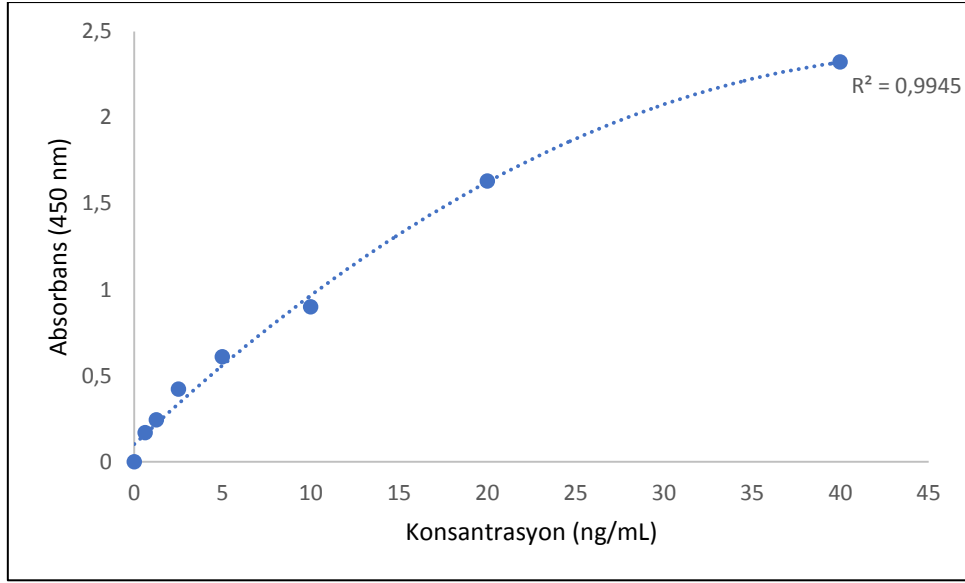
**Grafik3. 5** ATF6 ölçümünde kullanılan standart grafiği

### 3.2.6 Doku C/EBP Homolog Protein (CHOP) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki CHOP seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Fine Biotech, Katalog No: ER0694, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- CHOP standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Antikorla kaplı pleyt işlem yapılmadan önce yıkama çözeltisi ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı.

- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er  $\mu\text{L}$  olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er  $\mu\text{L}$  biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 3 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonrasında pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa renklendirme için TMB substrat çözeltisinden 90'ar  $\mu\text{L}$  eklendi ve pleyt  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Referans dalga boyu olan  $620\text{ nm}$ 'deki ölçüm sonucunda, en yüksek standardın optik yoğunluğunun  $0.9-0.95$ 'e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa 50'şer  $\mu\text{L}$  renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Süre sonunda örnek ve standart absorbansları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede  $450\text{ nm}$  dalga boyunda okundu.
- Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek CHOP standart grafiği çizildi (Grafik 3.6). Bu grafikten yararlanılarak doku CHOP seviyeleri  $\text{ng/mL}$  olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına ( $\text{mg/mL}$ ) oranlandı ve sonuçlar  $\text{ng/mg}$  protein olarak verildi.



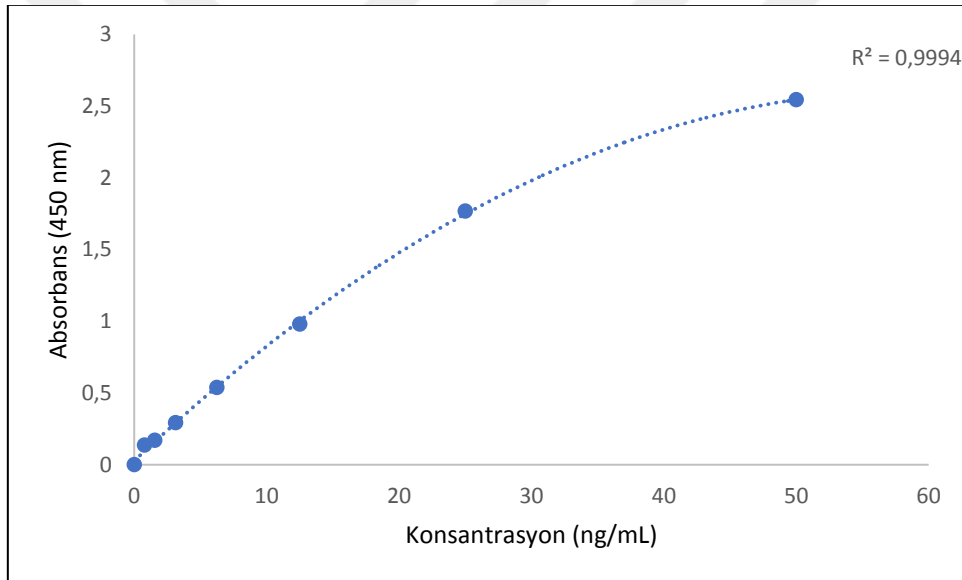
**Grafik3. 6** CHOP ölçümünde kullanılan standart grafiği

### 3.2.7 Doku Miyeloperoksidaz (MPO) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki MPO seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Fine Biotech, Katalog No: ER0142, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- MPO standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Antikorla kaplı pleyt işlem yapılmadan önce yıkama çözeltisi ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er  $\mu$ L olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er  $\mu$ L biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 3 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er  $\mu$ L streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonrasında pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.

- Her bir kuyucuğa renklendirme için TMB substrat çözeltisinden 90'ar  $\mu\text{L}$  eklendi ve pleyt  $37^\circ\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Referans dalga boyu olan 620 nm'deki ölçüm sonucunda, en yüksek standardın optik yoğunluğunun 0.9-0.95'e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa 50'şer  $\mu\text{L}$  renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Süre sonunda örnek ve standart absorbansları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okundu.
- Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek MPO standart grafiğı çizildi (Grafik 3.7). Bu grafikten yararlanılarak doku MPO seviyeleri ng/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar ng/mg protein olarak verildi.



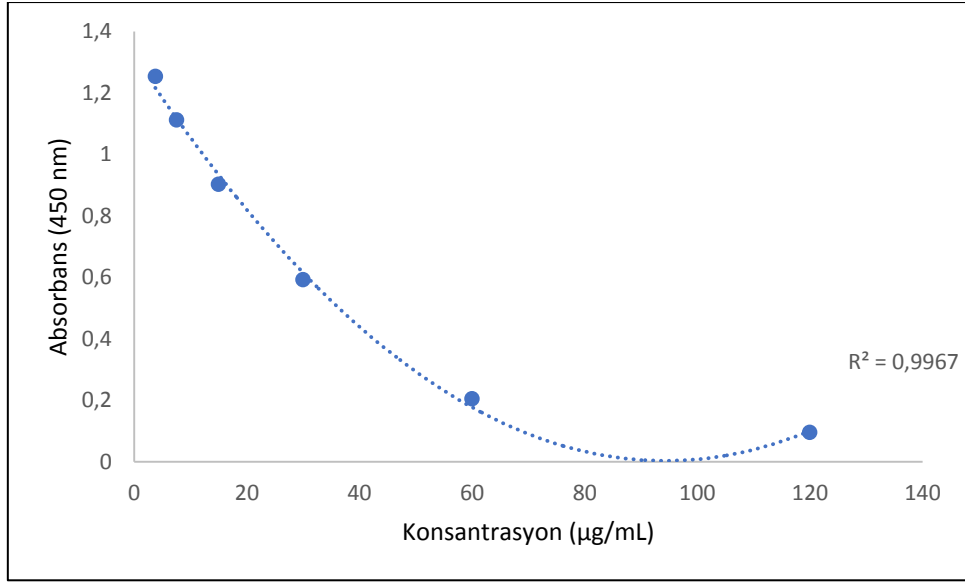
**Grafik3.7** MPO ölçümünde kullanılan standart grafiğı

### 3.2.8 Doku Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki GSH seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Fine Biotech, Katalog No: EU2547, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- GSH standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Antikorla kaplı pleyt işlem yapılmadan önce yıkama çözeltisi ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 2 kez yıkandı.

- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 50'şer  $\mu\text{L}$  olacak şekilde ilaveler yapıldı. Zaman kaybetmeden her bir kuyucuğa 50'şer  $\mu\text{L}$  olacak şekilde biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi.
- Pleyt, folyo ile kapatılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 45 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt içeriği aspirasyon ile uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100'er  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa renklendirme için TMB substrat çözeltisinden 90'ar  $\mu\text{L}$  eklendi ve pleyt  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Referans dalga boyu olan 620 nm'deki ölçüm sonucunda, en yüksek standardın optik yoğunluğunun 0.9-0.95'e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa 50'şer  $\mu\text{L}$  renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Süre sonunda örnek ve standart absorbansları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okundu.
- Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek GSH standart grafiği çizildi (Grafik 3.8). Bu grafikten yararlanılarak doku GSH seviyeleri  $\mu\text{g/mL}$  olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına ( $\text{mg/mL}$ ) oranlandı ve sonuçlar  $\mu\text{g/mg}$  protein olarak verildi.



**Grafik3. 8** GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği

### 3.2.9 Toplam Oksidan Durumun (TOS) Belirlenmesi

Doku örneklerindeki TOS seviyeleri ticari kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0024, Gaziantep, Turkey) kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi ve sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  eşdeğeri/L birimiyle verildi.

### 3.2.10 Toplam Antioksidan Durumun (TAS) Belirlenmesi

Doku örneklerindeki TAS seviyeleri ticari kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0017, Gaziantep, Turkey) kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi ve sonuçlar mmol troloks eşdeğeri/L birimiyle verildi.

### 3.2.11 Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Hesaplanması

Doku örneklerindeki OSI seviyeleri;

$$\text{OSI} = [(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}) / (\text{TAS}, \mu\text{mol troloks eşdeğeri/L}) \times 100]$$

Formülü kullanılarak hesaplandı (2).

## 3.3. Histopatolojik İnceleme Yöntemi

Çalışma sonunda tüm gruplara ait ratlardan çıkarılan penislerin aynı bölgelerinden alınan doku örnekleri; histopatolojik değerlendirme için %10'luk formaldehit solüsyonu içinde 72 saat tespit edildi. Tespit edilen doku parçaları daha sonra %70, %90, %96 ve %100'lük artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Son olarak ksilen solüsyonundan geçirilen dokular; parafine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2255, Tokyo, Japan) ile 5  $\mu\text{m}$  kalınlığında seri kesitler alındı. Deparafinizasyon işleminden sonra bu kesitler, Masson trikrom ve hematoksislen-eozin (H&E) boyası ile

boyandı. Tüm preparatlarda rastgele seçilen beş farklı alan; histopatolojik açıdan ışık mikroskopunda (Olympus BX51; Olympus Co., Tokyo, Japonya) incelendi ve fotoğrafları mikroskoba entegre kamera (Olympus DP 71, Olympus Co., Japonya) ile çekildi. Tespit edilen patolojik değişiklikler; (kavernöz sinüslerde konjesyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, tunika albugineada ayrılma ve/veya hemoraji); yarı kantitatif olarak “0-3” arasında (0: Hiç yok, 1: Hafif, 2: Orta, 3: Şiddetli) skorlandı(134). İlave olarak Masson trikrom boyası ile boyanan preparatlarda kavernöz yapılardaki kırmızı boyanan düz kas ve mavi boyanan kollajenöz bağ doku liflerinin yoğunluğu değerlendirildi.

### **3.4. İstatistiksel İnceleme Yöntemi**

Grupların karşılaştırılmaları için nonparametrik testler kullanıldı.

Biyokimyasal inceleme sonuçlarının (rakamsal veriler) değerlendirilmesine priapizm/reperfüzyon modelinin etkili olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov ile değerlendirildi (kontrol grubu ile priapizm/reperfüzyon grubu arasında değerlendirme). Anlamli fark olduğu saptanan biyokimyasal parametreler için tedavinin etkinliği Kolmogorov-Smirnov testi değerlendirildi (priapizm/reperfüzyon grubu ile priapizm/reperfüzyon+ klorojenik asit grubu arasında değerlendirme; Kolmogorov-Smirnov testi).

Histolojik inceleme sonuçlarının (skorlama ile elde edilen veriler) değerlendirilmesinde de öncelikle priapizm/reperfüzyon modelinin etkili olup olmadığı test edildi (kontrol grubu ile priapizm/reperfüzyon grubu arasında değerlendirme; Mann-Whitney U testi), anlamli fark olduğu saptanan histolojik skorlar için tedavinin etkinliği değerlendirildi (priapizm/reperfüzyon grubu ile priapizm/reperfüzyon+ klorojenik grubu arasında değerlendirme; Mann-Whitney U testi).

Yanılma olasılığı 0,05 olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyokimyasal Bulgular:

Doku MDA, doku TOS, doku TAS, doku OSI, doku SOD, doku GPX, doku GSH, doku MPO, doku GRP78, doku ATF6, doku CHOP için istatistiksel incelemeler yapıldığında ‘kontrol grubu’ ile ‘priapizm / reperfüzyon’ grubu arasında fark izlenen parametrelerin doku TOS, doku OSI ve doku GRP78 olduğu izlendi (Tablo 4.1).

**Tablo 4. 1** Kontrol grubu ile priapizm/ reperfüzyon grubuna ilişkin biyokimyasal veriler\*

| Parametreler                            | Priapizm    | P/R         | p<0,05 ise p değeri** |
|-----------------------------------------|-------------|-------------|-----------------------|
| MDA (nmol/mg protein)                   | 37,4±29,6   | 66,1±38,5   |                       |
| TOS (μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/L) | 21,7±1,4    | 40,8±14,1   | p=0,031               |
| TAS (mmol troloks eşdeğeri/L)           | 0,202±0,092 | 0,140±0,061 |                       |
| OSI(Arbitrary Unit)                     | 12,4±4,4    | 36,7±27,3   | p=0,031               |
| SOD (ng/mg protein)                     | 1,02±0,24   | 0,54±0,38   |                       |
| GPx (pg/mg protein)                     | 291,3±93,9  | 211,6±76,2  |                       |
| GSH (μg/mg protein)                     | 84,7±29,2   | 49,9±27,1   |                       |
| MPO (ng/mg protein)                     | 2,72±0,50   | 3,88±1,58   |                       |
| GRP78 (ng/mg protein)                   | 0,96±0,21   | 1,40±0,49   | p=0,031               |
| ATF6 (pg/mg protein)                    | 380,5±130,5 | 674,6±366,9 |                       |
| CHOP (ng/mg protein)                    | 1,66±0,53   | 2,50±1,94   |                       |

\*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur.

\*\*Kolmogorov- Smirnov testi.

‘Kontrol grubu’ ile ‘priapizm / reperfüzyon’ grubu arasında fark izlenen parametreler için ‘priapizm / reperfüzyon’ grubu ile ‘priapizm / reperfüzyon + klorojenik asit grubu’ arasında yapılan incelemede yalnızca GRP78 için anlamlı farklılık olduğu görüldü. Doku

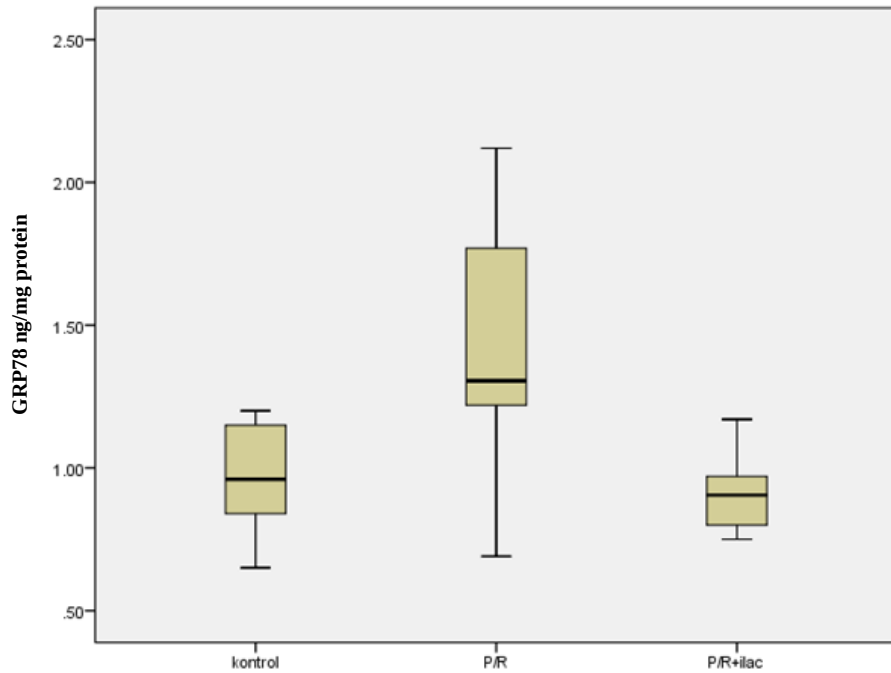
GRP 78 adlı parametre ‘priapizm / reperfüzyon’ modeliyle bozulmakta, klorojenik asit tedavisi bu bozulmayı normal değerlere yaklaştırmaktadır. (Tablo 4.2 ve Grafik 4.1)

**Tablo 4. 2** ‘Priapizm / reperfüzyon grubu’ ile ‘Priapizm / reperfüzyon + klorojenik asit grubu’ na ilişkin biyokimyasal veriler \*

| Parametreler                            | P/R       | P/R+ CGA  | p<0,05 ise p değeri** |
|-----------------------------------------|-----------|-----------|-----------------------|
| TOS (μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/L) | 40,8±14,1 | 26,4±6,4  |                       |
| OSI(Arbitrary Unit)                     | 36,7±27,3 | 17,2±10,2 |                       |
| GRP78 (ng/mg protein)                   | 1,40±0,49 | 0,92±0,15 | p=0,031               |

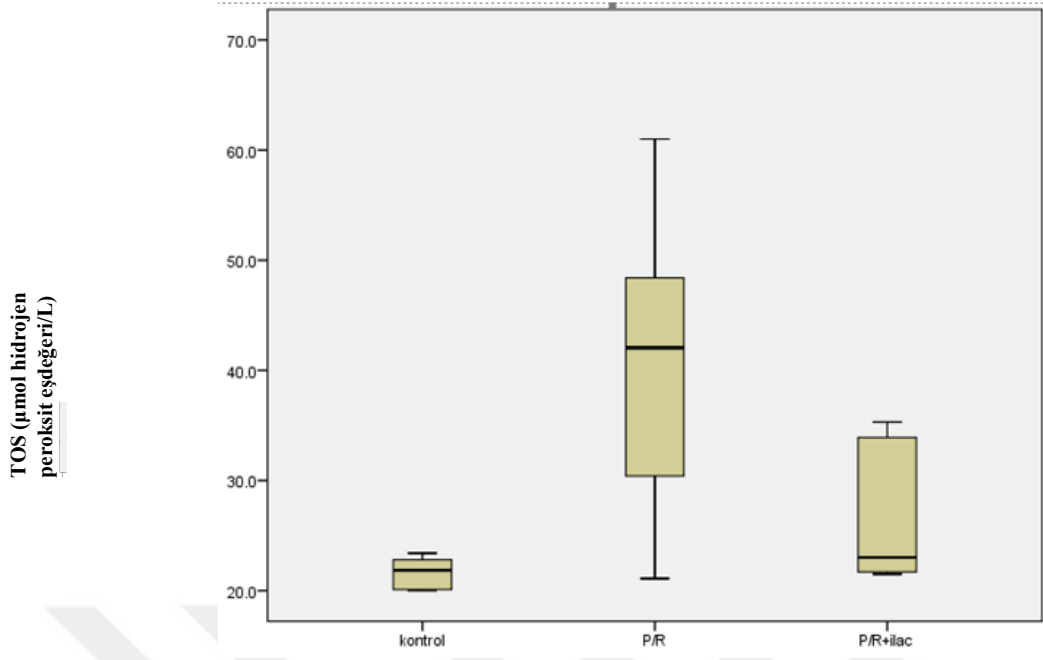
\*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur.

\*\*Kolmogorov- Smirnov testi.

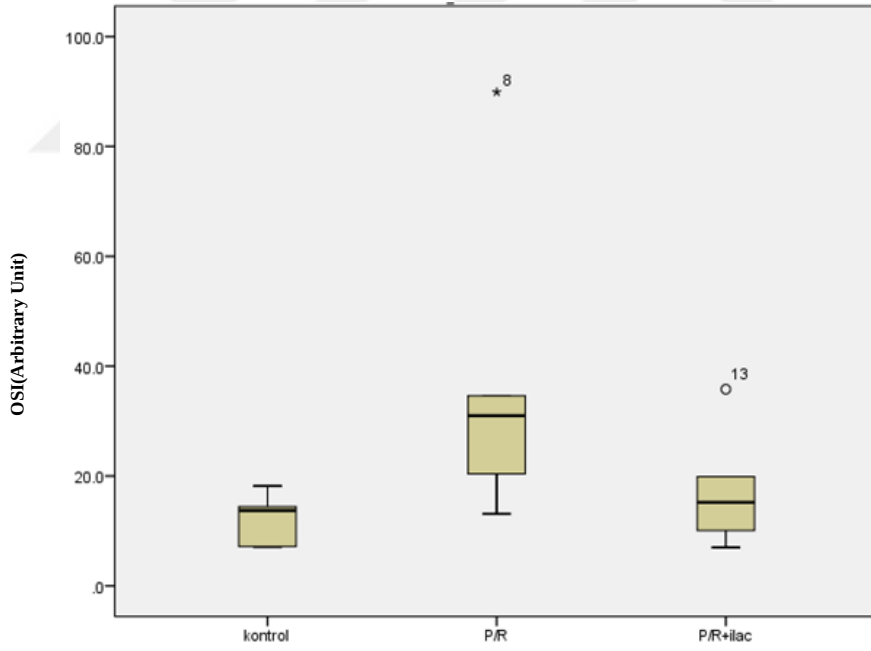


**Grafik 4.1** GRP78 değerlerine ilişkin histogram (GRP78 ng/mg protein cinsinden sunulmaktadır)

Doku TOS ve doku OSI için elde edilen histogramlar ise Grafik 4.2 ve Grafik 4.3’ te izlenmektedir.



**Grafik 4. 2** TOS değerlerine ilişkin histogram  
(Tos  $\mu\text{mol}$  hidrojen peroksit eşdeğeri/L cinsinden sunulmaktadır.)



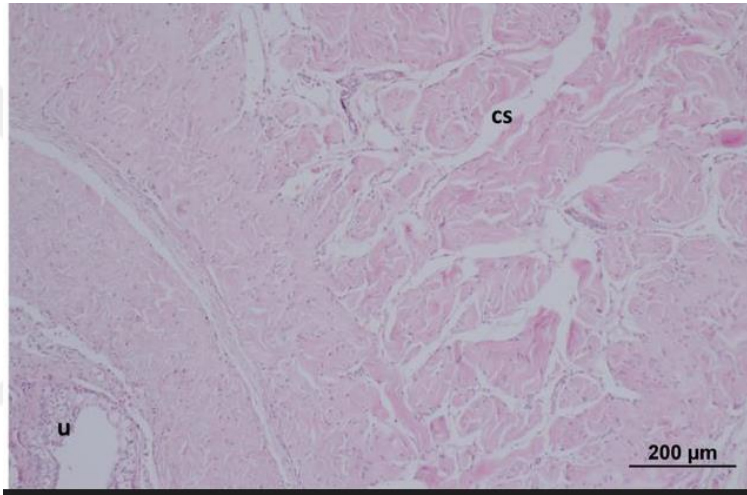
**Grafik 4. 3** OSI değerleri ile ilişkin histogram  
(OSI Arbitrary Unit cinsinden sunulmaktadır.)

## 4.2. Histopatolojik Bulgular

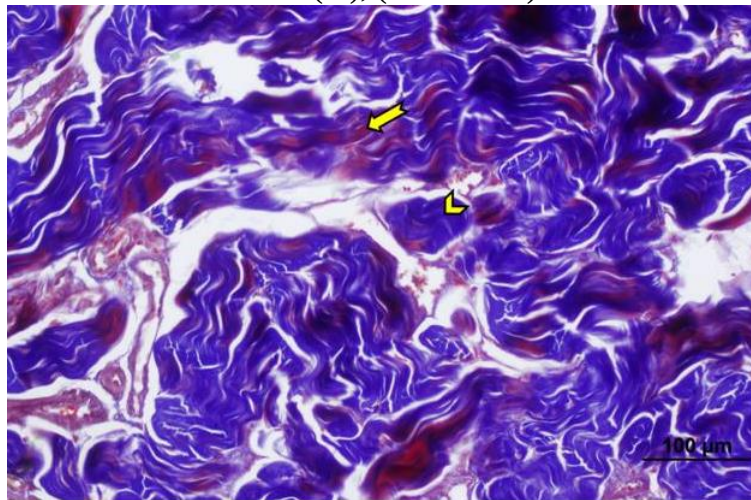
Gruplara ait penis dokusunun ışık mikroskopik değerlendirmesinde;

### 4.2.1. Kontrol Grubu Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Normal görünümde korpus spongiosum, korpus kavernozum ve onları çevreleyen tunika albuginea izlenmekteydi. Korpus kavernozumdaki endotelle döşeli kavernöz sinüsler, onları çevreleyen düz kas ve kollajen lifler normal görünümdeydi. (Resim 4.1, Resim 4.2).



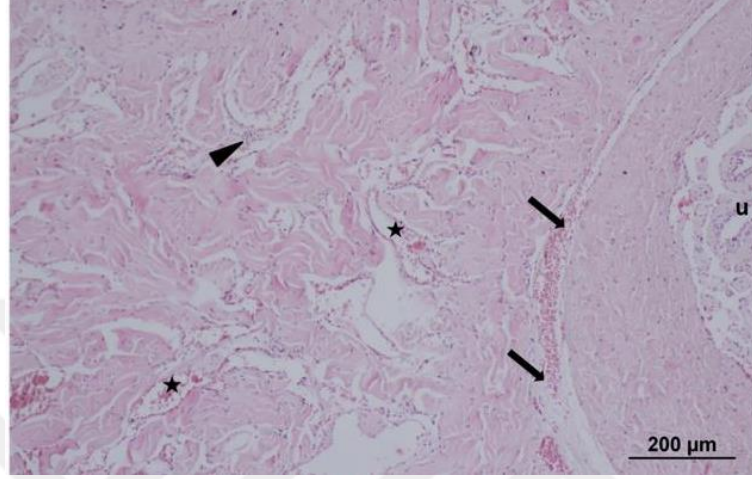
**Resim 4. 1** Kontrol grubundaki bir deneğe ait penis kesiti. Üretelyum (u), kavernöz sinüs (cs), (H&E x100)



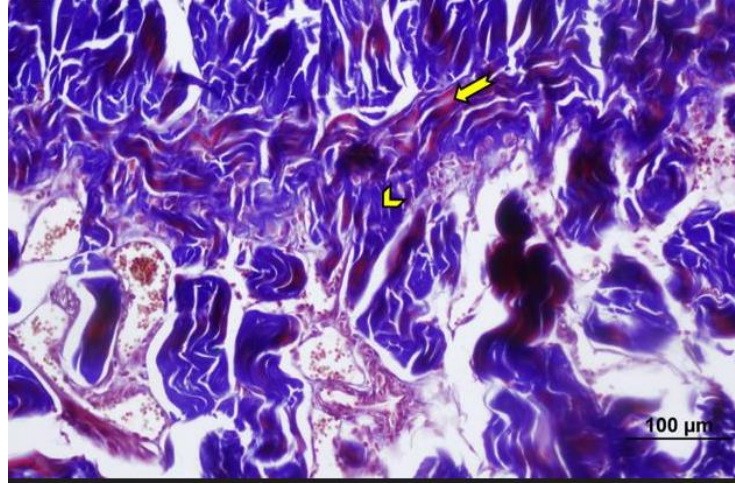
**Resim 4. 2** Kontrol grubundaki bir deneğe ait penis kesiti. Bağ doku-kollajen lifler (köşeli çift ayraç) ve düz kas (çentikli ok) (Masson trikrom x200).

#### 4.2.2. Priapizm/Reperfüzyon Grubu Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Korpus spongiosumu çevreleyen tunika albugineada ayrılmalar ve oldukça yoğun hemoraji mevcuttu. Korpus kavernozumda; inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kavernöz sinüslerde belirgin konjesyon, düz kas ve kollajen liflerde belirgin düzensizlik mevcuttu. Ancak düz kas ve kollajen lif yoğunluğu, kontrol grubuna benzerdi (Resim 4.3, Resim 4.4).



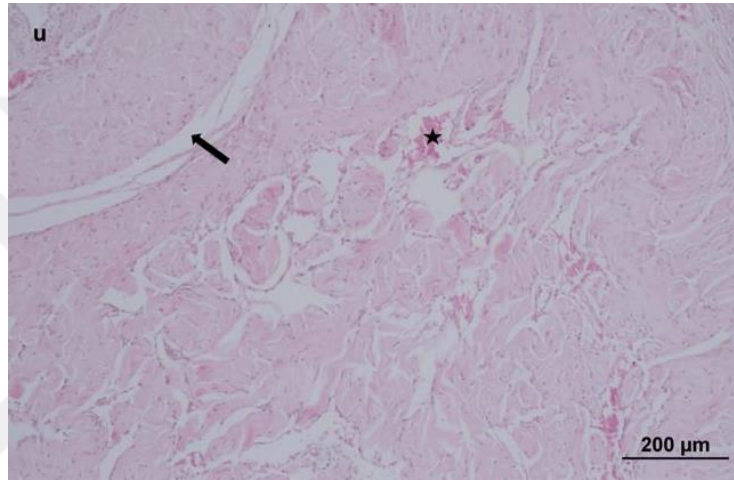
**Resim 4. 3** Priapizm/ reperfüzyon grubundaki bir deneye ait penis kesiti. Ürotelyum (u), korpus spongiosumu çevreleyen tunika albugineada ayrılma ve hemoraji (ok), kavernöz sinüs konjesyonu (yıldız) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başı) (H&E x100).



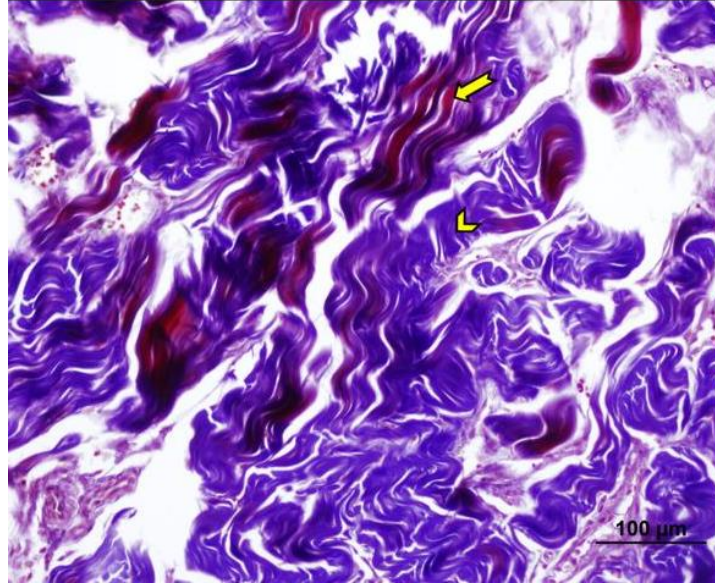
**Resim 4. 4** Priapizm/ reperfüzyon grubundaki bir deneye ait penis kesiti. Bağ doku-kollajen lifler (köşeli çift ayraç) ve düz kas (çentikli ok) (Masson trikrom x200).

#### 4.2.3. Priapizm/Reperfüzyon + Klorojenik Asit Grubu Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Korpus spongiosumu çevreleyen tunika albugineada ayrılmalar ve yer yer hemoraji mevcut olmakla birlikte priapizm/reperfüzyon grubuna göre azalmıştı. Korpus kavernozumlarda izlenen inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kavernöz sinüslerdeki konjesyonda da priapizm grubuna göre azalma izlendi. Korpus kavernozumdaki düz kas ve kollajen liflerin görünümü ve düz kas ve kollajen lif yoğunluğu da kontrol grubuna benzerdi (Resim 4.5, Resim 4.6).



**Resim 4. 5** Priapizm/ reperfüzyon + klorjenik asit grubundaki bir deneğe ait penis kesiti. Ürotelyum (u), kavernöz sinüs konjesyonu (yıldız) ve korpus spongiosumu çevreleyen tunika albugineada ayrılma (ok), (H&E x100).



**Resim 4. 6** Priapizm/ reperfüzyon + klorjenik asit grubundaki bir deneğe ait penis kesiti. Bağ doku-kollajen lifler (köşeli çift ayraç) ve düz kas (çentikli ok) (Masson trikrom x200).

Tüm dokularda ortak parametreler olarak kavernöz sinüs konjesyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, tunika albugineada ayrılma ve/veya hemoraji araştırıldı. Gruplara ait incelemelerde elde edilen histolojik değerlendirme sonuçları tablo 4.3’de sunulmuştur.

**Tablo 4.3** Histolojik verilere ait skorlar

| Gruplar                   | Kavernöz Sinüs Konjesyonu | İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu | Tunika Albugineada Ayrılma ve/veya Hemoraji |
|---------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------|
| Kontrol 1                 | 2                         | 1                                | 2                                           |
| Kontrol 2                 | 0                         | 1                                | 0                                           |
| Kontrol 3                 | 1                         | 0                                | 1                                           |
| Kontrol 4                 | 1                         | 0                                | 0                                           |
| Kontrol 5                 | 1                         | 0                                | 0                                           |
| Kontrol 6                 | 0                         | 0                                | 1                                           |
| Priapizm/Reperfüzyon-1    | 3                         | 3                                | 2                                           |
| Priapizm/Reperfüzyon-2    | 3                         | 1                                | 3                                           |
| Priapizm/Reperfüzyon-3    | 3                         | 2                                | 3                                           |
| Priapizm/Reperfüzyon-4    | 2                         | 1                                | 3                                           |
| Priapizm/Reperfüzyon-5    | 3                         | 2                                | 2                                           |
| Priapizm/Reperfüzyon-6    | 2                         | 1                                | 3                                           |
| Pri/Rep+Klorojenik asit-1 | 2                         | 2                                | 2                                           |
| Pri/Rep+Klorojenik asit-2 | 2                         | 0                                | 1                                           |
| Pri/Rep+Klorojenik asit-3 | 1                         | 1                                | 2                                           |
| Pri/Rep+Klorojenik asit-4 | 2                         | 1                                | 2                                           |
| Pri/Rep+Klorojenik asit-5 | 3                         | 0                                | 1                                           |
| Pri/Rep+Klorojenik asit-6 | 1                         | 1                                | 2                                           |

‘Kontrol grubu’ ile ‘priapizm/reperfüzyon grubu’ karşılaştırıldığında istatistiksel incelemeler sonucunda dokularda kavernöz sinüs konjesyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve tunika albugineada oluşan ayrılma ve/ veya hemoraji değerlerinde anlamlı farklılıklar olduğu izlenmektedir.

**Tablo 4.4** Kontrol grubu ile priapizm/reperfüzyon grubuna ilişkin histolojik veriler

| Gruplar                                     | p<0,05 ise p değeri* |
|---------------------------------------------|----------------------|
| Kavernöz Sinüs Konjesyonu                   | p=0.004              |
| İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu            | p=0.015              |
| Tunika Albugineada Ayrılma ve/veya Hemoraji | p=0.004              |

\*Mann-Whitney U testi

‘Priapizm/reperfüzyon grubu’ ile ‘priapizm/reperfüzyon+ klorojenik asit grubu’ karşılaştırıldığında istatistiksel incelemeler sonucunda yalnızca tunika albugineada oluşan ayrılma ve/ veya hemoraji değerlerinde anlamlı farklılıklar olduğu görüldü.

**Tablo 4.5** Priapizm/reperfüzyon ve priapizm/reperfüzyon + klorojenik asit gruplarına ilişkin histolojik veriler

| Gruplar                                     | p<0,05 ise p değeri* |
|---------------------------------------------|----------------------|
| Kavernöz Sinüs Konjesyonu                   |                      |
| İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu            |                      |
| Tunika Albugineada Ayrılma ve/veya Hemoraji | p=0.026              |

\*Mann-Whitney U testi

## 5. TARTIŞMA

Cinsel istek hali olmaksızın oluşan ve 4-6 saati geçen ereksiyon haline priapizm denmektedir(1). Tüm priapizm olguların %95'ini oluşturan yıllık insidansı 100.000 erkekte 0,3-1,5 arasında rapor edilen iskemik priapizm, penisin kompartman sendromu şeklinde düşünülebilir(135). Tedavisinde oluşan aksaklıklar kavernöz dokularda kalıcı hasara ve fonksiyon kaybına sebep olabilmektedir(4). Oluşabilecek hasarın önlenmesinde en önemli faktör iskemi süresi olup, reperfüzyon hasarı ile aralarında doğru orantı olduğu gösterilmiştir(136).

İskemik priapizmin deneysel hayvan modelinde reaktif oksijen radikalleri tarafından oluşan hasar sonucu ortamda lipid peroksidasyonu ve artmış hem-oksijenaz aktivasyonunda artış izlenir (5,6). İskemiye bağlı progresif fibroziste rol alan patofizyolojik faktörler arasında hipoksi ile indüklenen büyüme faktörleri de sayılabilir, özellikle doku onarımında önemli rol üstlenen TGF- $\beta$  pleotropik sitokinlerden birisidir. Hipoksi ve oksidatif stres ile indüklendiğinde bu sitokin doku hasarı ve skar oluşumuna yol açabilmektedir (5,137).

Korpus kavernozumdaki kapalı alanda oluşan iskemi, kavernoza sirkülasyonu ciddi bir şekilde bozar. İskemik priapizmde, kavernoza düz kasta ultrastrüktürel değişiklikler 12 saat sonra, fokal nekroz 24 saat sonra, son olarak geniş nekroz ve fibroblast benzeri hücrelerin transformasyonu ise 48 saat sonra görülmektedir(3). İskemik priapizmde düz kas nekrozu, korporal fibrozis ve perminant erektil disfonksiyon (ED) gibi irreversibl sonuçları azaltmak için acil medikal müdahale gereklidir(3,138). ED gelişiminin en önemli prediktörü priapizmin süresidir. Priapizmin başlangıcından 48-72 saat sonrasında yapılan müdahaleler ereksiyon ve ağrının giderilmesinde yardımcı olabilirken uzun dönemde ED gelişimini önlemede etkinliği azdır.

Reperfüzyonun kendisi IR hasarını meydana getirir ve iskemik süreç boyunca hücre düzeyinde oluşan iyon değişimleri, proinflamatuvar sitokinlerin lökosit adezyon molekülleri yapımında artma, antioksidan miktarında azalma, hücreyi reperfüzyonda meydana gelen hasara karşı savunmasız bırakır. Oluşan bu etkileşim çeşitli biyokimyasal mekanizmalar ile hücre yapılarına zarar verir(56,139).

SOD, katalaz ve GSHPx, lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan savunma sistemlerinde yer alan enzimlerdendir. Buna ek olarak çeşitli fitokimyasallar da bulunmaktadır(140).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı önlemek veya hücreyi bu oksidatif hasardan korumak için kullanılan doğal antioksidanlar üzerine olan ilgi son yıllarda artış göstermiştir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalara göre de yara iyileştirmesini hızlandırdığı izlenmektedir(98).

Fenolik bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin araştırılması özellikle son 20 yılda popüler bir alan haline gelmiştir. Bunun ana nedeni fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri ve bunların kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, kanser, I/R hasarı ve oksidatif stresle ilişkili diyabet gibi çeşitli hastalıkları önlemedeki olası rolüdür. Klorojenik asit (CGA), kafeik ve kinik asitler arasında oluşan esterdir ve insan diyetinde en bol bulunan bitki polifenollerinden biridir(141). Çay, fasulye, kahve, dut, kakao, narenciye, elma ve armut CGA'nın başlıca diyet kaynaklarıdır(142). CGA'nın antioksidan, antienflamatuar, hepatoprotektif, antimikrobiyal, kardiyoprotektif, antipiretik, antidiyabetik ve nöroprotektif gibi birçok biyolojik işlevi olduğu bildirilmektedir(119,142). Ayrıca bağırsak, kalp ve beyin dahil olmak üzere farklı organlarda I/R hasarına karşı CGA'nın koruyucu etkilerini bildiren, giderek artan sayıda çalışma vardır(13,143,144).

Deaquan Liu ve ark. sıçanlar üzerinde serebral iskemi/reperfüzyon modelin de yaptığı bir çalışmaya göre klorojenik asitin doza bağlı olarak beyin hasarını azalttığını, bununla birlikte SOD aktivitesini, GSH seviyesini artırıp, ROS üretimini azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada klorojenik asitin, oksidatif stres kaynaklı beyin hasarını ve apoptozunu azalttığı izlenmiştir(145).

Tuncay Toprak ve ark. sıçanlar da renal iskemi/reperfüzyon modelin de yaptığı çalışmaya göre ise klorojenik asit tedavisinden sonra dokularda histopatolojik olarak düzelme görüldüğü, iskemi/ reperfüzyon grubunun artan TAS, TOS ve OSI değerlerinin ilaç enjeksiyonu sonrasında önemli ölçüde düşüş sağlandığı belirtilmiştir. Bu klorojenik asitin böbrek dokusunda I/R hasarında karşı koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir(146).

İ. Kazaz ve ark. yine sıçanlar da testis torsiyon/detorsiyon modelin de klorojenik asitin endoplazmik retikulum stresi üzerinde yaptığı bir çalışmada, torsiyon/detorsiyon grubunda artan doku MDA, GRP78, ATF6 ve CHOP düzeylerinin, klorojenik asit tedavisi ile önemli ölçüde geri çevirildiği, histopatolojik olarak incelendiğinde ise düzelme saptandığı belirtilmiştir(147)

Yaptığımız bu çalışma ile ratlarda deneysel olarak oluşturulan akut iskemik priapizm

modelinde, 1 saatlik akut iskemik priapizm ve yarım saatlik reperfüzyon sonrası geri dönüşümsüz hasar oluşmadan önce dokulardaki erken histopatolojik değişiklikleri (Kavernöz Sinüs Konjesyonu, İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu, Tunika Albugineada Ayrılma ve/veya Hemoraji) ve biyokimyasal verileri (Doku TOS, TAS, OSI, GSH, MPO, GRP78, ATF6, CHOP, MDA, SOD, GPx) inceledik. Doku seviyelerindeki değişiklikler ve uygulanacak olan klorojenik asitin IR hasarı üzerine olası koruyucu etkisinin oksidan-antioksidan denge açısından değerlendirilmesini amaçladık.

GRP78, protein sentezi, katlanması ve kalite kontrolünde önemli rol oynayan bir şaperondur(148). Ayrıca GRP78, UPR'nin başlatıcısı olarak görev yapar. Bu nedenle GRP78, patolojik koşullar altında ER stresi için yaygın olarak kullanılan hassas bir belirteçdir(149). ATF6'nın proapoptotik CHOP'un erken dinamiklerini şekillendirdiğini öne süren çalışmalar da mevcuttur(150). Zhang ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışma da CGA'nın ER stresinin neden olduğu hücre ölümünü ve palmitik asitin neden olduğu ER stres göstergelerinin seviyelerini inhibe ettiği göstermiştir(15).

Çalışmamızdaki histopatolojik veriler değerlendirildiğinde CGA'nın priapizmde oluşan kavernöz sinüs konjesyonunu azalttığı gösterilmiş, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azalttığı izlenmiş ve tunika albugineada ayrılma ve/veya hemorajide olumlu yönde etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Son yıllarda bir başka fenolik asit türevi olan ferulik asidin beyin, kalp, böbrek, karaciğer, retina dahil çeşitli organlarda I/R hasarına karşı koruyucu etkisinin araştırıldığı çok sayıda deneysel çalışma yapılmıştır. Ren ve ark. ratlarda ferulik asidin serebral I/R hasar modelinde malondialdehit (MDA) düzeyini azaltarak ve glutatyon peroksidaz(GSH-Px) ve süperoksit dismutaz(SOD) düzeylerini artırarak koruyucu bir etki gösterdiğini saptamışlardır(151). Yine Awadalla ve ark. çalışmalarında, ferulik asidin uygulamasının ratlarda renal I/R hasarını önemli derecede azalttığını göstermiştir(152). Gao ve ark. FA'nın ratlarda myokardiyal I/R hasar modelinde MDA düzeyini azaltarak ve SOD aktivitesini artırarak koruyucu etkinliğini ortaya koymuştur(153).

Katalaz esas olarak peroksizomlarda bulunan  $H_2O_2$ 'yi vücuttan temizleyen en önemli antioksidan enzimdir(154,155). Yihui ve ark. neonatal ratlarda hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturarak yapmış oldukları bir çalışmada klorojenik asidin beyin dokusunda CAT değerini artırarak antioksidan etkinlik gösterdiği izlenmiştir(156).

Özetle, yaptığımız çalışmada klorojenik asit verilen gruptaki ratlarda GRP78'in

düşüşünün anlamlı olduğu saptanmış, CGA'nın ER stresi üzerindeki etkiyi azalttığı görülmüştür. Ayrıca tunika albugineada ayrılma ve/veya hemorajide anlamlı derecede düzelme sağlandığı histolojik ve istatistiksel açıdan saptanmıştır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Deneysel model, biyokimyasal olarak priapizm/ reperfüzyon grubundaki artan doku GRP78 seviyelerinin klorojenik asit verilen ratlarda normalleştiğini göstermiştir.
- Deneysel model, histolojik olarak priapizm/ reperfüzyon grubundaki ratlarda izlenen tunika albugineada oluşan ayrılma ve/veya hemorajide klorojenik asit uygulamasının normalleşme ile sonuçlandığını göstermiştir.
- Klorojenik asitin, priapizm/ reperfüzyon durumunda dokularda oluşabilecek biyokimyasal ve histolojik hasarı engellemede etkili olabileceği kanısı uyanmıştır.
- Bu ve benzeri verilerin ışığında, klorojenik asitin insanlarda kullanımı konusunda çalışmalara gerek duyulmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Montague DK, Jarow J, Broderick GA, Dmochowski RR, Heaton JPW, Lue TF, et al. American Urological Association guideline on the management of priapism. *J Urol*. 2003 Oct 1;170(4 Pt 1):1318–24.
2. Berger R, Billups K, Brock G, Broderick G, Dhabuwala C, Goldstein I, et al. Report of the American Foundation for Urologic Disease (AFUD) Thought Leader Panel for evaluation and treatment of priapism. *Int J Impot Res*. 2001;13 Suppl 5:S39–43.
3. Spycher MA, Hauri D. The ultrastructure of the erectile tissue in priapism. *J Urol*. 1986;135(1):142–7.
4. Pryor J, Akkus E, Alter G, Jordan G, Lebre T, Levine L, et al. Priapism. *J Sex Med*. 2004;1(1):116–20.
5. Jin YC, Gam SC, Jung JH, Hyun JS, Chang KC, Hyun JS. Expression and Activity of Heme Oxygenase- 1 in Artificially Induced Low- Flow Priapism in Rat Penile Tissues. *J Sex Med*. 2008 Aug 1;5(8):1876–82.
6. Munarriz R, Park K, Huang YH, Saenz De Tejada I, Moreland RB, Goldstein I, et al. Reperfusion of ischemic corporal tissue: Physiologic and biochemical changes in an animal model of ischemic priapism. *Urology*. 2003 Oct 1;62(4):760–4.
7. Sanli O, Armagan A, Kandirali E, Ozerman B, Ahmedov I, Solakoglu S, et al. TGF- $\beta$ 1 neutralizing antibodies decrease the fibrotic effects of ischemic priapism. *Int J Impot Res*. 2004 Dec;16(6):492–7.
8. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2014 [cited 2022 Oct 2];15(11):4405–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24969860/>
9. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(1):81–128.
10. Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1987;25(4):317–64.
11. Domitrović R, Cvijanović O, Šušnić V, Katalinić N. Renoprotective mechanisms of chlorogenic acid in cisplatin-induced kidney injury. *Toxicology*. 2014 Jul 15;324:98–107.
12. Kumar G, Mukherjee S, Paliwal P, Singh S Sen, Birla H, Singh SP, et al. Neuroprotective effect of chlorogenic acid in global cerebral ischemia-reperfusion rat model. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2019 Oct 1;392(10):1293–309.
13. Miao M, Cao L, Li R, Fang X, Miao Y. Protective effect of chlorogenic acid on the focal cerebral ischemia reperfusion rat models. *Saudi Pharm J SPJ*. 2017 May 1;25(4):556.
14. Shan S, Tian L, Fang R. Chlorogenic Acid Exerts Beneficial Effects in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity by Inhibition of Endoplasmic Reticulum

- Stress. *Med Sci Monit.* 2019;25:453–9.
15. Zhang Y, Miao L, Zhang H, Wu G, Zhang Z, Lv J. Chlorogenic acid against palmitic acid in endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis resulting in protective effect of primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis.* 2018 Nov 28;17(1).
  16. Graham SD, Keane TE. Glenn's urologic surgery(Penil And Scrotum's Anatomy), 8th ed. 2016.
  17. Bookstein JJ, Lang E V. Penile magnification pharacoarteriography: details of intrapenile arterial anatomy. *AJR Am J Roentgenol.* 1987;148(5):883–8.
  18. Kavoussi LR, Novick AC, W. Partin A. P. A. . Wein A.J.,Kavoussi L.R., Camupbell's Urology. 10th Ed. Physiology Of Penile Erection And Pathophysiology Of Erectile Dysfunction, 10th ed. Philadelphia, 2012.
  19. Henry BM, Pękala PA, Vikse J, Sanna B, Skinningsrud B, Saganiak K, et al. Variations in the Arterial Blood Supply to the Penis and the Accessory Pudendal Artery: A Meta-Analysis and Review of Implications in Radical Prostatectomy. *J Urol.* 2017 Aug 1;198(2):345–53.
  20. Gray H, Borley NK, Standring S. Mundy AR HJC. Muscles and fasciae of the perineum: true pelvis, pelvic floor and perineum. *Gray's Anatomy (Standring, S. ed.)* 39th ed. Philadelphia 2005; 1365-1371.
  21. Wood HM, Angermeier KW. Anatomic considerations of the penis, lymphatic drainage, and biopsy of the sentinel node. *Urol Clin North Am.* 2010 Aug;37(3):327–34.
  22. Arıncı K, Erhan A. Arıncı K K ST. Penis'in Damar Sistemi ve İnnervasyonu. *Türkiye Klinikleri Temel Tıp Bilimleri* 1991; 11: 81-86.
  23. Junqueira LC. Luis Carlos Junqueira JC. *Temek Histoloji Text & Atlas.* 2006: Nobel Tıp Kitabevi.446.
  24. Breza J, Aboseif SR, Orvis BR, Lue TF, Tanagho EA. Detailed anatomy of penile neurovascular structures: surgical significance. *J Urol.* 1989;141(2):437–43.
  25. Lue T, Basson R, Rosen R. Lue TF: Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction and priapism. *Campbell's Urology (Patrick C.Walsh, ed.).* 8th ed. Vol.2, 2002, 1589-1618 -.
  26. T. L, F. G, SRR. K. Lue T, Giuliano F, Khoury S RR. *Clinical Manual of Sexual Medicine Sexual Dysfunctions in Men.*2003 -.
  27. Guyton A. Guyton AC. HJ. *Textbook of Medical Physiology* 10th ed. 2000.
  28. Ralph DJ. Normal erectile function. *Clin Cornerstone.* 2005;7(1):13–7.
  29. Anafarta K. Anafarta K GÖ. Erkek Cinsel İşlev Bozuklukları. In: *Temel Üroloji.* 4th ed. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2011. p. 1099-1100 -.
  30. Wagner G, Gerstenberg T, Levin RJ. Electrical activity of corpus cavernosum during flaccidity and erection of the human penis: a new diagnostic method? *J Urol.* 1989;142(3):723–5.
  31. Broderick GA, Kadioglu A, Bivalacqua TJ, Ghanem H, Nehra A, Shamloul R.

- Priapism: pathogenesis, epidemiology, and management. *J Sex Med.* 2010;7(1 Pt 2):476–500.
32. POHL J, POTT B, KLEINHANS G. Priapism: a three-phase concept of management according to aetiology and prognosis. *Br J Urol.* 1986;58(2):113–8.
  33. De Jesus LE, Dekermacher S. Priapism in children: Review of pathophysiology and treatment. *J Pediatr (Rio J).* 2009;85(3):194–200.
  34. Witt MA, Goldstein I, Saenz de Tejada I, Greenfield A, Krane RJ. Traumatic laceration of intracavernosal arteries: the pathophysiology of nonischemic, high flow, arterial priapism. *J Urol.* 1990;143(1):129–32.
  35. Brock G, Breza J, Lue TF, Tanagho EA. High flow priapism: a spectrum of disease. *J Urol.* 1993;150(3):968–71.
  36. Adeyolu AB, Olujohungbe ABK, Morris J, Yardumian A, Bareford D, Akenova A, et al. Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications - an international multicentre study. *BJU Int.* 2002 Dec;90(9):898–902.
  37. Tunç O, Firdolaş F. *Fırat Tıp Dergisi » Makale » Priapizm Patofizyolojisinde Alternatif Yolaklar.*
  38. Uluocak N, Atılğan D, Erdemir F, Parlaktas BS, Yasar A, Erkorkmaz U, et al. An animal model of ischemic priapism and the effects of melatonin on antioxidant enzymes and oxidative injury parameters in rat penis. *Int Urol Nephrol.* 2010;42(4):889–95.
  39. Hatzichristou D, Salpiggidis G, Hatzimouratidis K, Apostolidis A, Tzortzis V, Bekos A, et al. Management strategy for arterial priapism: therapeutic dilemmas. *J Urol.* 2002 Nov 1;168(5):2074–7.
  40. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med.* 1992 Jan 9;326(2):90–4.
  41. Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, Khan MA, Jeremy JY, Morgan RJ, et al. Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? *Cardiovasc Res.* 1999 Aug 15;43(3):658–65.
  42. Burnett AL, Tillman SL, Chang TSK, Epstein JI, Lowenstein CJ, Bredt DS, et al. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol.* 1993;150(1):73–6.
  43. Phatarpekar P V., Wen J, Xia Y. Role of adenosine signaling in penile erection and erectile disorders. *J Sex Med.* 2010;7(11):3553–64.
  44. Mi T, Abbasi S, Zhang H, Uray K, Chunn JL, Ling WX, et al. Excess adenosine in murine penile erectile tissues contributes to priapism via A2B adenosine receptor signaling. *J Clin Invest.* 2008 Apr 1;118(4):1491–501.
  45. Patole S, Lee J, Buettner P, Whitehall J. Improved oxygenation following adenosine infusion in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Biol Neonate.* 1998 Nov;74(5):345–50.
  46. Shamloul R. The potential role of the heme oxygenase/carbon monoxide system in

- male sexual dysfunctions. *J Sex Med.* 2009;6(2):324–33.
47. Hellstrom WJG, Gittelman M, Karlin G, Segerson T, Thibonnier M, Taylor T, et al. Sustained efficacy and tolerability of vardenafil, a highly potent selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, in men with erectile dysfunction: Results of a randomized, double-blind, 26-week placebo-controlled pivotal trial. *Urology.* 2003 Apr 1;61(4 SUPPL. 1):8–14.
  48. Lin CS. Phosphodiesterase type 5 regulation in the penile corpora cavernosa. *J Sex Med.* 2009;6 Suppl 3(SUPPL. 3):203–9.
  49. Bialecki ES, Bridges KR. Sildenafil relieves priapism in patients with sickle cell disease [1]. *Am J Med.* 2002 Aug 15;113(3):252.
  50. Burnett A, Bivalacqua T, Musicki B. Long-term oral phosphodiesterase 5 inhibitor therapy alleviates recurrent priapism | Read by QxMD.
  51. Lin CS, Lin G, Lue TF. Cyclic nucleotide signaling in cavernous smooth muscle. *J Sex Med.* 2005;2(4):478–91.
  52. Broderick GA, Gordon D, Hypolite J, Levin RM. Anoxia and corporal smooth muscle dysfunction: a model for ischemic priapism. *J Urol.* 1994;151(1):259–62.
  53. Benigni A, Remuzzi G. Endothelin antagonists. *Lancet (London, England).* 1999 Jan 9;353(9147):133–8.
  54. Raja SG, Dreyfus GD. Current status of bosentan for treatment of pulmonary hypertension. *Ann Card Anaesth.* 2008 Jan;11(1):6–14.
  55. Yuan J, Desouza R, Westney OL, Wang R. Insights of priapism mechanism and rationale treatment for recurrent priapism. *Asian J Androl.* 2008 Jan 1;10(1):88–101.
  56. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of Reperfusion Injury. *Am J Med Sci.* 1994 Apr 1;307(4):284–92.
  57. Ow YLP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jul;9(7):532–42.
  58. Aydin HH, Selvi N, Saydam G, Tobu M, Uzunoglu S, Uslu R, et al. Up-regulation of serine/threonine protein phosphatase type 2A regulatory subunits during methylprednisolone-induced differentiation of leukaemic HL-60 cells. *Clin Lab Haematol.* 2000;22(5):271–4.
  59. Dokuyucu R, Karateke A, Gokce H, Kurt RK, Ozcan O, Ozturk S, et al. Antioxidant effect of erdosteine and lipoic acid in ovarian ischemia-reperfusion injury. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014 Dec 1;183:23–7.
  60. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med.* 1991;42:225–46.
  61. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: Preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2011 Nov;301(5):1723–41.
  62. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GEN, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol.* 1992;32 Suppl(1 S):S33–42.

63. Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun*. 1989;7(3–6):255–64.
64. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol*. 1988;254(5 Pt 1).
65. Valko M, Morris H, Cronin M. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005 Apr 30;12(10):1161–208.
66. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(9):1482–95.
67. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol*. 2001;15(5):293–306.
68. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1997;14(3):195–203.
69. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med*. 1991 Sep 30;91(3C):S2.
70. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet (London, England)*. 1994 Sep 10;344(8924):721–4.
71. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44–84.
72. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000 Jul 28;109(1):33–44.
73. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain 1. undefined. 1995 Apr;9(7):526–33.
74. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008 Jun;4(2):89.
75. Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free Radic Res*. 1998;28(6):601–9.
76. Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J*. 2005 Sep 9;390(Pt 2):377.
77. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 2004 Nov 19;279(47):49064–73.
78. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol*. 1995 Nov 1;3(6):348–54.
79. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49(2 Suppl 1):3–8.
80. López-Nebolina F, Páez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of protection of verapamil by preventing neutrophil infiltration in the ischemic rat kidney. *J Surg Res*. 1996;61(2):469–72.
81. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1994;81(5):637–47.

82. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2004;70:71–86.
83. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2007 Oct;376(1–2):1–43.
84. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion Injury. *Surg Clin North Am*. 1992 Feb 1;72(1):65–83.
85. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med*. 1993;21(9):1376–86.
86. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol*. 1993;16(4 Suppl 1):19–26.
87. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses*. 2007;68(6):1363–70.
88. Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res*. 1991;42(2):125–38.
89. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol*. 1999 Nov 15;101(2):148–60.
90. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol*. 2008 Feb;48(2–3):109–14.
91. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg*. 2009;22(1):46–55.
92. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*. 2007 Feb;115(2):81–103.
93. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'Aquila G, Zuliani G, et al. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem*. 2008 May 6;15(12):1236–48.
94. Mickle DAG, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol*. 1993 Jan 1;9(1):89–93.
95. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*. 2002 Sep;54(3):375–429.
96. Sen S, Chakrabarty R. (PDF) Free radicals, antioxidants, Diseases and phytomedicines: Current status and Future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 3(1):91-100. 2010.
97. Young IS, Woodside J V. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*.

- 2001;54(3):176–86.
98. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. ACS Symp Ser [Internet]. 2011 Nov 17 [cited 2022 Oct 20];1083:1–37. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bk-2011-1083.ch001>
  99. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. J Pineal Res. 2004 Jan;36(1):1–9.
  100. Limón-Pacheco J, Gonshebat ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutat Res. 2009 Mar 31;674(1–2):137–47.
  101. Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. The function of catalase-bound NADPH. J Biol Chem. 1987 Jan 15;262(2):660–6.
  102. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow- Walden L, Chuang J, et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. J Pineal Res. 1995;18(1):1–11.
  103. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002;82(1):47–95.
  104. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. Crit Rev Food Sci Nutr. 2004;44(4):275–95.
  105. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. Biomed Pharmacother. 2003 May 1;57(3):145–55.
  106. Lagman M, Ly J, Saing T, Singh MK, Tudela EV, Morris D, et al. Investigating the causes for decreased levels of glutathione in individuals with type II diabetes. PLoS One. 2015 Mar 19;10(3).
  107. Pei S, Minhajuddin M, Callahan KP, Balys M, Ashton JM, Neering SJ, et al. Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells. J Biol Chem. 2013 Oct 2;288(47):33542–58.
  108. Hevia D, Mayo JC, Tan DX, Rodriguez-Garcia A, Sainz RM. Melatonin enhances photo-oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by an antioxidant reaction that renders N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK). PLoS One. 2014 Oct 2;9(10).
  109. Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage: Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. Ann N Y Acad Sci. 2001;939:200–15.
  110. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. Ann N Y Acad Sci. 2000;917:376–86.
  111. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. Horm Metab Res. 1997;29(8):363–72.
  112. A. SG, Oya BD. COENZYME Q10 : Ankara Üniversitesi Eczac Fakültesi Derg. 2005 Jun 1;34(2):129–55.
  113. González-Pérez Ó, Moy-López NA, Guzmán-Muñiz J. Alpha-tocopherol and alpha-

- lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine. *Rev Investig Clínica*. 2008;60(1):58–67.
114. Li Y, Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr*. 2007;137(10):2171–84.
  115. Carr AC, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(6):1086–107.
  116. Silalahi J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2002;11(1):79–84.
  117. Ludwig IA, Clifford MN, Lean MEJ, Ashihara H, Crozier A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct*. 2014;5(8):1695–717.
  118. Miao M, Xiang L. Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. *Adv Pharmacol*. 2020 Jan 1;87:71–88.
  119. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother*. 2018 Jan 1;97:67–74.
  120. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm*. 2010;2010.
  121. Suzuki A, Kagawa D, Ochiai R, Tokimitsu I, Saito I. Green Coffee Bean Extract and Its Metabolites Have a Hypotensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertens Res*. 2002;25(1):99–107.
  122. Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, Actis-Goretti L, Thakkar SK, da Silva Pinto M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br J Clin Pharmacol*. 2013 Mar;75(3):588.
  123. Stalmach A, Mullen W, Barron D, Uchida K, Yokota T, Cavin C, et al. Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption. *Drug Metab Dispos*. 2009 Aug;37(8):1749–58.
  124. Yuan Y, Gong X, Zhang L, Jiang R, Yang J, Wang B, et al. Chlorogenic acid ameliorated concanavalin A-induced hepatitis by suppression of Toll-like receptor 4 signaling in mice. *Int Immunopharmacol*. 2017 Mar 1;44:97–104.
  125. Venditti A, Bianco A, Frezza C, Conti F, Bini LM, Giuliani C, et al. Essential oil composition, polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy. *Ind Crops Prod*. 2017 Dec 23;77:353–63.
  126. Dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, De Souza GEP. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull*. 2006 Nov;29(11):2236–40.
  127. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease. *J Innate Immun*. 2010 Apr;2(3):216–27.
  128. Yang LL, Wang GQ, Yang LM, Huang ZB, Zhang WQ, Yu LZ. Endotoxin Molecule

- Lipopolysaccharide-Induced Zebrafish Inflammation Model: A Novel Screening Method for Anti-Inflammatory Drugs. *Mol* 2014, Vol 19, Pages 2390-2409. 2014 Feb 21;19(2):2390–409.
129. Zhang W, Piao L, Liu X. Chlorogenic acid suppresses neutrophil recruitment to tumors by inducing apoptosis and reverse migration. *J Funct Foods*. 2020 Dec 1;75:104216.
  130. Dickson JC, Liese AD, Lorenzo C, Haffner SM, Watkins SM, Hamren SJ, et al. Associations of coffee consumption with markers of liver injury in the insulin resistance atherosclerosis study. *BMC Gastroenterol*. 2015 Dec 12;15(1).
  131. Layton LL, Panzani R, Greene FC, Corse JW. Atopic hypersensitivity to a protein of the green coffee bean and absence of allergic reactions to chlorogenic acid, low-molecular-weight components of green coffee, or to roasted coffee. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1965;28(1):116–27.
  132. Li BQ, Dong X, Yang GQ, Fang SH, Gao JY, Zhang JX, et al. Role of chlorogenic acid in the toxicity induced by Chinese herbal injections. *Drug Chem Toxicol*. 2010 Oct;33(4):415–20.
  133. Wu X, Yang H, Lin D, Zhang J, Luo F, Xu X. [Comprehensive research and evaluation of chlorogenic acid allergy] - PubMed. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. p. ;35(24):3357-61.
  134. Karaguzel E, Bayraktar C, Kutlu O, ... YE-. The possible protective effects of dipyrindamole on ischemic reperfusion injury of priapism-*International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*, 42(1), 146–153.
  135. Tay YK, Spornat D, Rzetelski-West K, Appu S, Love C. Acute management of priapism in men. *BJU Int*. 2012 Apr;109 Suppl(SUPPL. 3):15–21.
  136. Concannon MJ, Kester CG, Welsh CF, Puckett CL. Patterns of free-radical production after tourniquet ischemia: implications for the hand surgeon. *Plast Reconstr Surg*. 1992;89(5):846–52.
  137. Moreland RB, Traish A, McMillin MA, Smith B, Goldstein I, Saenz de Tejada I. PGE1 suppresses the induction of collagen synthesis by transforming growth factor-beta 1 in human corpus cavernosum smooth muscle. *J Urol*. 1995 Mar 1;153(3 Pt 1):826–34.
  138. El-Bahnasawy MS, Dawood A, Farouk A. Low-flow priapism: risk factors for erectile dysfunction. *BJU Int*. 2002;89(3):285–90.
  139. Lysiak JJ, Nguyen QAT, Kirby JL, Turner TT. Ischemia-reperfusion of the murine testis stimulates the expression of proinflammatory cytokines and activation of c-jun N-terminal kinase in a pathway to E-selectin expression. *Biol Reprod*. 2003 Jul 1;69(1):202–10.
  140. Poli G, Albano E, Dianzani MU. Free radicals: From basic science to medicine. *Free Radic Biol Med*. 1994 Mar;16(3):411–2.
  141. Cebova M, Pechanova O. Protective Effects of Polyphenols against Ischemia/Reperfusion Injury. *Molecules*. 2020 Aug 1;25(15).
  142. Upadhyay R, Mohan Rao LJ. An Outlook on Chlorogenic Acids—Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities.

<http://dx.doi.org/101080/104083982011576319>. 2013 Jan;53(9):968–84.

143. Kazaz IO, Demir S, Kerimoglu G, Colak F, Turkmen Alemdar N, Yilmaz Dogan S, et al. Chlorogenic acid ameliorates torsion/detorsion-induced testicular injury via decreasing endoplasmic reticulum stress. *J Pediatr Urol*. 2022 Jun 1;18(3):289.e1-289.e7.
144. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm*. 2011 Jan 17;403(1–2):136–8.
145. Liu D, Wang H, Zhang Y, Zhang Z. Protective Effects of Chlorogenic Acid on Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury Rats by Regulating Oxidative Stress-Related Nrf2 Pathway. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:51–60.
146. Toprak T, Sekerci CA, Aydın HR, Ramazanoglu MA, Arslan FD, Basok BI, et al. Protective effect of chlorogenic acid on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Ital di Urol e Androl*. 2020 Jun 24;92(2):153–7.
147. Kazaz IO, Demir S, Kerimoglu G, Colak F, Alemdar NT, Akman AU, et al. Effect of Chrysin on Endoplasmic Reticulum Stress in a Rat Model of Testicular Torsion. *J Invest Surg*. 2022;35(5):1106–11.
148. Zhu H, Zhou H. Novel insight into the role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021.
149. Kazaz IO, Demir S, Yulug E, Colak F, Bodur A, Yaman SO, et al. N-acetylcysteine protects testicular tissue against ischemia/reperfusion injury via inhibiting endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *J Pediatr Urol*. 2019 May 1;15(3):253.e1-253.e8.
150. Yang H, Niemeijer M, van de Water B, Beltman JB. ATF6 Is a Critical Determinant of CHOP Dynamics during the Unfolded Protein Response. *iScience*. 2020 Feb 21;23(2):100860.
151. Ren Z, Li Y, Zhang R, Li Y, Yang Z, Yang H. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms in vitro and in vivo. *Int J Mol Med*. 2017 Nov 1;40(5):1444–56.
152. Awadalla A, Hussein AM, El-Far YM, Barakat N, Hamam ET, El-Sherbiny M, et al. Effect of zinc oxide nanoparticles and ferulic acid on renal ischemia/reperfusion injury: possible underlying mechanisms. *Biomed Pharmacother*. 2021 Aug 1;140.
153. Gao Y, Hao J, Zhang H, Qian G, Jiang R, Zhao G, et al. Protective effect of the combinations of glycyrrhizic, ferulic and cinnamic acid pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Ther Med*. 2015;9(2):435.
154. Yu F, Tong LJ, Cai DS. Sevoflurane inhibits neuronal apoptosis and expressions of HIF-1 and HSP70 in brain tissues of rats with cerebral ischemia/reperfusion injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(9):5082–90.
155. Yang Y, Li J, Wei C, He Y, Cao Y, Zhang Y, et al. Amelioration of nonalcoholic fatty liver disease by swertiamarin in fructose-fed mice. *Phytomedicine* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2023 Jan 10];59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31005808/>
156. Zheng Y, Li L, Chen B, Fang Y, Lin W, Zhang T, et al. Chlorogenic acid exerts

neuroprotective effect against hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats by activating Sirt1 to regulate the Nrf2-NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Commun Signal.* 2022 Dec 1;20(1):1–20.

