

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

**AKUT İSKEMİK PRIAPİZM MODELİNDE KAFEİK ASİT FENETİL
ESTERİNİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE OLASI
KORUYUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

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

Uzmanlık Tezi

Dr. Ömer Faruk GEÇİCİ

Trabzon – 2024

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

**AKUT İSKEMİK PRIAPİZM MODELİNDE KAFEİK ASİT FENETİL
ESTERİNİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE OLASI
KORUYUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

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

Uzmanlık Tezi

Dr. Ömer Faruk GEÇİCİ

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi Fatih ÇOLAK

Trabzon – 2024

ÖZET

AKUT İSKEMİK PRIAPİZM MODELİNDE KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİNİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE OLASI KORUYUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Giriş:

Priapizm, penisin aşırı ve kontrolsüz bir şekilde uzun süre sert kalması durumudur. Bu durum acil bir tıbbi durumdur ve hemen tedavi edilmelidir, çünkü uzun süreli ereksiyon, penis dokularında hasara neden olabilir ve kalıcı cinsel fonksiyon kaybına yol açabilir. Priapizmin patofizyolojisi, genellikle iki ana tipe ayrılan düşük akışlı (iskemik) ve yüksek akışlı (non-iskemik) priapizm olmak üzere farklı mekanizmalara dayanır. Priapizm sonlandıktan sonra iskemi reperfüzyon hasarı oluşur. Fenolik asit türü olan kafeik asit fenetil esteri (CAPE) güçlü bir antioksidandır. Kafeik asit fenetil esteri hücrelerin serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmasına veya detoksifikasyonunun sağlanmasına yardımcı olmaktadır.

Amaç:

Sıçanlarda oluşturulan penil iskemi-reperfüzyon modelinde uygulanan kafeik asit fenetil esterinin, priapizm+reperfüzyon hasarı üzerine olası olumlu etkilerinin histolojik ve biyokimyasal açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem:

Bu deneysel çalışmada Sprague 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+ kafeik asit fenetil esteri). Alınan penektomi materyalinde doku TOS, TAS, OSI, GSH, MPO, GRP78, ATF6, CHOP, MDA, SOD, GPx seviyelerindeki değişiklikler ile sakrifiye edilen ratların alınan penis dokusunun histolojik özellikleri (kavernöz sinüs konjesyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, tunika albugineada ayrılma) değerlendirilmiştir.

Bulgular:

Çalışmamızda kafeik asit fenetil esteri biyokimyasal olarak doku TOS ve TAS değerlerindeki bozulmayı engelleyebildiği görüldü, histolojik incelemelerde ise inflamatuvar hücre infiltrasyonu yönünden koruyucu olduğunu düşündüren bulgular elde edildi.

Sonuç:

Kafeik asit fenetil esterinin, priapizm/ reperfüzyon durumunda dokularda oluşabilecek biyokimyasal ve histolojik hasarı engellemede etkili olabileceği kanısı uyanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Priapizm, Kafeik asit fenetil esteri, Reperfüzyon hasarı

SUMMARY

ASSESSMENT OF POSSIBLE PROTECTIVE EFFECTS OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER ON ISCHEMIC REPERFUSION INJURY IN AN ACUTE ISCHEMIC PRIAPISM MODEL

Introduction

Venous obstruction and stasis in the corpus cavernosum occur in ischemic priapism in the penis. If the intervention is delayed, it can lead to necrosis of cavernosal smooth muscles, irreversible corporal fibrosis and erectile dysfunction. Ischemia-reperfusion injury occurs after priapism has ended. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a member of the phenols, is a powerful antioxidant. Caffeic acid phenethyl ester helps protect cells from the harmful effects of free radicals or provide detoxification.

Objective

It is aimed to evaluate the possible positive effects of caffeic acid phenethyl ester 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+ caffeic acid phenethyl ester).

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 in the tunica albuginea) were evaluated.

Findings

In our study, it was observed that CAPE could prevent the deterioration in tissue TOS and TAS values biochemically. In our study, it was suggested that caffeic acid phenethyl ester caused by inflammatory cell infiltration has a protective effect in histological examinations.

Result

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

Keywords: Priapism, caffeic acid phenethyl ester, Reperfusion injury

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Penis Anatomisi.....	4
2.2 Penisin Arteryal Dolaşımı.....	5
2.3 Penisin Venöz Dolaşımı.....	6
2.4 Penisin Lenfatik Drenajı	7
2.5 Penisin İnervasyonu.....	7
2.6 Penisin Histolojisi	8
2.7 Ereksiyon Fizyolojisi.....	8
2.8 Priapizmin Patofizyolojisi.....	10
2.9 Kavernozal Düz Kas Relaksasyonunda Artışa Yol Açan MekanizmalarNO-CGMP Yolağı.....	11
2.10 Kavernozal Düz Kas Kontraksiyonunda Azalmaya Yol Açan Mekanizmalar	14
2.11 İskemi ve Reperfüzyon.....	16
2.12 Mekanizmalar.....	18
2.13 Antioksidanların Rolü	22
2.14 Enzimler	22
2.15 Kafeik Asit Fenetil Esteri (CAPE)	28
3. MATERYAL VE METOD.....	32
3.1 Çalışma Grupları	32
3.2 Biyokimyasal İnceleme Yöntemi	35
3.3 Doku Örneklerinin Hazırlanışı.....	35
3.4 Doku Örneklerindeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi	35
3.5 Doku MDA Düzeylerinin Belirlenmesi.....	35
3.6 Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyelerinin Belirlenmesi	37
3.7 Doku Katalaz (CAT) Seviyelerinin Belirlenmesi	39
3.8 Doku Glutasyon Peroksidaz (GPx) Seviyelerinin Belirlenmesi.....	40
3.9 Doku Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Belirlenmesi.....	42
3.10 Doku İnterlökin-6 (IL-6) Seviyelerinin Belirlenmesi.....	43
3.11 Doku Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α) Seviyelerinin Belirlenmesi	45
3.12 Doku Myeloperoksidaz (MPO) Seviyelerinin Belirlenmesi.....	46

3.13 Doku Glukoz ile Düzenlenen Protein 78 (GRP78) Seviyelerinin Belirlenmesi	47
3.14 Doku Aktifleştirici Transkripsiyon Faktör 6 (ATF6) Seviyelerinin Belirlenmesi	49
3.15 Doku C/EBP Homolog Protein (CHOP) Seviyelerinin Belirlenmesi.....	50
3.16 Doku Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi	52
3.17 Toplam Oksidan Durumun (TOS) Belirlenmesi	53
3.18 Toplam Antioksidan Durumun (TAS) Belirlenmesi	53
3.19 Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Hesaplanması.....	53
3.20 Histopatolojik İnceleme Yöntemi.....	54
3.21 İstatistiksel İnceleme Yöntemi	54
4.BULGULAR.....	55
4.1 Histopatolojik Bulgular:	55
4.2 Biyokimyasal Analiz Sonuçları	58
5.TARTIŞMA	61
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
7.KAYNAKLAR	67

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AC	Adenilat siklazı
ADA	Adenozin deaminaz
ATF6	Aktifleştirici Transkripsiyon Faktör 6
C	Kompleman
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CHOP	C/EBP Homolog Protein
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentetaz
ET	Endotelin-1
ETZ	Elektron transport zinciri
CAPE	Kafeik asit fenetil esteri
GRP78	Glikoz regüle protein-78
GSH	Glutasyon S-Transferaz
GSHPx	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Glutasyon disülfid
GST	Glutasyon S-transferaz
GTP	Güanozin trifosfat
H&E	Hematoksilen-eozin
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HO	Hemoksijenaz
HO1-CO	Hemoksijenaz 1-karbonmonoksit
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
IR	İskemi reperfüzyon
KDH	Ksantin dehidrojenaz
KO	Ksantin oksidaz
MCP	Monosit kemoatraktan protein

MDA	Malondialdehit
MPO	Myeloperoksidaz
NAD+	Nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NE	Norepinefrin
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentetaz
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentetaz
O ₂ -	Süperoksit
OH-	Hidroksil
OH-	Hidroksil radikali
OSI	Oksidatif stres indeksi
PDE	Fosfodiesteraz enzimi
PDE5	Fosfodiesteraz tip 5
PNL	Polimorf nüveli lökositler
ROO	Peroksil radikali
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikal
TAS	Toplam antioksidan kapasite ölçümü
TBA	Tiyobarbitürik asit
TGF-b	Transforming growth faktör beta
TNF-a	Tümör nekroz faktör alfa
TOS	Toplam oksidan kapasitesi
UPR	Katlanmamış protein cevabı

ŞEKİLLER

Şekil 1 Penil fasyalar, korporal yapılar,arterler,venler ve sinirlerin ortak görüldüğü penisin enine kesiti.....	- 5 -
Şekil 2 Penisin arteryel dolaşımı.....	- 6 -
Şekil 3 Dorsal penil arterler, venler ve sinirler	- 7 -
Şekil 4 Penil ereksiyonun mekanizması	- 9 -
Şekil 5 Adenozin Metabolizması	- 13 -
Şekil 6 İskemi reperfüzyon hasarında ksantin oksidaz aracılığıyla meydana gelen reaktifoksijen türlerinin oluşumu	- 19 -
Şekil 7 Kafeik asit fenetil esterinin Kimyasal Yapısı	- 29 -

GRAFİKLER

Grafik 1. Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	- 36 -
Grafik 2. SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	- 37 -
Grafik 3. CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği	- 40 -
Grafik 4. GPx ölçümünde kullanılan standart grafiği	- 41 -
Grafik 5. GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği	- 43 -
Grafik 6. IL-6 ölçümünde kullanılan standart grafiği	- 44 -
Grafik 7. TNF- α ölçümünde kullanılan standart grafiği	- 46 -
Grafik 8. MPO ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	- 46 -
Grafik 9. GRP78 ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	- 49 -
Grafik 10. ATF6 ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	- 50 -
Grafik 11. CHOP ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	- 51 -
Grafik 12. Kaspaz-3 ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	- 53 -

RESİMLER

Resim 1. Konstriktör bant kullanılarak oluşturulan ereksiyon modeli..... - 33 -

Resim 2. Penis diseksiyonu - 34 -

Resim 3 A: Grup kontrole ait penis kesiti. Korpus spongiozum (CS), Korpus kavernozum (CC), Tunika albugineada ayrılma (ok başı) (H&E x100).

B: Grup priapizme ait penis kesiti. Tunika albugineada ayrılma (ok başı), kavernöz sinüslerde dilatasyon ve konjesyon (yıldız), enflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok) (H&E x100).

C: Grup tedaviye ait penis kesiti. Tunika albugineada ayrılma (ok başı), kavernöz sinüslerde dilatasyon ve konjesyon (yıldız) (H&E x100).

D: Grup kontrole ait penis kesiti. Bağ doku-kollajen lifler (köşeli çift ayraç) ve düz kas (çentikli ok) (Masson trikrom x200).

E: Grup priapizme ait penis kesiti. Bağ doku-kollajen lifler (köşeli çift ayraç) ve düz kas (çentikli ok) (Masson trikrom x200).

F: Grup tedaviye ait penis kesiti. Bağ doku-kollajen lifler (köşeli çift ayraç) ve düz kas (çentikli ok) (Masson trikrom x200)..... - 50 -

TABLÖLAR

Tablo 1. Çalışma grupları	- 32 -
Tablo 2. Korpus Kavernozum ve Spongiozuma ait histolojik değerlendirme sonuçları	- 57 -
Tablo 3. Gruplardan elde edilen histolojik verilerin istatistiksel analizi	- 58 -
Tablo 4. Anova analizinde fark saptanan parametreler	- 59 -
Tablo 5. Anova analizinde fark saptanmayan parametreler	- 60 -

1.GİRİŞ

Priapizm cinsel istek ya da uyarıdan bağımsız olarak 4 saatten fazla süren uzamış penil ereksiyon olarak tanımlanır(1). Priapizmin, iskemik, non-iskemik ve tekrarlayan olmak üzere 3 ana tipi vardır (2).

İskemik priapizm>%95 oranıyla priapizmin en sık karşılaşılan tipidir. İskemik priapizmdeki asıl patoloji progresif olarak artan hipoksi, hiperkapni ve asidoza bağlı olarak değişen korporal metabolik değişimlerdir (3). 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 (4). İskemik priapizm, penisin kompartman sendromu şeklinde düşünülebilir ve kompartman sendromunun kavernoza fibrozis ve kalıcı erektil disfonksiyon gibi geri dönüşsüz sonuçlarını önlemek için acil tıbbi müdahale gerekir (5). Hematolojik diskreziler, iskemik priapizm için başlıca risk faktörüdür. İyatrojenik olarak intrakavernoza enjeksiyonlar, oral fosfodiesteraz tip 5 (PDE 5) inhibitörleri de priapizme neden olabilir.

Non-iskemik (arteryel, yüksek akımlı) tip, priapizmin daha az görülen tipidir ve düzensiz kavernoza kan akımı nedeniyle oluşmaktadır. Bu tip kavernoza arter veya dallarından birinin korpus kavernoza içine rüptürü sonucu meydana gelmektedir (6). Ardından sinüzoidal dokunun arteryel ve lakünolar boşlukları arasında yüksek akışlı bir fistül oluşturur (7). Bu türbülanslı kan akışı endotelial nitrik oksit sentezinin uyarılmasına neden olan bir mekanizma yoluyla kalıcı bir ereksiyona neden olur (8).

Tekrarlayan priapizm sıklıkla idiyopatik olan nadir görülen bir durumdur. Çocuklarda sıklıkla hematolojik hastalıklar ile ilişkili iken, erişkinlerde ise genellikle idiyopattır (9).

Priapizmin sonlanması ile iskemi reperfüzyon (IR) hasarı meydana gelmektedir (10). Reperfüzyon iskemik dokunun korunması için gerekli olmasına rağmen, reperfüzyonun kendisi IR hasarını meydana getiren patofizyolojik süreci başlatmaktadır. Oksidatif stres hücre membranında tahribat oluşturup kalıcı hücre hasarına yol açarak dokularda yıkıcı etkilere neden olur.

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), antibakteriyel, antiviral, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser etkileri de dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip olan propolisin en kapsamlı araştırılan aktif bileşenlerinden biridir (11). Kafeik asit fenetil ester (CAPE), bal arısı propolis ekstraktının aktif bir bileşenidir ve uzun yıllardır geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. Antiinflamatuvar, antimitotik, antiviral, immünomodülatör ve antioksidan özelliklere sahiptir (12).

İskemi/reperfüzyon hasarı, doku hasarına neden olan toksik metabolitleri azaltan antioksidanlar tarafından önlenabilir veya azaltılabilir (13). Antioksidan bileşikler, elektronları radikallere bağlanabilir ve onları daha kararlı bileşiklere indirgeyebilir. Bu nedenle bir bileşiğin indirgeme kapasitesi, onun potansiyel antioksidan aktivitesinin bir göstergesi olarak hizmet edebilir. CAPE'in antioksidan potansiyelini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (14-16). Ayrıca antioksidan aktiviteye sahip olması nedeniyle lipid peroksidasyonu hasarlarının azaltılmasında da etkin rol oynamaktadır (17).

Reperfüzyondan kaynaklanan hasar, iskemiden çok daha baskındır ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin, reperfüzyon hasarının ana nedeni olduğu düşünülmektedir (18). Bu nedenle antioksidan tedavisi İ/R hasarını etkili bir şekilde azaltmalıdır.

Biz bu çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan akut iskemik priapizm modelinde doku TOS, TAS, OSI, GSH, MPO, GRP78, ATF6, CHOP, MDA, SOD, GPx seviyelerindeki değişiklikler ve uygulanacak olan kafeik asit fenetil esterinin iskemi reperfüzyon hasarı üzerine olası koruyucu etkilerinin oksidan-antioksidan denge açısından değerlendirilmesini amaçlıyoruz.



2.GENEL BİLGİLER

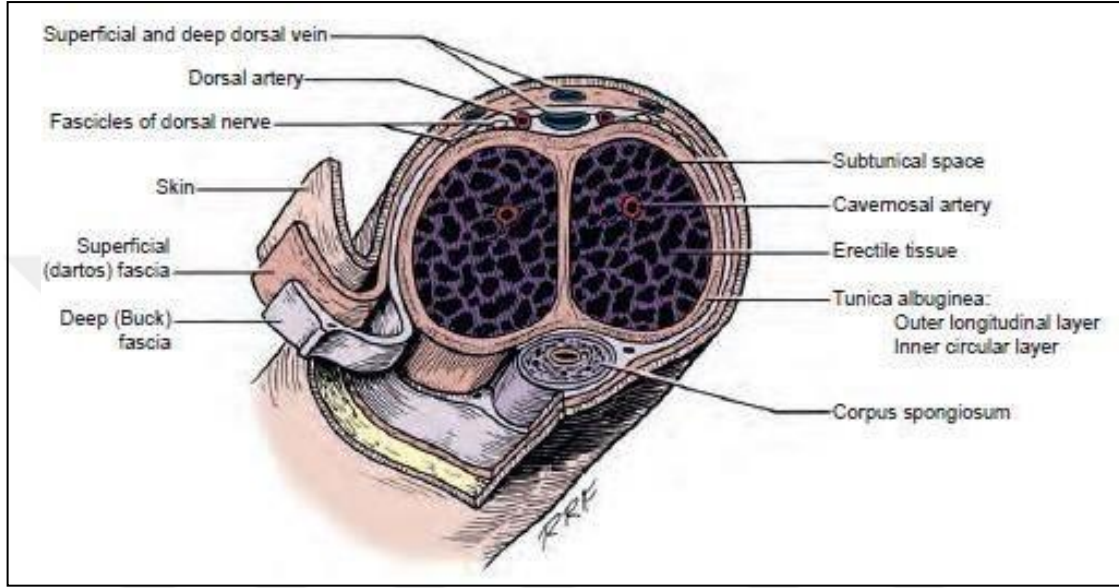
2.1 Penis Anatomisi

Penis gevşek bir deri altı tabakası ve ciltle sarılmış bir çift kavernöz cisim ve bir adet spongioz cisimden oluşur. Erkeklerde anatomik ve fizyolojik olarak genitoüriner sistemin son parçası olan kompleks bir yapıdır. Genel olarak penis boyu gevşek halde ortalama 8-10 cm, erekte halde ise 12-14 cm civarlarındadır.

Penis shaftının derisi; smegma üreten glandlar dışında glandüler yapılar ve kıl içermez ve bu bölgede yağ miktarı çok azdır. Her korpus tunica albuginea içindedir ve bu üç korpusu da dıştan saran buck fasyası mevcuttur. Buck fasyasının görevi penisin hareketli kısmını desteklemek tunica albugineayı pubik kemiğe tutturaktır. Tunica albuginea penise esneklik ve dayanıklılık sağlar. Tunica albuginea iki tabakadan oluşmaktadır. İç tabaka sirküleruzanım gösterir ve kavernöz doku barındırır. Dış tabaka ise longitudinal uzanım gösterir ve glans penisten proksimal kruraya uzanır ve inferior pubik ramusta sonlanır.

Kavernöz cisimler erektile özelliği gösterir, proksimale uzanım göstererek krus ismini alır ve pubik arka tutunur. Simfizis pubis ile kavernöz cisimler arasındaki ligamentum suspensoryum, kruslardan sonra ikinci fiksasyon noktasını oluşturur. Rektus kılıfından gelen lifler ile buck fasyası birleşerek ise ligamentum fundiforme penisi oluşturur. Buck fasyası ve tunica albuginea perinede erektile yapı kaslarının derininde birleşir.

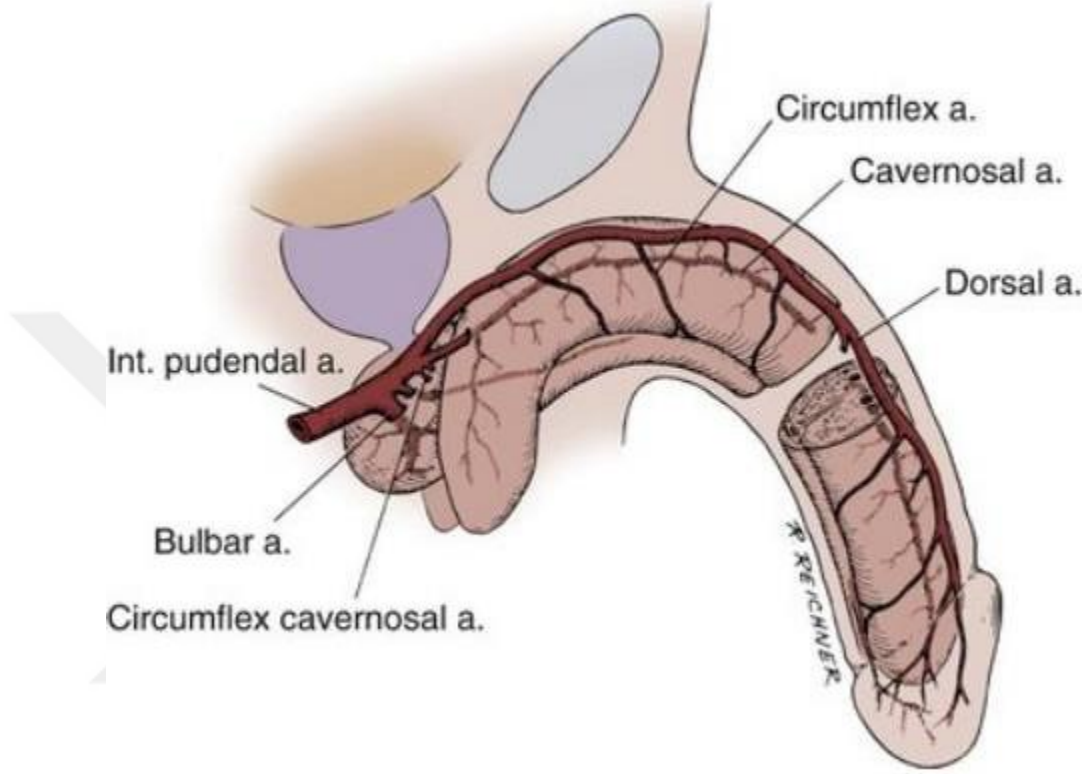
Üretra spongiöz cismin içinden geçer ve spongiöz cismin proksimal segmentine bulbus denir. Korpus spongiozum distalde genişleyerek glans penisi meydana getirir. Penis tabakaları içten dışa doğru sıralanırsa; korpus spongiozumdan, korpus kavernozum, tunika albuginea, buck fasyası, dartos tabakası ve deriden meydana gelmektedir(19–22)(Şekil 1)



Şekil 1. Penil fasyalar, korporeal yapılar, arterler, venler ve sinirlerin ortak görüldüğü penisin enine kesiti(19)

2.2 Penisin Arteryal Dolaşımı

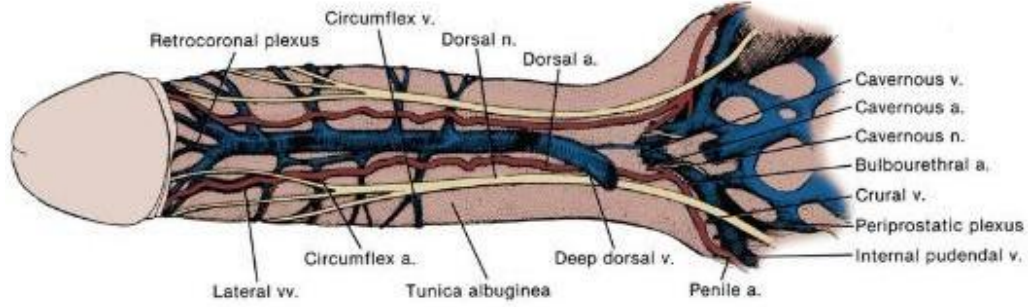
Penisin erektıl ve nutrisyonel kanlanması internal iliak arterin pudendal dalından sağlanır. Ana penil arter perineal membranın üstünde Alcock kanalında devam eder ve erektıl yapıları beslemek için üç dal halinde sonlanır. Bunlar; bulbo-üretal arterler, kavernozaı arterler, dorsal arterdir. (Şekil 2). Bulboüretal arter korpus spongiozuma posterolateral sınırının üstünden girer ve bu arter üretra, spongiozum ve glansı besler. Sonrasında kavernozaı arter dalı penil arterden ayrılır ve kavernöz cisimlerin beslenmesini sağlar. Ardından penil arter derin dorsal arter olarak glans penise kadar uzanır. Dorsal arter dorsal ven ve dorsal penil sinir arasında seyrederek ve her üç yapı da Buck fasyasının altına yapışır ve böylece nörovasküler bandı oluşturur. Dorsal arter seyri sırasında kavernozaı ve sirkumferensiyal dallar verir (19,21,22).



Şekil 2.Penisin arteryal dolaşımı(19)

2.3 Penisin Venöz Dolaşımı

Korpus kavernozumların venöz drenajı sirkumfleks venler ile derin dorsal vene olur. Derin dorsal ven ise preprostatik pleksusa drene olur. Yüzeysel dorsal ven ise eksternal pudendal vene dökülür. Yüzeysel dorsal ven Buck fasyasının dışında uzanırken, derin dorsal ven Buck fasyasının içinde uzanır (Şekil 3). Derin dorsal ve kavernozal ven ile üretral venler arasında olmak üzere tüm ven sistemi arasında anastomozlar vardır(19,23).



Şekil 3.Dorsal penil arterler, venler ve sinirler(19)

2.4 Penisin Lenfatik Drenajı

Penis cildinin köken alan lenfatikler süperfisiyal inguinal ve subinguinal lenf nodlarına drene olur. Glanstan köken alan lenfatikler ise Buck fasyasının derinliklerinde seyrederek bilateral yüzeyel ve derin inguinal lenf nodlarına drene olur. Derin inguinal lenf nodları ise hipogastrik ve ana iliak lenf nodlarına drene olur(19,24).

2.5 Penisin İnervasyonu

Penisin innervasyonu hem otonomik hem de somatik olarak sağlanır. Penisin sensöriyel inervasyonu dorsal sinirler tarafından sağlanmaktadır. Dorsal sinir dorsal arter yönünde seyreder ve glans penisi besler. Penisin somatik inervasyonu S2, S3, S4 spinal sinirlerden köken alan pudendal sinir tarafından sağlanmaktadır. Kökeni S2-S4 olan ve glans penisin parasempatik innervasyonunu oluşturan lifler nervus erigentes ile pelvik pleksusa varırlar. Bu lifler aracılığıyla da ereksiyon sağlanır. Ejekülasyon ise L1-2 spinal segmentlerden köken alan sempatik lifler aracılığıyla sağlanır(19,23,25).

2.6 Penisin Histolojisi

Penis dorsalde 2 adet bulunan korpus kavernozum ve ventralde 1 adet bulunan, içerisinden üretrayı barındıran korpus spongiozum olmak üzere 3 adet silindirik erektile dokudan oluşmaktadır. Korpus spongiozum distalde glans penisini meydana getirmektedir. Her bir korpus kavernozum kolajen, elastik lifler ve düz kas içeren dens bir kılıfla örtülüdür. Kavernöz cisimler, süngerimsi cisim ve glans penis; düz kas, intrakavernoza destek ve endotelle kaplı sinzoidlerden oluşur. Penil üretra yalancı çok katlı silindirik epitelle döşelidir. Glans penis çok katlı yassı epitel ile döşelidir. Littre bezleri mukus salgılamakta olup penil üretra boyunca yerleşim gösterir(26).

2.7 Ereksiyon Fizyolojisi

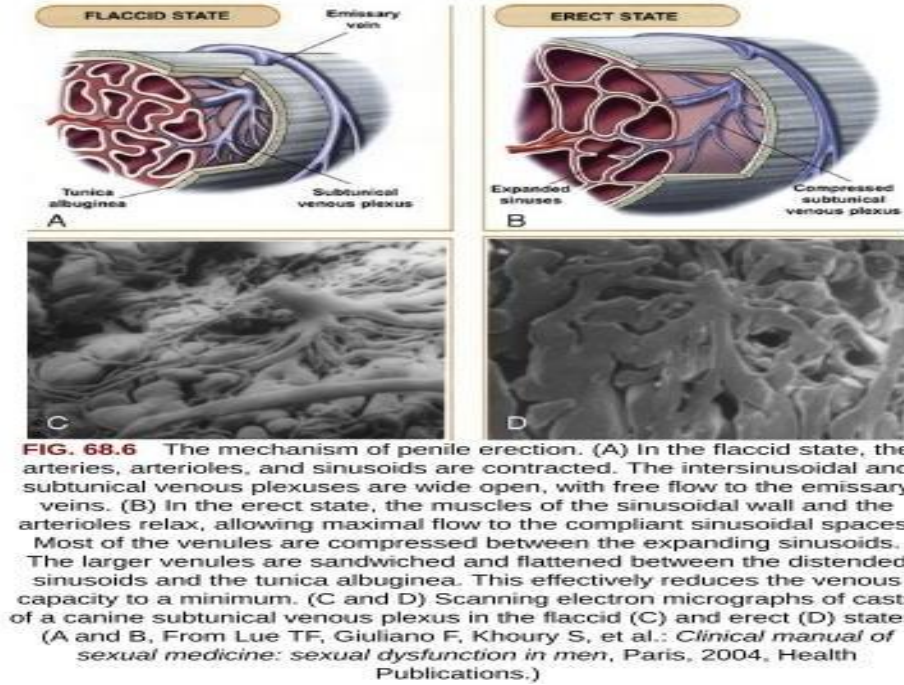
Ereksiyon için, duyuşal uyarıları aktaran santral sinir sistemine ve işleyen bir hipotalamo-hipofizer akse ihtiyaç vardır. Ayrıca aktif korpus kavernozum ve venöz drenaj sistemine sahip normal bir penis gereklidir(27). Ereksiyon fizyolojik olarak; flask, tmesans, tam ereksiyon, rijid ereksiyon, detümesans olmak üzere 5 fazda gerçekleşir.

Flask fazda, alfa-adrenerjik sistemin aktif olması nedeniyle sinüzoidler kontrakte edilir(28). Cinsel uyarı sonrası kavernöz sinirlerden düz kas gevmesini sağlayacak nörotransmitter salınmasıyla arterlerde dilatasyon, sinüzoidlerde kanın depolanması, venöz geri dönüşte azalma meydana gelir ve böylece tmesans fazı oluşur. Tunikanın gerilmesiyle, kavernöz içi basıncın artması ile penis tam ereksiyon fazına geçer (şekil 4). İskiyokavernz kasların kasılması ile kavernöz basınç daha da artar ve rijid ereksiyon fazı gerçekleşir(29). Detmesansta, kavernöz düz kasın kasılması, arteriyel akımda azalma, venöz geri dönüşün başlamasıyla penil ereksiyon sonlanır ve sonrasında flask dönem başlar(30).

S2, S3, S4 spinal sinirlerden köken alan parasempatik sinirler sempatik sinirlerle pelvik pleksusta birleşirler. Parasempatik sinirler kavernoöz arterin vazodilatasyonundan sorumlu olup gelen uyarılarla ereksiyonu başlatırlar(31). Korpus kavernozum sempatik inputu T11-L2 spinal segmentlerin pregangliyonik nöronlarından alır. Detümesansta rolü vardır(31,32).

Penisin somatomotor merkezi Onuf çekirdeğidir. Bu sinirler sakral sinirler içinden pudental sinire ulaşır, bulbokavernöz ve iskiokavernöz kasları innerve eder. İskiokavernöz kaslarının kasılması rijid ereksiyon oluşumunu sağlar(32).

Ereksiyonu sağlayan ana mediatör NO 'dur(21). NO; hücre içindeki reseptörü olan soluble guanilat siklaz enzimini aktive eder ve siklik guanozin monofosfat (c GMP) üretimini artırır. Böylece kavernoza ve arteriyel düz kaslarda dilatasyon oluşur ve ereksiyon meydana gelir(33,34).



Şekil 4. Penil ereksiyonun mekanizması(35)

2.8 Priapizmin Patofizyolojisi

Priapizm tam veya parsiyel penil tmesansın 4 saatten uzun süredir devam etmesi şeklinde tanımlanabilen nadir bir patolojidir(36–38). Priapizm insidansı 1.5/ 100.000 dir(39). Büyük çoğunluğu idyopatiktir(40). Genel olarak priapizm etyoloji ve klinik seyrine göre iskemik (veno-okluzif, düşük akımlı), non-iskemik (yüksek akımlı) ve tekrarlayan (intermittan) priapizm şeklinde sınıflandırılır(39).

Tüm priapizm olgularının %95’ini iskemik priapizm oluşturmaktadır. Yıllık insidansı 100000 erkekte 0,3-1,5 arasında rapor edilmektedir(41). İskemik priapizm penisin kompartman sendromu şeklinde düşünülebilir. İskemik priapizmde venöz obstrüksiyon ve korpus kavernozum içerisinde staz meydana gelmekte ve sonuç olarak asidik, anoksik, hiperkarbik ve glukopenik bir ortam meydana gelmektedir(36,37). İskemi 4-6 saatten uzun sürerse geri dönüşümsüz korporal doku nekrozu ve fibrotik doku oluşumu izlenebilmektedir (42–44). Bundan dolayı iskemik priapizmde penil kan akımının bir an önce optimal şartlarda sağlanması, acil tedavinin ana prensibi olmalıdır. Bu amaçla uygulanacak güncel medikal ve cerrahi tedaviler yanında, priapizm patofizyolojisinde etkin olan ikincil yolaklar üzerinden yeni tedavi modelleri güncel araştırma konularıdır(45,46).

Priapizm nedeniyle değerlendirilen bir hastada korporal aspirasyon ve kan gazı analizi yol göstericidir (38). Renkli doppler ultrasonografi rutin olarak önerilmemekle birlikte hem iskemik hem de non-iskemik priapizmin ayırt edilmesinde faydalı olabilir. İskemik priapizmde korpus kavernozumda hiç veya çok az arteriyel akım izlenmektedir(47).

Vcttaki tüm düz kaslar istirahatte relaksasyon, fonksiyonel durumda kontraksiyon halinde bulunurken peniste bu durum farklıdır. Penil düz kaslar istirahat halinde kontrakte şekilde bulunurlar. Ereksiyonda, düz kaslar relaksasyona uğramaktadırlar. Pek çok

mekanizmalarla regüle edilen penil düz kas tonusunda, kontraksiyona eğilimin artması erektil disfonksiyonla, relaksasyona eğilimin artması priapizmle sonuçlanabilmektedir(48).

Kavernozal düz kaslarda relaksasyon sağlayan başlıca yollar; nitrik oksit-siklik guanozinmonofosfat (NO-cGMP) yolağı, adenosin yolağı ve hemoksijenaz 1-karbonmonoksit (HO1-CO) yolağıdır. Kontraksiyonu etkileyen olası mekanizmalar ise; fosfodiesteraz tip 5 (PDE5) enzim aktivitesi, norepinefrin (NE), endotelin-1 (ET) ve Rho-kinaz cevabıdır. Priapizm etyopatogeneğinde penis düz kas dokusunda kontraksiyonda etkin olan mekanizmalar azalmış, relaksasyonda etkin olan mekanizmalarda ise artmış bir fonksiyon beklenmektedir. (49–51).

2.9 Kavernozal Düz Kas Relaksasyonunda Artışa Yol Açan Mekanizmalar NO-CGMP Yolağı

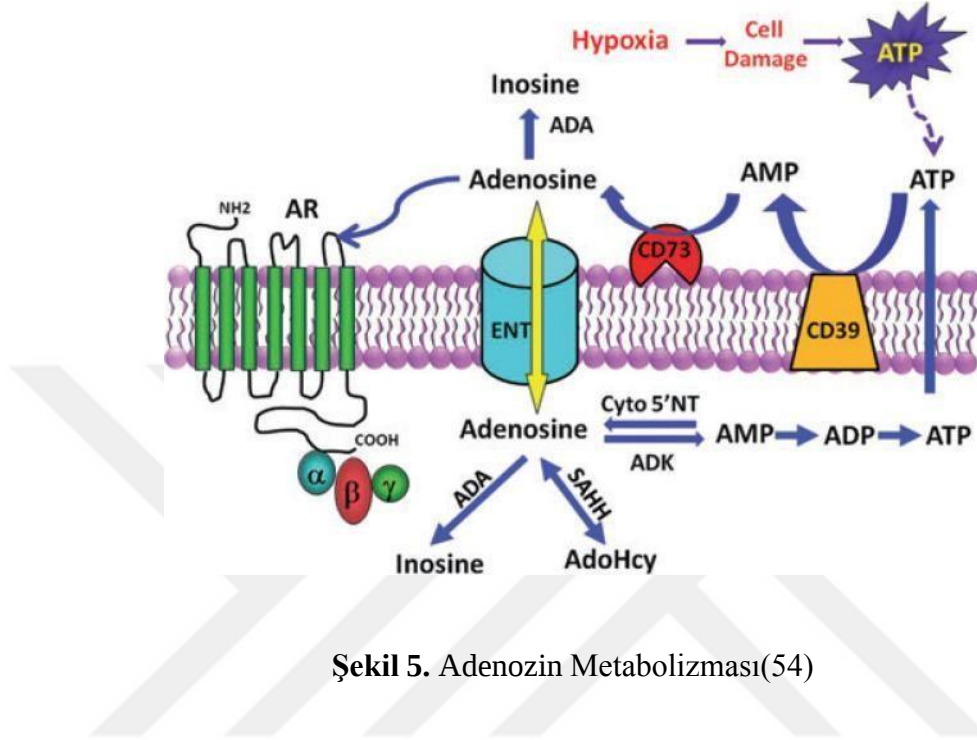
Ereksiyonda etkin olan en önemli mekanizma non-adrenerjik, non-kolinerjik NO-cGMP yolağıdır. Tümesans için asetilkolin, endotel ve sinir hücrelerinden nitrik oksit sentetaz (NOS) salınımını uyarır. NOS, nöronal nitrik oksit sentetaz (nNOS), endotelyal nitrik oksit sentetaz (eNOS) ve immün hücreler ve makrofajlardan salınan indüklenabilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) olmak üzere üç formda bulunmaktadır. Korpus kavernozumda her üç tip de mevcut olmakla birlikte, nNOS ereksiyonun başlamasından, eNOS ise sürdürülmesinden sorumludur. Sentezlenen NO, düz kas hücresi içine diffüze olarak solubl guanilat siklazı (sGC) aktive etmektedir. sGC ereksiyon sırasında NO ile cGMP arasında bağlantı görevi yaparak, guanozin trifosfattan (GTP) cGMP oluşumunu sağlamaktadır. Oluşan cGMP, spesifik protein-kinaz G ile bir kompleks oluşturarak bir taraftan endoplazmik retikuluma kalsiyum sekestre ederken, diğer taraftan voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını inhibe eder. Aynı zamanda potasyum kanallarını açarak membran hiperpolarizasyonunu sağlar. Sonuç olarak hücre içi kalsiyumun düşmesiyle miyozin hafif zincir kinaz enziminin inhibisyonu, aktin üzerindeki miyozin köprülerini ayrıştırır, düz kas gevşeyerek tümesans ortaya çıkar. Uzamış istemsiz ereksiyon olarak tanımlanan priapizm patofizyolojisinde, ereksiyondaki normal düz kas

fonksiyonunu sağlayan NO-cGMP yolağının değişen etkinliğinin rol oynayabileceği bildirilmiştir(52). Claudino ve arkadaşları orak hücresel anemili fare korpus kavernozumlarının NO-cGMP'ye duyarlılığının artmış olduğunu belirlemişlerdir. Dolayısıyla tekrarlayan priapizm ataklarında fizyolojik sınırların üzerinde artmış olası bir NO-cGMP duyarlılığı rol oynayabilecektir(53).

Adenozin Yolağı

Adenozin, ATP'den sentezlenir ve özellikle hipoksi durumunda, artan oksijen ihtiyacına karşılık vasküler dokularda kontraksiyon ya da relaksasyon yaparak etkin rol oynamaktadır. Dolayısıyla iskemik priapizmde, adenozinin de etkin olabileceği bildirilmiştir(54). Hipoksik ortamda, artan oksijen ihtiyacına bağlı olarak ekstraselüler ortamda ATP'den CD39 ve CD74 enzimleri ile adenozin ortaya çıkmaktadır. Yine hücre içinde de sitokrom 5'-nükleotidaz enzim katalizörlüğünde AMP'den adenozin sentezlenmektedir. İntraselüler ve ekstraselüler adenozin seviyesi equilibrative nükleotit transporter (ENT) ile dengelenmektedir(54)(şekil 5).

Adenozin fizyolojik etkilerini A₁, A₂, A₃ reseptörleri üzerinden yapmaktadır. A₂ reseptörü G_s proteinine bağlanarak adenilat siklazı (AC) aktive etmektedir. Sonuç olarak aktive adenilat siklaz ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü sağlayarak, A₂ reseptörü aracılığı ile düz kasta relaksasyon yapmaktadır. A₁ reseptörü G_i ve G_o, A₃ reseptörü ise G_i ve G_q proteinlerine bağlanarak, ATP'den cAMP oluşumunu aktive eden adenilat siklazı inhibe etmekte ve azalan cAMP düz kasta kontraksiyona eğilimi arttırmaktadır(55,56).



Şekil 5. Adenozin Metabolizması(54)

Priapizm patofizyolojisinde iskemiye bağlı olarak adenozin sentezinde artış ve/veya yıkımında azalmanın olası etkenlerden biri olabileceği bildirilmektedir. Wen ve arkadaşları deneysel priapizm modellerinde adenozin deaminaz (ADA) enzim defektine bağlı olarak, adenozin seviyesinde artış olduğunu ve artan adenozin seviyesine bağlı olarak, A_{2B} reseptörlerinin uyarılmasıyla priapizm ortaya çıktığını belirlemişlerdir(48,49,51–54,57).

HO-1-CO Yolağı

Heme proteini, demir ve protoporfirin-IX kompleksinden oluşan ve canlı hücrelerde çok önemli fonksiyonları olan hemoproteinlerin yapısında yer almaktadır(58). Heme proteini, endotel ve düz kasta bulunan hemoksijenaz (HO) enzimi aracılığı ile yıkılmaktadır. Hemoksijenaz enzimi HO1, HO2 ve HO3 olmak üzere 3 izoformda bulunmakla birlikte insanlardaki en önemli izoform HO1'dir. Hipoksi, stres ve reaktif oksijen ürünlerinin varlığında HO1 düzeyi artmakta ve HO1 heme proteinini yıkarak CO, Fe(II) ve biliverdinin açığa çıkmasına neden olmaktadır(59). Oluşan CO, NO benzeri bir gazotransmitter olup bazı

hücre fonksiyonları regüle etmektedir. İskemi sonucu artan HO1 aktivitesi ile ortaya çıkan CO, guanilat siklazı aktive ederek c-GMP artışına yol açıp, K kanal aktivitesini arttırarak ya da sitokrom p450 monooksijenaz yolunu inhibe ederek düz kas relaksasyonuna neden olmaktadır(58). Deneysel priapizm modellerinde artmış HO-1-CO etkinliğinin geç dönem priapizmde rol oynayabileceği bildirilmiştir(59). Jin YC ve arkadaşları özellikle ratlarda oluşturulan deneysel priapizm modellerinin 24 saatlik geç dönemlerinde kavernoza dokuda HO-1 aktivitesini kontrol grubuna göre altı kat yüksek oranlarda belirlemişlerdir(58). Artmış olan bu HO-1 aktivitesinde, kavernoza dokuda yüksek oranlarda ortaya çıkarttığı CO'nun, priapizmin geç dönemlerinde etkin olabileceğini bildirmişlerdir(58). Özellikle HO-1'in, tin-protoporfirin ve Zn-protoporfirin gibi klasik metalloporfirinlerle non-selektif olarak, imidazol-dioksolonaz gibi yeni grup kimyasal bileşiklerle selektif olarak inhibe edildiği ve bunların priapizmde koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir(58). Ünüş ve arkadaşları deneysel priapizm modellerinde, Zn-protoporfirin'in kavernoza düz kas kontraksiyonunu 20 kat arttırdığını belirlemişlerdir(60).

2.10 Kavernoza Düz Kas Kontraksiyonunda Azalmaya Yol Açan Mekanizmalar

Konvansiyonel PDE5 Yolunda Disregülasyon:

Penil düz kas relaksasyonu ve dolayısıyla ereksiyonda en etkin rol oynayan cGMP, fosfodiesteraz enzimi (PDE) tarafından hidrolize edilerek inaktif form olan GMP'ye yıkılmaktadır. Peniste etkin olan izoenzim PDE5'tir(61).

Priapizm etyopatogenezinde bu enzimin fonksiyonel regülasyon mekanizmalarındaki patolojilerin etkin olabileceği bildirilmiştir(62). Özellikle orak hücre anemili hastalarda penil NO-cGMP yolağında disregülasyon olduğu belirlenmiştir. Bazal cGMP oluşumu normal sınırlarda olmayan orak hücre anemili hastalarda, orantısız cGMP sentezine bağımlı olarak PDE5'te bir disregülasyon ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla bazal seviyenin üzerinde cGMP salınımına sebep olabilecek, noktürnal penil tımesans gibi fizyolojik süreçlerde kavernoza

dokularda disregüle halde bulunan PDE5 tam etkinlik gösterememekte ve artmış bir vazodilatasyon sonucu uzamış ereksiyon ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla çeşitli yollarla cGMP-PDE5 regülasyonunun optimum şartlarda sağlanması, özellikle orak hücre anemili hastalarda tekrarlayan priapizm ataklarını engellemede etkin olabilecektir. Bialecki ve Bridges, 50 mg sildenafilin orak hücre anemili hastalarda tekrarlayan priapizm ataklarını önlediğini bildirmişlerdir(63). 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 rapor etmişlerdir(64).

Azalmış Norepinefrin(NE) Cevabı:

Penil arteriyel ve sinüzoidal düz kaslarda kontraksiyon yaparak tūmesansı sonlandıran en önemli mediatör norepinefrindir. Penil arteriyel düz kaslarda hem alfa hem de beta adrenerjik lifler ve reseptörler bulunmakla birlikte alfa reseptörlerinin beta reseptörlerinden on kat daha yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir(65). Norepinefrin, düz kas hücre zarındaki alfa 1 ve alfa 2 reseptörlerine bağlanarak etkinlik göstermektedir. Alfa 1 reseptörlerin uyarılması ile G-proteine bağlı fosfolipaz C aktivasyonu sağlanmakta ve bu da 1, 4, 5-inositol trifosfat oluşumunu uyararak hücre içi depolardan kalsiyum iyonu salınması sonucu vazokonstriksiyona sebep olmaktadır. Ayrıca alfa 2 reseptör uyarımı adenilat siklaz enzimini inhibe ederek siklik adenozin monofosfat (cAMP) oluşumunu azaltarak penil detūmesans oluşumuna katkıda bulunmaktadır(66). Muneer ve arkadaşları özellikle penil kavernozaal düz kas hücrelerinin uzamış priapizm süresi ile orantılı olarak, NE'ye azalan oranlarda cevap verdiğini belirlemişlerdir(67).

Endotelin Etkinliği:

Endotelin, endotel hücrelerinden salgılanan vücudun en güçlü vazokonstrüktör maddedir. Artmış endotelin seviyesi, düz kas vazokonstriksiyon ve hipertrofisine ayrıca fibrozis ve inflamasyona neden olmaktadır. Endotelin ETA ve ETB olmak üzere iki farklı

reseptör üzerinden etkinlik göstermektedir. ETA reseptörleri esasen damar düz kas hücrelerinde bulunup vazokonstriksiyonu uyarmaktadırlar. ETB reseptörleri ise endotelial hücrelerde bulunur vazodilatasyona ve antiproliferatif etkilere yol açar(68,69). Normal organ sistemlerde ET1, ETA reseptörleri üzerinden vazokonstriktör etki meydana getirmektedir. Ancak hipoksi gibi patolojik durumlarda ET-1 bir savunma mekanizması rolü üstlenerek, ETB reseptörü üzerinden vazodilatasyon ortaya çıkartmaktadır. Priapizmde kavernozaal düz kaslarda oluşan iskemi neticesinde ET1'in ETB reseptörleri üzerinden düz kas relaksasyonu yapması, ereksiyonun uzamasında etkin olmaktadır(70).

2.11 İskemi ve Reperfüzyon

Hipoksi aerobik oksidatif solunumu etkileyen, son derece önemli ve genel bir hücre zedelenme ve ölüm nedenidir. Hipoksinin en önemli nedeni, arteriyel ya da venöz kan akımı bozukluğuna bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonuna yol açan iskemidir(71). Reperfüzyon, iskemiye maruz kalan doku ya da organların yeniden kanlanması ve oksijenlenmesi olayıdır. Reperfüzyon hasarı ise, iskemi periyodunu izleyen yeniden kanlanma döneminde doku ya da organlarda meydana gelen hasar olarak tanımlanır. Hücre içine moleküler oksijenin sunumuyla hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri en çok suçlanan faktör olmakla birlikte, reperfüzyon hasarından birçok mekanizma sorumlu tutulmuştur(71).

TGF-b (Transforming growth factor beta) doku onarımında hayati önem taşıyan bir sitokindir. TGF-b'nın up-regülasyonu hipoksi sırasında oksidatif strese yanıt olarak ortaya çıkmaktadır(72). Aşırı miktarda TGF-b1 iskemik priapizmde fibrozise neden olan araçlardan birisidir. TGF-b1 nötralize edici antikorlar kısa süreli priapizm durumlarında TGF-b1'in fibrotik etkilerini azaltmıştır(73).

Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin hücre membranında bulunan poliansatüre yağ asitlerini etkilemesi sonucu meydana gelen zincirleme bir reaksiyondur. Bu nedenle

oksidatif hasar lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan malondialdehitin (MDA) 4-Hidroksinonenal (4-HNE) ve hegzenal isimli aldehitlerin doku düzeylerinde artmasına neden olur(74,75).

Miyeloperoksidaz memeli nötrofillerindeki önemli antimikrobik sistem enzimlerinin başında yer almaktadır. Miyeloperoksidazın antimikrobik etkisi, hidrojen peroksit bağımlı olup, klorun ve tiyosiyanatın etkili antibakteriyel ajanlar olan hipokloröz asit ve hipotiyosiyanöz asite dönüşmesinin katalizlemesinden kaynaklanır. Miyeloperoksidazın katalitik etkisi esnasında meydana gelen reaktif maddeler normal biyomoleküller ile de tepkimeye girdiklerinden, miyeloperoksidaz enzimi çeşitli enflamatuvar hastalıklardaki hücre ve doku hasarına da neden olur(76,77).

Endoplazmik retikulum (ER), hücre dışına gönderilecek proteinlerin ve membran yapısındaki proteinlerin sentezinin ve katlanmasının gerçekleştiği mebranöz ağ yapısında bir organeldir(78). Proteinlerin her katlanma aşamasının başarılı bir şekilde tamamlanması için protein katlanmasında rol oynayan moleküller görev almaktadır. Bunlar; Grp 78, Grp 94 gibi moleküler şaperonlar, kalneksin ve kalretikulin gibi lektin benzeri proteinler ve foldazlardır(79). ER’de katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin birikmesi ve bu aşamalarda ortaya çıkan düzensizlikler hücresel cevap, ER stresi olarak tarif edilmektedir. ER fonksiyonu enfeksiyon, hipoksi, kimyasal toksinlere maruz kalma, aşırı lipid birikimi ve genetik bozukluklar sonucunda da bozularak strese neden olabilir. Vücut bu durumda stresi azaltmak için UPR (unfolded protein response) denilen katlanmamış protein yanıtı oluşturur. Bu yanıtın oluşmasının ardından protein metabolizmasında sentezin yavaşlatılması ve yıkımın artırılması suretiyle ER’nin yükünü azaltıcı yönde bir sinyal ağı oluşturulur. UPR aktive edilmiş olur. UPR’nin aktifleşmesi ile, ER membran proteinleri PERK, IRE-1 ve ATF-6 yolu ile stres cevabı oluşturulur. ER stresinin ilk yanıtı, PERK aktivasyonu yolu ile 4E-BP1 proteinini fosforile ederek global protein translasyon inhibisyonudur. Nükleusa transloke olan ATF-6 transkripsiyon faktörü, XBP-1s transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu sağlar. XBP-1s, ERSE (endoplasmic reticulum stress element) ve UPR 2 (unfolded protein response

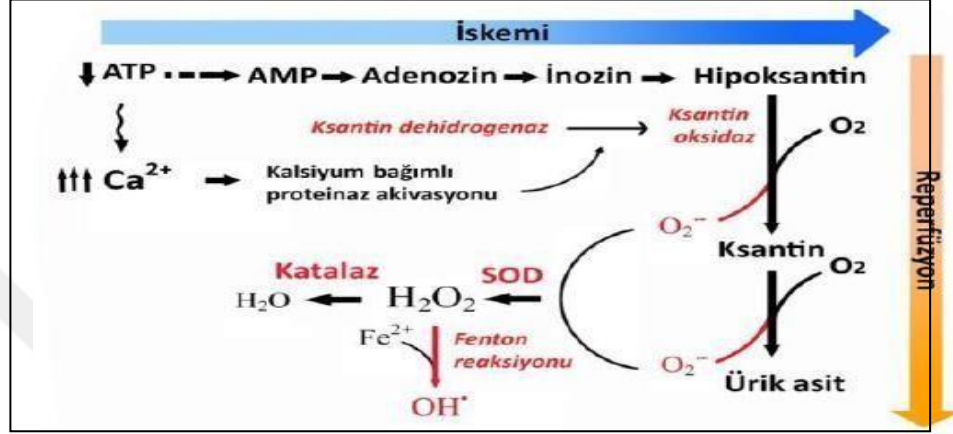
element) DNA bölgelerini içeren genlere bağlanarak ER genişlemesinde, katlama kapasitesinin artmasında ve ER ilişkili yıkım yolunun aktivasyonunda rol alan genlerin transkripsiyonunu uyarır ve ER'un üzerine binen talep yükünün karşılanmasını sağlar. Böylece ER üzerine binen yük azalır ve ER homeostazisi korunmuş olur(80,81).

2.12 Mekanizmalar

İskemik dönemde hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelir. Dokuya gelen kan akımının kesilmesi ile hücresel oksidatif fosforilasyon azalır ve ATP (adenozin 5'-trifosfat) ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır. Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan Na^+ , K^+ -ATP az pompası inhibe olur. Sonuçta hücre içinde Na^+ ve Ca^{+2} iyon konsantrasyonları artar. Hücre içinde Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun artışı hücre için sitotoksiktir. Yine bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflatuar sitokinlerin, lökosit adezyon moleküllerinin yapımında artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin aktivitesi ve ekspresyonunda azalma olur. Bu durum hücreyi reperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar(82). İskemi sırasında kalan ATP 'ler (adenozin tri fosfat) kullanımlaya devam edeceği için yıkım ürünleri olan adenozin ve AMP birikir.

İntraselüler kalsiyum artışı, kalsiyum bağımlı sitozolik proteazları aktive eder. Proteazların aktivasyonunun artmasıyla hücre içi hipoksantin dehidrogenaz enzimini ksantin oksidaza dönüştürür(83). Reperfüzyonla birlikte gelen oksijeni ksantin oksidaz; oksidan olarak kullanarak hipoksantinden ksantin, ksantinden de ürik asit metabolitlerinin oluşumunu sağlar ve bu mekanizmalar sonunda süperoksit anyonu 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 etkisine bağlı olarak artan O_2^- ve H_2O_2 , antioksidan kapasiteyi aşar ve ortamdan etkin bir şekilde 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 oluşturur(84)



Şekil 6 İskemi reperfüzyon hasarında ksantin oksidaz aracılığıyla meydana gelen reaktifoksijen türlerinin oluşumu(85).

İskemi reperfüzyon hasarı; serbest oksijen radikallerinin, komplemanların, endotel hücrelerinde salgılanan mediatörlerin ve polimorf nüveli lokostilerin (PMNL) etkisi ile oluşan kompleks hücresel olaylar zinciridir(86).

Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır(87). Reaktif oksijenler elektron almak üzere lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA ile reaksiyona girmektedirler. Bu oksidanlar fazla miktarda olduğunda membrandaki lipidlerin peroksidasyonuna yol açarak permeabilitenin bozulmasına, dolayısıyla hücre içi iyon dengesizliğine neden olmaktadır. Ayrıca, proteinlerin, DNA ve RNA gibi moleküllerin yapısını bozarak birçok hastalığın oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar (88).

Reaktif oksijen türleri, hücre zarında bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olarak asıl toksik etkilerini gösterirler(89,90). 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 nedenleri arasında yer almaktadır(91).

Normal fizyolojik koşullarda mitokondri hücre içi oluşan süperoksit anyonu (O_2^-)'nın başlıca kaynağıdır. Normalde oluşan bu süperoksitler, SOD enzimi tarafından hızlıca dismutasyona uğratılır. İskemi durumunda 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(92).

Süperoksit radikali, serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H_2O_2)'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir(93).

Polimorf Nüveli Lökositler (PNL)

Nötrofillerin, O_2^- ve H_2O_2 ürettiği ve H_2O_2 ve klorür iyonlarından hipoklorik asit oluşumunu katalizleyen myeloperoksidaz salgıladığı bilinmektedir(94). Aktive olmuş nötrofiller, endotelial bazal membran bileşenlerini ve endotelial bariyer fonksiyonunu sürdüren bileşke proteinlerini parçalayabilen güçlü proteazlar da üretir(95).

Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve mieloperoksidaz enzimlerini içerirler. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan

oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen perokside dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir(96).

Komplemanın Rolü

İskemi/reperfüzyon sonucunda birçok proinflamatuvar mediatör oluşur ve kompleman aktivasyonu yapar. C5a lökosit aktivasyonunu ve kemotaksisi uyarır. Monosit kemoatraktan protein 1, interlökin 1 (IL-1), interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör (TNF) oluşumunu sağlayarak inflamatuvar yanıtı artırır(97,98).

C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyarak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar(99,100).

Endotel Hücresinin Rolü

Oksidatif stres endotel hücrelerinin işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için hem hedef konumdadır hem de üretim merkezidir. Endotel hücreleri NO ve endotelini üretir. NO arterde vazodilatasyon, endotelin vazokonstriksiyon yapar. İ/R hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur(101).

İskemi reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri artar ve artmış olan süperoksit Nitrik oksit ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit (ONOO-) çok toksik bir serbest oksijen radikalidir ve iskemi reperfüzyon hasarını daha da artırır(102).

2.13 Antioksidanların Rolü

Vücudumuzda oksidatif stresi önleyen, enzimler ve endojen maddeler bulunur. Fakat bazen oksidanlar belirli bir düzeyin üzerine çıkar veya antioksidanlar yetersiz olup, denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmaya zarar verir. Bu nedenle vücuda dışardan koruyucu, engelleyici, iyileştirici özelliklere sahip antioksidanların alınması gerekir(103).

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidan, bu olaya da antioksidan savunma denir(104).

Antioksidanlar, oluşan serbest radikalleri toplayıp, kararlı hale getirerek, zincir kırıcı etki ile serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurarak, baskılayıcı etki ile reaksiyon hızını azaltarak, onarıcı etki ile biyolojik moleküllerdeki hasarı onararak, organizmadaki antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırarak etki gösterirler(105).

Antioksidan savunma katalaz, SOD vb. enzimler aracılığıyla olursa enzimatik antioksidan savunma; tokoferol, askorbik asit vb. maddelerle olursa nonenzimatik antioksidan savunma olarak tanımlanır(106).

2.14 Enzimler

i) Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi süperoksidin, hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücrelerde

süperoksit düzeyini düşük tutmak ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmektir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır(107).

ii) Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon, hemen hemen bütün ökaryotik hücrelerde sentezlenir. Bundan dolayı yüksek yoğunluklarda bulunur. Glutasyon bir antioksidan olarak hareket eder ve ayrıca hücrenin redoks durumunu korumada, detoksifikasyon sisteminin çalışmasında, eikosanoidlerin sentezlenmesinde, hücre sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde, gen ekspresyonunda ve apoptozisde de antioksidan olarak faaliyet gösterir. Glutasyon, glutasyon peroksidazın (GPx) katalitik etkisiyle lipid peroksitleri ve H₂O₂ 'yi detoksifiye eder ya da singlet oksijen (1 O₂) ve OH. 'yi temizler(108).

Diğer antioksidanlarla birlikte solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan GSH-Px'dır(109).

iii) Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-Transferaz (GSH) plazma membranından aminoasit transportunu sağlar, bazı önemli antioksidanları yeniden oluşturur. (108).

Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek antioksidan savunma mekanizması oluştururlar. Katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptir. Hücre içi taşıyıcı ve bağlayıcı özellik ile detoksifikasyon yapar. Karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizler(109).

iv) Katalaz

Peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Hidroksil radikali oluşumunu hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayarak engeller(106).

v) Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi detoksifiye eder. Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli devam eden normal bir reaksiyondur, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar(109).

Vitaminler

i) Vitamin C (Askorbik Asit)

Kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Suda çözünebilen zayıf asidik karakterlidir. Özellikle turuncgiller olmak üzere yeşil sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunur. İnce bağırsaklardan kolaylıkla emilir(110).

Askorbik asit, güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı iyi bir antioksidandır. Süperoksit, hidroksil, singlet oksijen, hidroperoksil, lipid peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler. Lipid moleküllerinin oksidasyonu ile oluşan lipid peroksitler; vitamin C'nin antioksidan etkisiyle sulu ortamda çözülerek oksidan etkilerini kaybederler(111).

Vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak kabul edilebilir. Ancak bu tip etkinin düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek

konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, askorbat ve geçiş metallerinin yoğunluğu, Vitamin C'nin antioksidan ve prooksidan olmasını belirleyen faktörlerdir(112).

ii) **Vitamin E (α -tokoferol)**

E vitamini lipid peroksidasyon ürünlerini tutarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını durdurarak reaktif oksijen radikallerini inaktive eder(113).

Vitamin E, okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Vitamin E ve C'nin birlikte verilmesinin, ortalama kan lipid peroksit konsantrasyonunda azalma sağladığı, Ayrıca DNA'nın oksidatif hasarından kaynaklanan karsinogenezi ve kromozomal kırıkları önlediği saptanmıştır(114).

iii) **Vitamin K**

K vitamini; ıspanak, lahana, domates, bezelye, hububat gibi bitkisel besinlerde bulunur. Vücutta kanın pıhtılaşmasında ve kemiklerde kalsiyum çökmesinde rol alır. Vitamin K'nın metabolik ürünleri de zincir kırıcı bir antioksidan etkiye sahiptirler. Bu etki homojen sıvılarda vitamin E'ye eşit, yumurta sarısı gibi veziküler ortamlarda Vitamin E'den fazladır. Vitamin K metabolitlerinden vitamin K-hidroksikinon, sürekli rejenere olabildiğinden güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir(105).

Karotenoidler

Karotenoidler; hidroksil, süperoksit ve peroksil radikalleri ile etkileşime girerek radikal süpürücüsü olarak iş görür. Yüksek konsantrasyonlarda, lipidleri peroksidasyondan korurlar. Serbest radikaller ile karotenoidler arasındaki ilişkide temel olarak üç mekanizma göze çarpar. Serbest radikallere yeni bir radikal ekleme, yapısından bir hidrojen kopararak radikali etkisiz

hale getirme ve yapısından bir elektron transfer ederek radikali yüksüzleştirme şeklindedir(115).

A vitamini normal görmede, hücre farklılaşmasında ve çoğalmasında, epitel bütünlüğün sağlanmasında, immun yanıtta, genitoüriner sistem üzerinde kritik rol oynar. Vitamin A'nın ön maddesi olan β -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır(110).

Likopen kırmızı renkte bir karotenoiddir. Yapısındaki çift bağların fazla olması nedeniyle, diğer karotenoidlere oranla daha çok singlet oksijen yakalar. Ayrıca hidrojen peroksit ve nitrojen dioksiti de inaktive etme yeteneği vardır. Diğer karotenoidler gibi tiyil ve sülfonil radikallerini de tutar. Nitrojen dioksitin neden olduğu membran hasarı ve hücre ölümüne karşı lenfositleri korur. Likopenin antioksidan özellikleri yanında hücreler arası iletişimdeki rolüyle de hücreleri kansere karşı korur(110).

Melatonin

Pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Normal genç erişkinlerde gündüze göre, gece 3-10 kat daha yüksek bulunur(116). Direkt antioksidan etki ile $HO\cdot$, H_2O_2 , $HOCl$, $NO\cdot$, $ONOO\cdot$ gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir(117).

Tiyol Bileşikleri

Glutasyon karaciğerde sentezlenebilen bir tripeptittir. Okside olmuş hali glutasyon disülfittir (GSSG). Hücrede; sitozol, çekirdek ve mitokondride bulunur. Organizmada hücre

içinde depolanır ve GSH/GSSG oranı hücredeki oksidatif stress miktarını yansıtır(106). Dokularda açığa çıkan lipid peroksitler, hidrojen peroksit, askorbik asit, serbest radikalleri indirger(118). Eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir. Transplantasyon amacıyla organların korunmasında ve siklofosfamid gibi sitotoksik ilaçların organ hasarı oluşturmalarını engeller. Ayrıca kistik fibrosis gibi hastalıklarda aktive fagositlerden kaynaklanan ROS' ların yaptıkları akciğer hasarını da azaltır(109).

Sistein GSH sentezinde önemli rol oynar. GSH sentezi için hız belirleyici bir enzimi onarır. Sistein, protein sentezi için kritik bir substrat, GSH ve taurin sentezi için hız belirleyici bir belirteçtir; aynı zamanda, hücre dışı indirgeyici ajan olarak önemli rol oynar(119).

N-asetilsistein, sisteninin GSH'ye çevrilmesinde bir ara üründür. Endojen olarak yapılabilen ve besinlerde bulunan NAC, serbest radikalleri temizleyebilen sülfidril gruplarına sahiptir. Ayrıca, hücresel redükte GSH konsantrasyonunu artırarak doğal antioksidan savunmayı güçlendirir(120).

Metionin, önemli bir metil vericisi olup, proteinlerin sentezi için gereklidir. Vücuttaki sülfürün temel kaynaklarından biri olup, hayvanlar tarafından sentezlenemeyip besinlerle yeterli miktarlarda alınabilir. Metionin, toksik olan asetaldehidin düzeyini düşürerek alkolün zararlı etkilerini azaltabilir(121).

Flavonlar

Flavonlar antioksidatif etkilerini; ksantin oksidaz, lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile şelat oluşturarak, diğer antioksidanlarla etkileşime girerek, süperoksit anyonları, lipid peroksil radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayarak gösterirler(110).

Selenyum

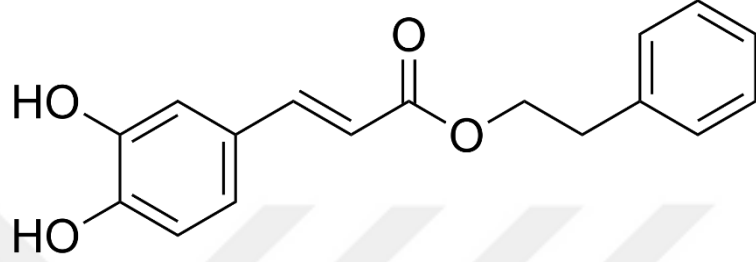
Selenyum glutatyon peroksidaz aktivitesi için gereklidir. Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksiti metabolize eder ve antioksidan savunma sisteminin temelidir(106). Normal hücrelerin malign hücrelere dönüşmesini engelleyerek antitumör etki gösterir. Glutatyon peroksidaz ve tioredoksin redüktaz enzimlerinin yapısında bulunması sebebiyle, DNA ve diğer hücresel yapıları oksidatif hasara karşı koruma görevi görür. Selenyumun, karsinogenezisin, başlama ve ilerleme safhalarını inhibe ettiğini ve hedef hücrelerde proliferasyon hızını düşürdüğünü gösteren bulgular vardır(122).

2.15 Kafeik Asit Fenetil Esteri (CAPE)

Fenolik asitler, fenoller olarak da bilinen organik bileşiklerin bir alt grubunu oluşturan kimyasal bileşiklerdir. Bu asitler, fenol halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip olan karboksil asitleridir. Fenoller, genellikle bitkilerde bulunan ve antioksidan özelliklere sahip olan bir grup bileşiktir.(123).

Kafeik asit, bitkilerde bulunan bir fenolik asit türüdür. Kahve çekirdekleri, çay yaprakları, meyveler ve bazı bitkiler kafeik asit içerir. Fenolik asitler genellikle antioksidan özelliklere sahip olup, serbest radikallerle savaşarak hücre hasarını azaltabilirler. Propolis, içeriğinde bir dizi biyolojik olarak aktif bileşen içerir. Yapılan çalışmalara göre, kafeik asit gibi fenolik asitler, propolis içerisinde bulunabilir. Bu fenolik asitler propolisin antioksidan, antimikrobiyal ve anti-enflamatuvar özelliklerine katkıda bulunabilir (124). Fenolik maddeler, lipid peroksi (ROO) ve alkoksi (RO) radikalini parçalayıp lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktadır (125,126). Fenolik asitlerin serbest radikaller ile redoks döngüsüne katılıp hidrojen alıcısı olarak görev yapabildikleri ve metal iyonlarının, güçlü metal şelatörleri olmaları sayesinde de antioksidan aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (127).

Bir fenolik asit olan kafeik asit fenetil esterinin bu biyolojik fonksiyonları sayesinde serbest radikallerin neden olduğu hastalıkların oluşmasını engelleyebildiği veya erteleyebilecekleri düşünölmektedir.



Şekil 7 Kafeik Asit Fenetil Esterinin Kimyasal Yapısı

Kafeik asit, doğal olarak birçok bitkide bulunan bir fenolik asittir. Fenolik asitler, bitkilerde bulunan ve antioksidan özelliklere sahip organik bileşiklerdir. Kafeik asit, kahve, sebzeler, meyveler ve bazı türlerdeki otlarda bulunabilir. Kafeik asit, kahvede (özellikle kahve çekirdeklerinde), sebzelerde (örneğin, enginar, brokoli), meyvelerde (örneğin, elma, armut) ve bazı otlarda doğal olarak bulunur. Ayrıca, propolis gibi arı ürünlerinde de kafeik asit bulunabilir(128).

CAPE, kafeik asidin bir ester türevidir. Kafeik asidin fenetil esteri, propolis içinde bulunan önemli biyoaktif bir bileşen olarak bilinir. CAPE'nin antioksidan özellikleri vardır. Antioksidanlar, vücuttaki serbest radikalleri nötralize ederek hücresel hasarı azaltabilir ve genel sağlığı destekleyebilir. CAPE'nin propolis içindeki diğer bileşenlerle birlikte bakteri, mantar ve virüslere karşı potansiyel antimikrobiyal etkilere sahip olduğu düşünölmektedir. CAPE'nin anti-enflamatuar özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Bu, inflamasyonu azaltabilme ve bağışıklık sisteminin yanıtını düzenleyebilme potansiyeli anlamına gelir.

Bazı araştırmalar, CAPE'nin antitümör özelliklere sahip olabileceğini ve kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebileceğini göstermektedir. Ancak, bu konuda daha fazla çalışma ve klinik araştırmaya ihtiyaç vardır (129). Ayrıca antioksidan aktiviteye sahip olması nedeniyle lipid peroksidasyonu hasarlarının azaltılmasında da etkin rol oynamaktadır (17). Propolis, bal arıları tarafından kozalaklı ağaç ve bitkilerin tomurcuklarından ve sızıntılarından toplanan natüropatik bir formülasyondur. Arılar tarafından kovanda koruyucu bariyer olarak kullanılır.

CAPE, antibakteriyel, antiviral, antioksidan, antiinflamatuar ve anti-kanser de dahil olmak üzere çok sayıda önemli biyolojik aktiviteye sahiptir. CAPE, transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) iyi bilinen ve iyi belgelenmiş bir inhibitörünün yanı sıra apoptozun bir indükleyicisidir. (131) CAPE aracılı apoptoza, insan lösemik HL-60 hücrelerinde kaspaz-3'ün aktivasyonu, Bcl-2'nin aşağı regülasyonu ve Bax'ın yukarı regülasyonu eşlik eder. Düşük dozlarda CAPE ayrıca lipid peroksidasyonunu baskılar ve antioksidan aktivite gösterir.

Jing Wu ve arkadaşları (2011) kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) antikanser aktivitesi üzerine çalışmışlar ve CAPE'nin çeşitli konsantrasyonlarının tümör ve normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişler. Tümör hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. CAPE tümör hücreleri üzerinde hem bir uyarıcı hem de hücre ölümünü gerçekleştiren bir biyomoleküldür. Aynı zamanda iyi bir serbest radikal uzaklaştırıcı olmasıyla vitaminlere katkı olması ve ilave besinler ile alınması kanser riskini azaltmak açısından önem taşımaktadır(130).

Propolis ekstraktının aktif bir bileşeni olan kafeik asit fenetil ester, mikromolar konsantrasyon aralığında 5-lipoksijenazı inhibe eder. İnhibisyon rekabetçi olmayan tiptedir, yani inhibitör enzim-substrat kompleksine bağlanır ancak serbest enzime bağlanmaz (132).

CAPE'nin I/R sonucu oluşan hasar üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalar azdır. Bu nedenle etki mekanizması araştırılmaya açık doğal bir fenolik antioksidandır (18).

3. MATERYAL VE METOD

Priapizm modelinde kafeik asit fenetil esterinin iskemi 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 olup (01.06.2022 tarihli ve 2022-20 sayılı etik kurul kararı ile) deney Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1 Çalışma Grupları

Bu deneysel çalışmada Sprague 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, 6 rattan (n=6) oluşacak şekilde 3 rat grubu şeklinde oluşturuldu (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışma grupları

Deney ve Kontrol Grupları	Grup Başına hayvan adedi
Grup 1(Kontrol Grubu)	6
Grup 2(Priapizm/Reperfüzyon)	6
Grup3(Priapizm/Reperfüzyon+CAPE)	6
Kullanılan toplam hayvan sayısı	18

Tüm cerrahi işlemlerde anestezi, 80 mg/kg Ketamin ile 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 1).



Resim 1. Konstriktör bant kullanılarak oluşturulan ereksiyon modeli

Grup 1 (Kontrol) (n:6): Kontrol grubu yalnızca penektomi (Resim 2) uygulanan ratlarda doku TOS, TAS, OSI, GSH, MPO, GRP78, ATF6, CHOP, MDA, SOD, GPx değerindeki değişiklikler ile sakrifiye edilen penis dokusunun histolojik özellikleri değerlendirildi.

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 + CAPE) (n:6): 1 saatlik priapizm oluşturulan ratlarda, reperfüzyondan yarım saat önce kafeik asit fenetil esteri, 24 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 CAPE dozu, daha önce yapılmış iskemi-reperfüzyon çalışması baz alınarak belirlenmiştir.

Tüm gruplardaki ratlara penektomi sonrası eksanguinasyon yöntemi ile ötenazi uygulandı.



Resim 2. Penis diseksiyonu

3.2 Biyokimyasal İnceleme Yöntemi

Biyokimyasal incelemeler KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı. Çıkarılan penis dokusu iki parçaya bölündü ve bir parça histopatolojik inceleme için %10'luk formaldehid içine kondu. Diğer parça biyokimyasal incelemeler için serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile yıkandıktan sonra -80 °C de saklandı.

3.3 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. Homojenat lar 4000 rpm 1800xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlarda ilgili biyokimyasal parametrelerin ölçümü gerçekleştirildi.

3.4 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.

3.5 Doku MDA Düzeylerinin Belirlenmesi

MDA ölçümü, Mihara ve Uchiyaman (133) yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirildi. Bu metodun esası, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu molekülün renginin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

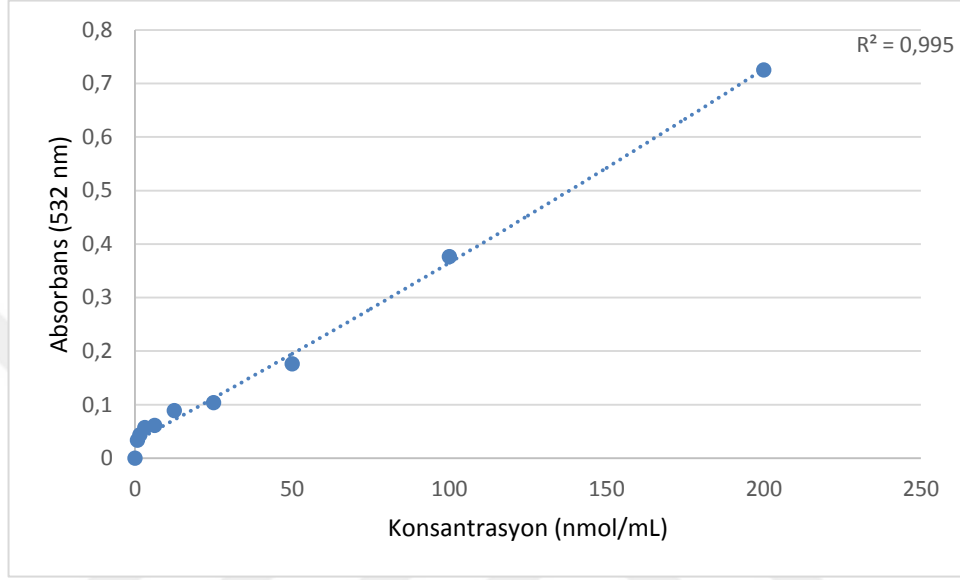
Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- 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 μ L 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 μ L homojenata 3 mL %1'lik H_3PO_4 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 μ L alınıp 96 kuyucuklu pleyte yüklenerek mikroyu 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 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.



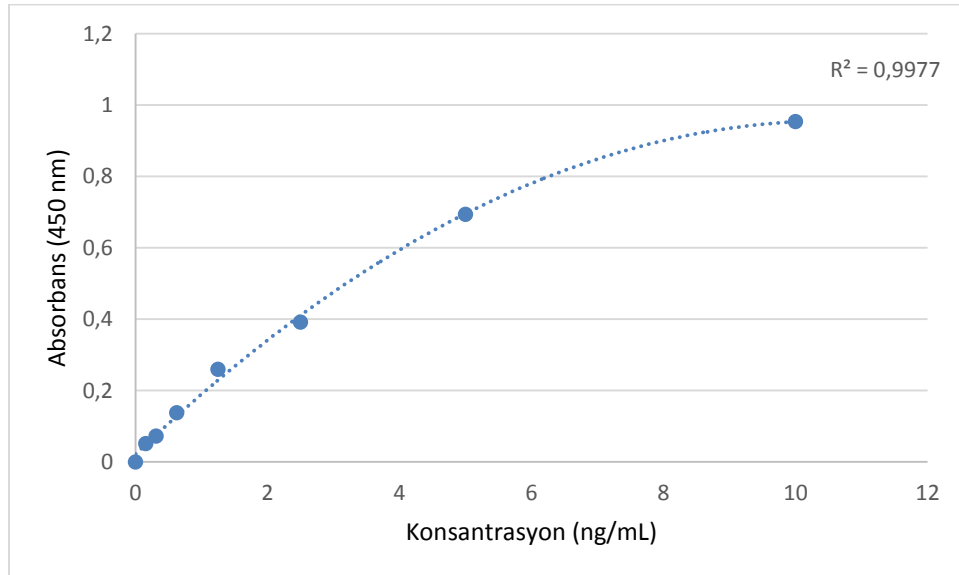
Grafik 1. Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.6 Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki SOD seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Bostonchem, Katalog No: BLS-8178Ra, Boston, MA) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- SOD standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er µL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda (ShelLab/Sheldon S14-2, Cornelius, USA) 80 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı (BioTek, Winooski, USA) kullanılarak 3 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 50 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 50 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 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.

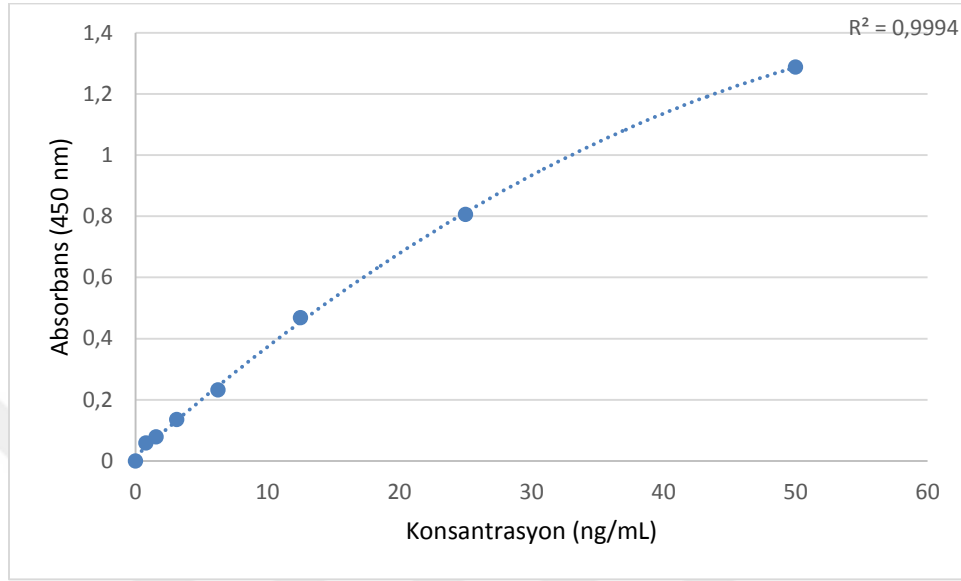


Grafik 2. SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.7 Doku Katalaz (CAT) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki CAT seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Katalog No: BLS-5986Ra, Boston, MA) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- CAT standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er μL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C 'de çalkalayıcıda 80 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 biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C 'de çalkalayıcıda 50 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 50 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 CAT standart grafiği çizildi (**Grafik 3**). Bu grafikten yararlanılarak doku CAT seviyeleri ng/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar ng/mg protein olarak verildi.



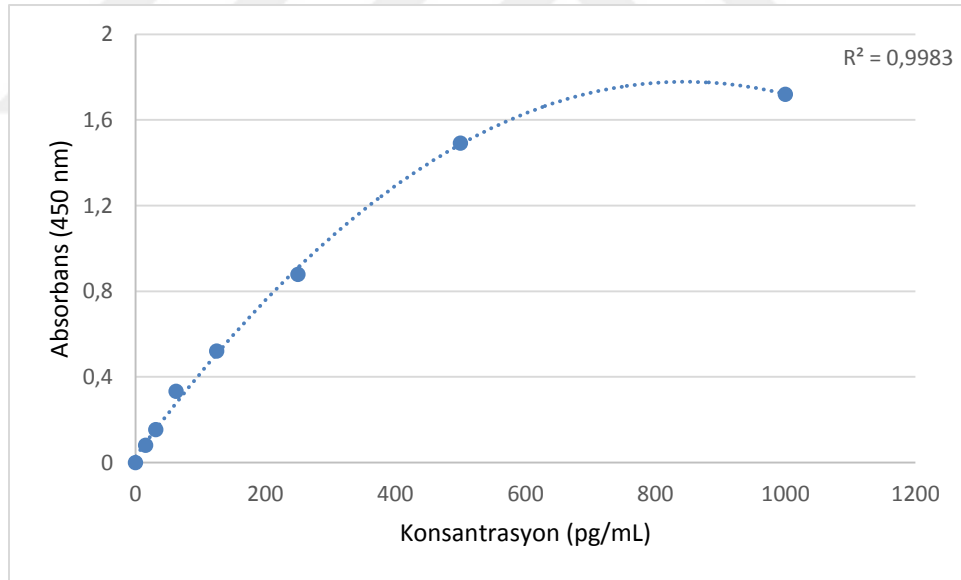
Grafik 3. CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.8 Doku Glutasyon Peroksidaz (GPx) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki GPx seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Katalog No: BLS-2222Ra, Boston, MA) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- GPx standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er µL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 80 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 biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 50 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 50 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 4**). 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.

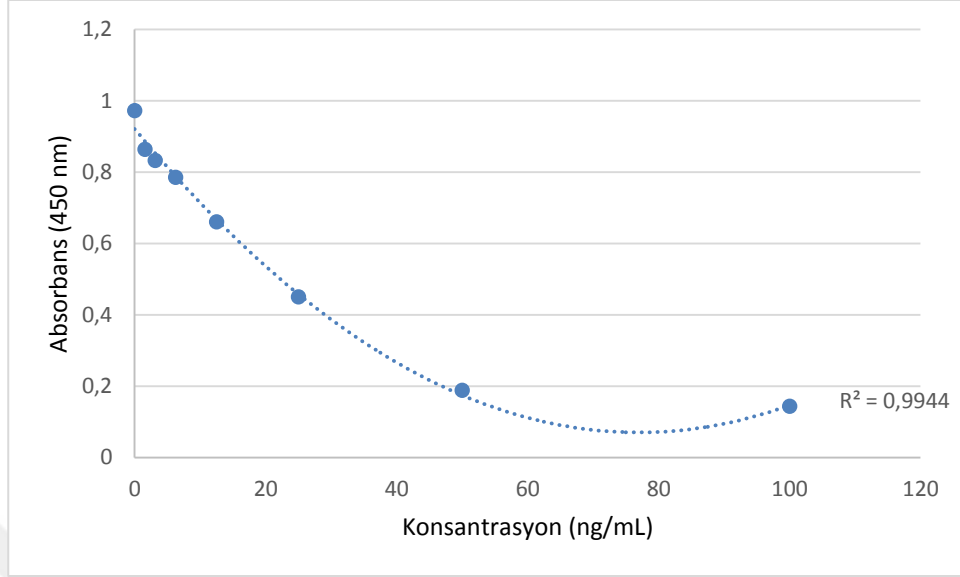


Grafik 4. GPx ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.9 Doku Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki GSH seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda yarışmalı ELISA kit (Bostonchem, Katalog No: BLS-8577Ra, Boston, MA) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- GSH standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 50'şer μ L olacak şekilde ilaveler yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 50'şer μ 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 μ L streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 60 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 μ L eklendi ve pleyt 37°C'de çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Referans dalga boyu olan 620 nm'deki ölçüm sonucunda, en düşük standardın optik yoğunluğunun 0.9-0.95'e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa 50'şer μ L renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Süre sonunda örnek ve standart absorbensları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okundu.
- Elde edilen standart absorbens sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek GSH standart grafiği çizildi (**Grafik 5**). Bu grafikten yararlanılarak doku GSH seviyeleri ng/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar ng/mg protein olarak verildi.



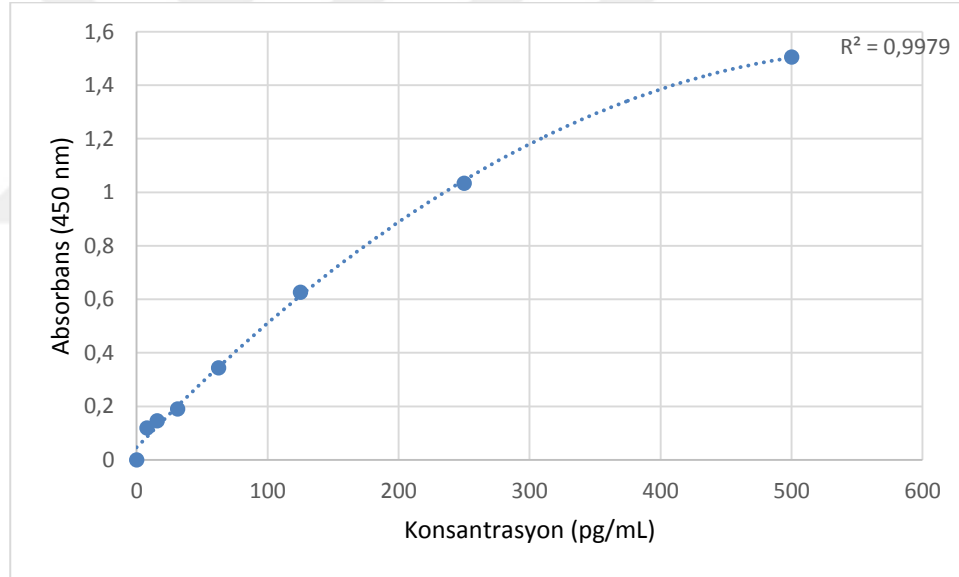
Grafik 5. GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.10 Doku İnterlökin-6 (IL-6) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki IL-6 seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Katalog No: BLS-1158Ra, Boston, MA) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- IL-6 standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er µL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 80 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 biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 50 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 50 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 IL-6 standart grafiği çizildi (**Grafik 6**). Bu grafikten yararlanılarak doku IL-6 seviyeleri pg/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar pg/mg protein olarak verildi.

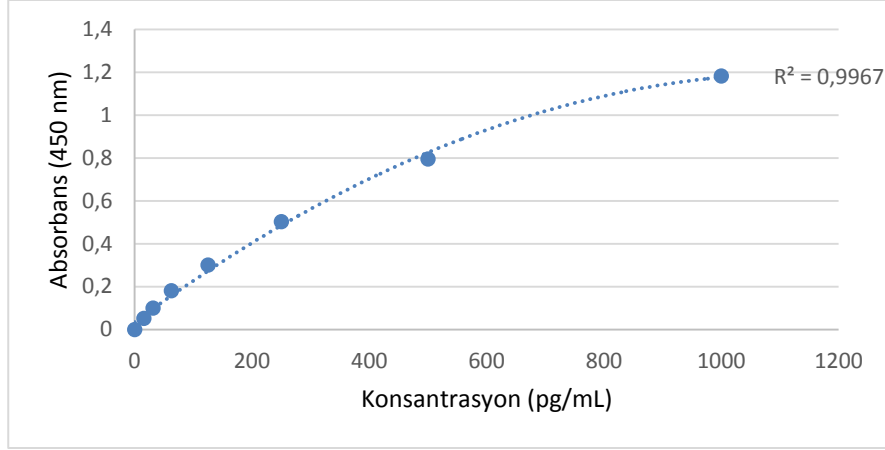


Grafik 6. IL-6 ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.11 Doku Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki TNF- α seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Katalog No: BLS-1396Ra, Boston, MA) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- TNF- α standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er μ L olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 80 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 μ L biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 50 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 μ L streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 50 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 μ L 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 μ 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 TNF- α standart grafiği çizildi (**Grafik 7**). Bu grafikten yararlanılarak doku TNF- α seviyeleri pg/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar pg/mg protein olarak verildi.



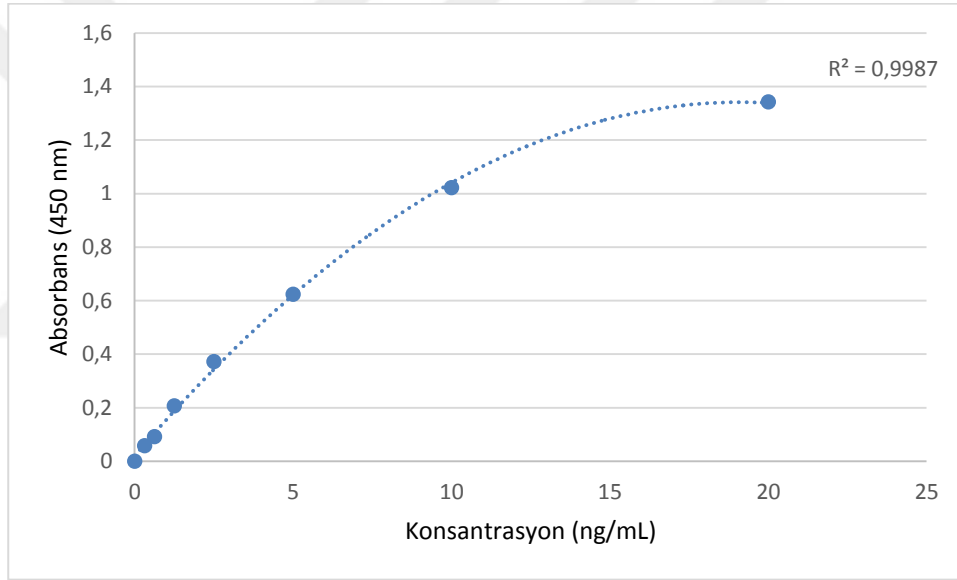
Grafik 7. TNF- α ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.12 Doku Myeloperoksidaz (MPO) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki MPO seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Katalog No: BLS-1661Ra, Boston, MA) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- MPO standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er μ L olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 80 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 μ L biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 50 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 μ L streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 50 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 μ L 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 MPO standart grafiği çizildi (**Grafik 8**). 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.



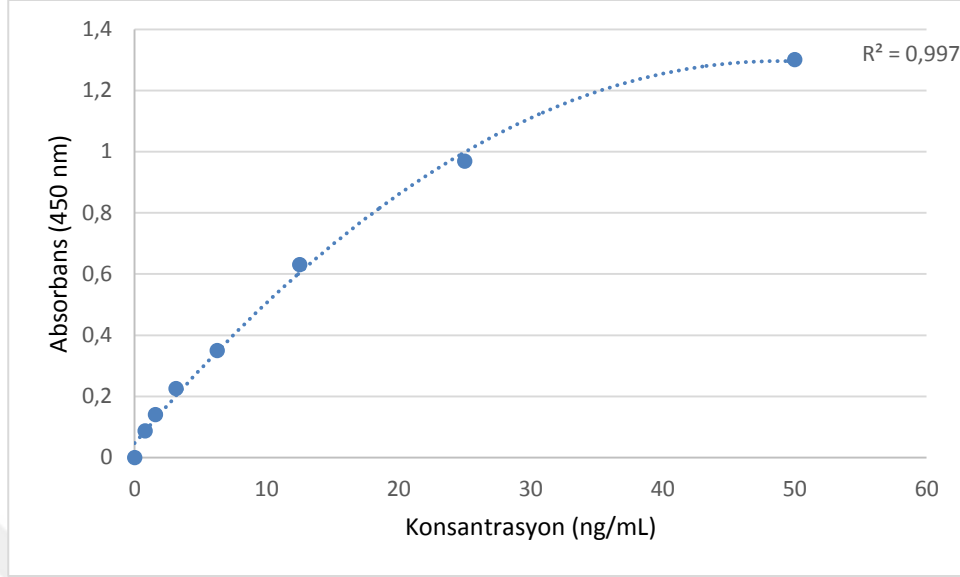
Grafik 8. MPO ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.13 Doku Glukoz ile Düzenlenen Protein 78 (GRP78) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki GRP78 seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Katalog No: BLS-6834Ra, Boston, MA) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- GRP78 standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er µL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 80 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 biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C 'de çalkalayıcıda 50 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 50 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 GRP78 standart grafiği çizildi (**Grafik 9**). Bu grafikten yararlanılarak doku GRP78 seviyeleri ng/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar ng/mg protein olarak verildi.



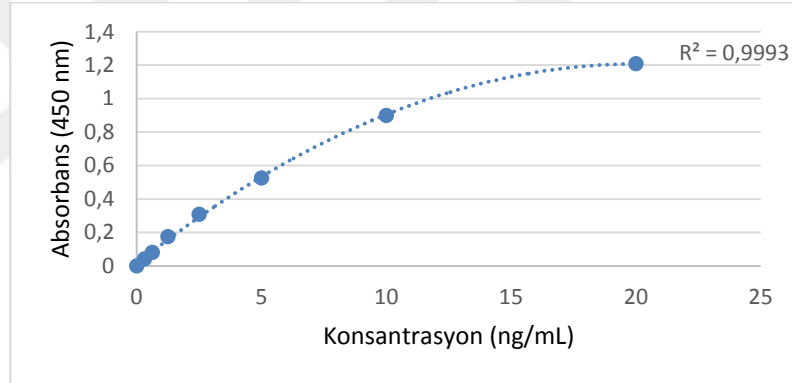
Grafik 9. GRP78 ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.14 Doku Aktifleştirici Transkripsiyon Faktör 6 (ATF6) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki ATF6 seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Katalog No: BLS-9545Ra, Boston, MA) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- ATF6 standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er µL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 80 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 biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 50 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 50 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 10**). Bu grafikten yararlanılarak doku ATF6 seviyeleri ng/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar ng/mg protein olarak verildi.



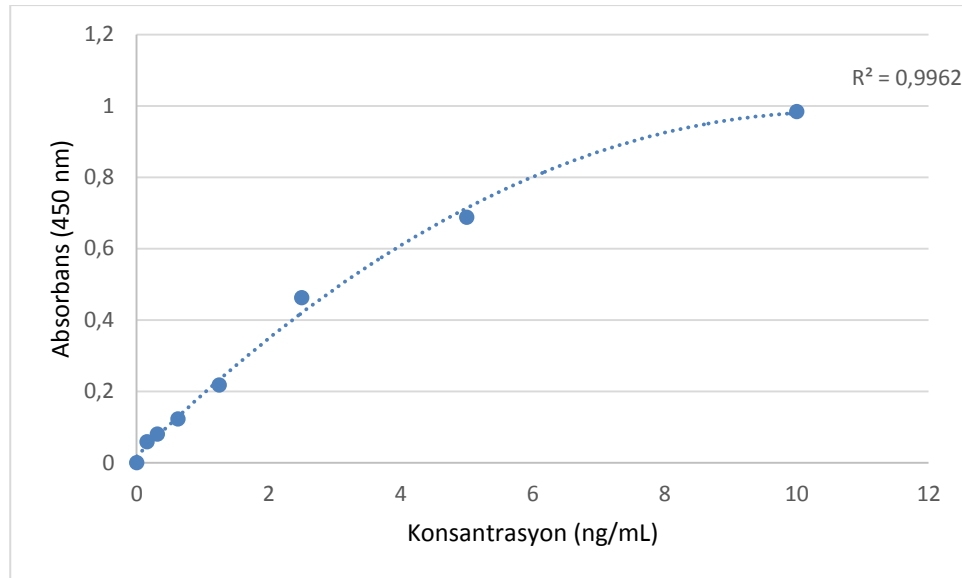
Grafik 10. ATF6 ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.15 Doku C/EBP Homolog Protein (CHOP) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki CHOP seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Katalog No: BLS-5125Ra, Boston, MA) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- CHOP standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er µL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 80 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 biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C 'de çalkalayıcıda 50 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 50 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 CHOP standart grafiği çizildi (**Grafik 11**). Bu grafikten yararlanılarak doku CHOP seviyeleri ng/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar ng/mg protein olarak verildi.

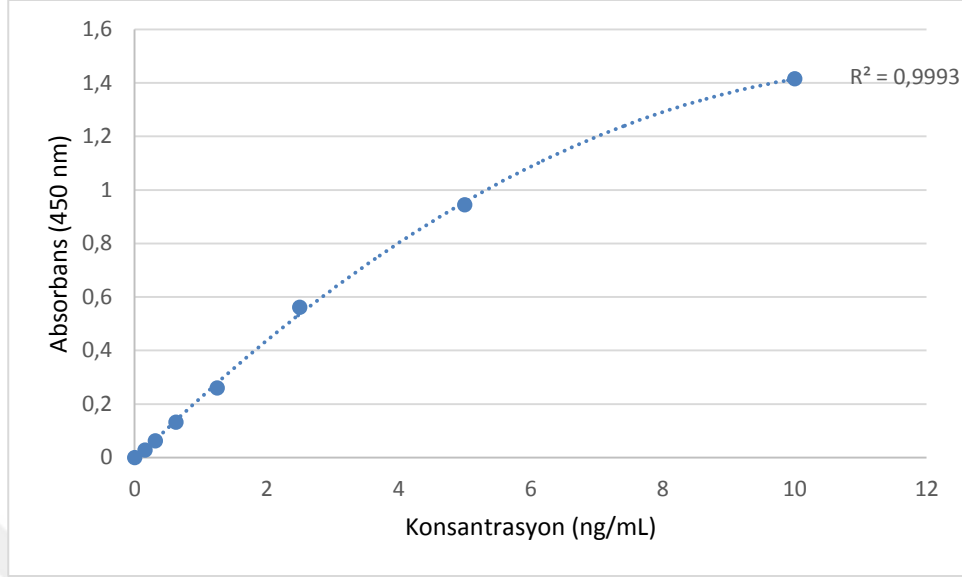


Grafik 11. CHOP ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.16 Doku Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerindeki kaspaz-3 seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Katalog No: BLS-1528Ra, Boston, MA) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- Kaspaz-3 standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı.
- Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er μL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C 'de çalkalayıcıda 80 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 biotinle işaretli antikör çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C 'de çalkalayıcıda 50 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 50 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 kaspaz-3 standart grafiği çizildi (**Grafik 12**). Bu grafikten yararlanılarak doku kaspaz-3 seviyeleri ng/mL olarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein miktarına (mg/mL) oranlandı ve sonuçlar ng/mg protein olarak verildi.



Grafik 12. Kaspaz-3 ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.17 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.

3.18 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.

3.19 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 (151).

3.20 Histopatolojik İnceleme Yöntemi

Çalışmaya ait histopatolojik incelemeler Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Çalışma sonunda; alınan penis dokuları histopatolojik değerlendirme için öncelikle tespit için cam kavanozlarda %10'luk formolin solüsyonuna konuldu. Tespit edilen dokular, daha sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve absolu alkolden geçirildi ve ksilenle şeffaflaştırıldı. Son olarak parafine gömülerek bloklandı. Elde edilen parafin bloklardan yarı otomatik mikrotom (Leica RM 2255, Tokyo, Japan) kullanılarak 4-5 µm kalınlığında seri kesitler elde edildi. Lam üzerine alınan kesitlerin bir kısmı deparafinizasyonun ardından hematoksilin-eozin (H&E) boyası bir kısmı ise Masson trikrom boyası ile boyandı. Masson trikrom boyası ile boyanan kesitlerdeki korpus kavernozumlarına ait kırmızı boyanmış düz kas ve mavi boyanmış bağ doku-kollajen liflerin yoğunluğu kalitatif olarak değerlendirildi. H&E boyalı her bir kesitte ise rastgele seçilen beş farklı alan; ışık mikroskopunda (Olympus BX51; Olympus Co., Tokyo, Japonya) histopatolojik olarak incelendi. Kavernoöz sinüslerdeki dilatasyon-konjesyon, dokudaki enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve tunika albugineadaki ayrılma-düzernsizlik gibi patolojik değişiklikler yarı kantitatif olarak (0: Hiç yok, 1: Hafif, 2: Orta, 3: Şiddetli olacak şekilde) skorlandı (135).

3.21 İstatistiksel İnceleme Yöntemi

Grupların karşılaştırılmaları normal dağılıma uyan parametrik veriler için tek yönlü ANOVA (post hoc olarak Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) ile; normal dağılıma uymayan parametrik veriler için Kruskal Wallis varyans analizi (Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) ile yapıldı. Parametrik olmayan veriler için Ki Kare testi yapıldı. Yanılma olasılığı 0.05 olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1 Histopatolojik Bulgular:

Gruplara ait penis dokusunun ışık mikroskopik değerlendirmesinde

Kontrol Grubu Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları;

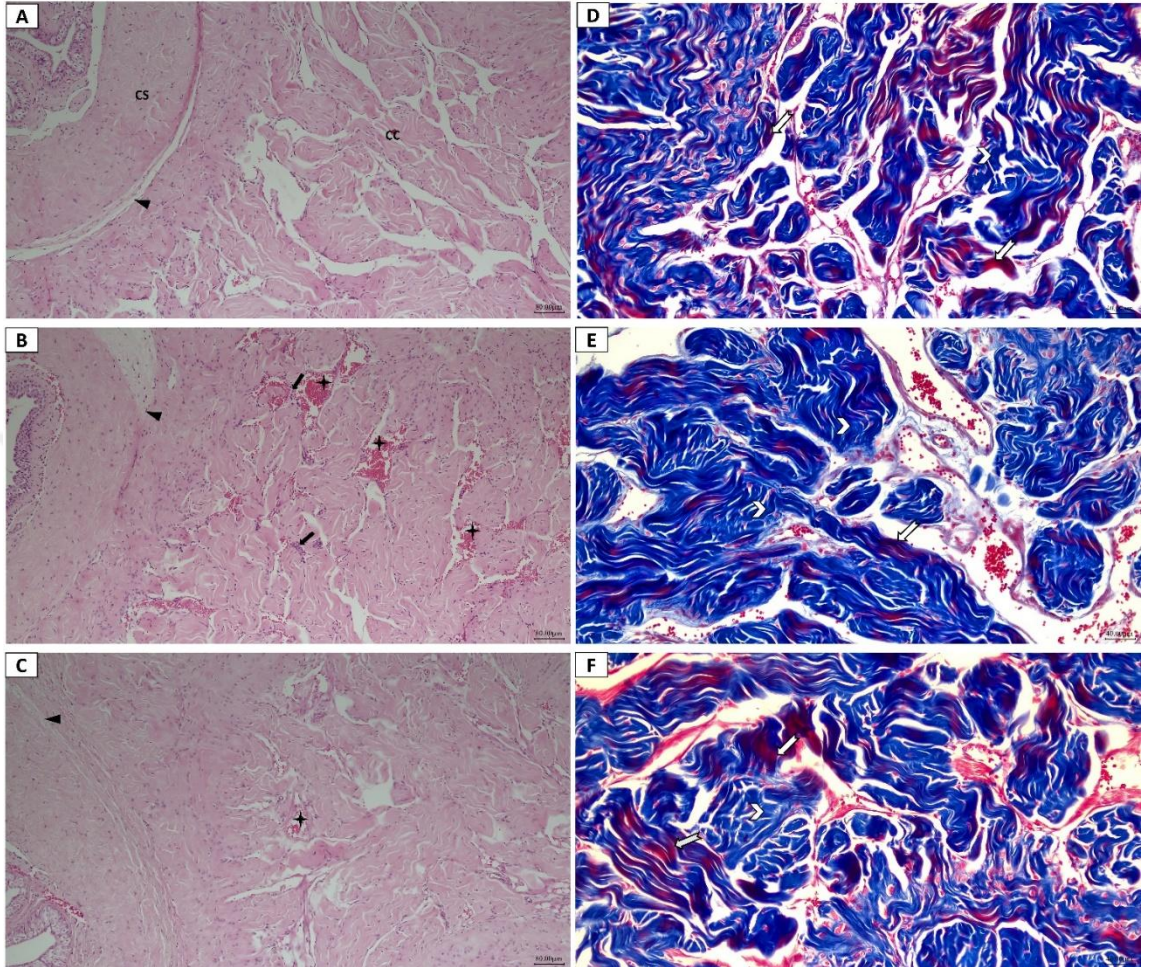
Korpus spongiozum ve korpus kavernozumlar ve kavernöz sinüsler doğal görünümdeydi. Bazı kesitlerde Tunika albugineada hafif -orta ayrılmalar mevcut olmakla birlikte penis dokularının genel yapısı normaldi. Korpus kavernozum yapısında yer alan düz kas ve kollajen liflerin de normal görünüm ve yapıda olduğu görüldü (Resim A ve D).

Priapizm/Reperfüzyon Grubu Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları;

Penise ait kavernöz sinüslerde belirgin dilatasyon-konjesyon ve korpus kavernozumlarda enflamatuvar hücre infiltrasyonu izlendi. Tunika albugineada da ayrılmalar ve yapı değişiklikleri mevcuttu. Korpus kavernozumdaki düz kas ve kollajen liflerde düzensizlik mevcut olup kollajen lif ve bağ doku yoğunluğunun kontrol grubuna göre artmış olduğu görüldü (Resim B ve E).

Priapizm/Reperfüzyon + CAPE Grubu Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları;

Kavernöz sinüslerdeki dilatasyon-konjesyon, Tunika albugineadaki ayrılma ve dokudaki enflamatuvar hücre infiltrasyonunun priapizm grubuna göre belirgin olarak azaldığı görüldü. Korpus kavernozumlardaki kollajen lif ve bağ doku yoğunluğu hasar grubuna göre azalmış olup düz kas ve kollajen lifler ise daha düzenli yapıya sahipti (Resim C ve F).



Resim 3

A: Grup kontrole ait penis kesiti. Korpus spongiosum (CS), Korpus kavernozum (CC), Tunika albugineada ayrılma (ok başı) (H&E x100).

B: Grup priapizme ait penis kesiti. Tunika albugineada ayrılma (ok başı), kavernöz sinüslerde dilatasyon ve konjesyon (yıldız), enflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok) (H&E x100).

C: Grup tedaviye ait penis kesiti. Tunika albugineada ayrılma (ok başı), kavernöz sinüslerde dilatasyon ve konjesyon (yıldız) (H&E x100).

D: Grup kontrole ait penis kesiti. Bağ doku-kollajen lifler (köşeli çift ayraç) ve düz kas (çentikli ok) (Masson trikrom x200).

E: Grup priapizme ait penis kesiti. Bağ doku-kollajen lifler (köşeli çift ayraç) ve düz kas (çentikli ok) (Masson trikrom x200).

F: Grup tedaviye 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 2’de sunulmuştur.

Tablo 2. Korpus Kavernozum ve Spongiozuma ait histolojik değerlendirme sonuçlar

GRUPLAR	KAVERNÖZ SİNÜS KONJESYONU	ENFLAMATUVAR HÜCRE İNFİLTRASYONU	TUNİKA ALBUGİNEADA AYRILMA
Kontrol 1	1	0	0
Kontrol 2	0	0	1
Kontrol 3	0	0	1
Kontrol 4	2	1	1
Kontrol 5	0	1	2
Kontrol 6	0	1	1
Priapizm/Reperfüzyon 1	2	1	2
Priapizm/Reperfüzyon 2	3	2	2
Priapizm/Reperfüzyon 3	3	1	2
Priapizm/Reperfüzyon 4	3	2	3
Priapizm/Reperfüzyon 5	3	1	2
Priapizm/Reperfüzyon 6	2	2	1
Pri/Rep+ CAPE 1	1	1	1
Pri/Rep+ CAPE 2	1	1	1
Pri/Rep+ CAPE 3	1	1	1
Pri/Rep+ CAPE 4	2	1	2
Pri/Rep+ CAPE 5	1	0	1
Pri/Rep+ CAPE 6	2	1	0

Nonparametrik veriler (Kavernözlerde vazokonjesyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, tunika albugineada ayrılma) Ki Kare testi ile incelendiğinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve konjesyon için gruplar arasında anlamlı farklılıklar izlenirken tunika albugineada ayrılma yönünden anlamlı bir farklılık oluşmamıştır. (Tablo 3.).

Tablo 3. Gruplardan elde edilen histolojik verilerin istatistiksel analizi

Gruplar	p değeri*
İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu	0,037**
Kavernöz Sinüs Konjesyonu	0,001**
Tunika Albugineada Ayrılma	p > 0,05

* Ki kare testi

** Priapizm/reperfüzyon grubu ile priapizm/reperfüzyon+ CAPE grubu arasında anlamlı fark (Mann-Whitney U testi)

4.2 Biyokimyasal Analiz Sonuçları

İnceleme sonrası gruplar arasında anlamlı fark bulunanlar; TOS, MDA, TAS, GPx, GSH, IL-6 ve MPO (Tablo 4.), anlamlı bulunmayanlar; OSI, SOD, GRP78, CHOP olduğu görüldü.(Tablo 5.)

Tablo 4. Anova analizinde fark saptanan parametreler

Parametreler	Kontrol	P/R	P/R+CAPE	P değeri
TOS(μ mol hidrojen peroksit eşdeğeri/L) α, β	17,0 $\pm$ 8,9	49,8 $\pm$ 8,9	16,0 $\pm$ 1,8	P<0,001
MDA(nmol/mg protein)	23,0 $\pm$ 25,6	64,0 $\pm$ 21,3	21,1 $\pm$ 8,6	P=0,003
TAS (mmol troluks eşdeğeri/L) α, β	0,569 $\pm$ 0,110	0,337 $\pm$ 0,147	0,657 $\pm$ 0,030	P<0,001
GPx (pg/mg protein) α	8,4 $\pm$ 2,1	5,0 $\pm$ 1,5	7,6 $\pm$ 1,4	P=0,01
GSH (μ g/mg protein)MP O (ng/mg protein)	22,0 $\pm$ 17,6	4,5 $\pm$ 3,7	25,0 $\pm$ 11,8	P=0,028
IL-6 (pg/mg)	25,4 $\pm$ 12,9	46,7 $\pm$ 12,7	11,9 $\pm$ 4,8	P=0,018
MPO (ng/mgprotein)	0,4 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,1	P=0,006

α : Kontrol-P/R grupları arasında anlamlı fark bulunanlar, β : P/R-P/R+CAPE grupları arasında anlamlı fark bulunanlar(posthoc MannWhitney U, p<0,016667)

Tablo 5. Anova analizinde fark saptanmayan parametreler

Parametreler	Kontrol	P/R	P/R+GA	P değeri
OSI	0,3±1,4	24,4±27,8	2,5±0,3	p=0,052
SOD (ng/mg protein)	1,3±1,4	0,6±0,4	1,0±0,5	p=0,466
GRP78 (ng/mg protein)	2,5±0,9	3,7±3,1	2,5±1,0	p=0,512
CHOP (ng/mg protein)	1,2±0,4	1,5±1,1	1,4±0,2	p=0,779

5.TARTIŞMA

İskemik priapizm, priapizmin en sık görülen alt tipi olup penisin kompartman sendromu şeklinde düşünülebilir. İskemik priapizmde venöz obstrüksiyon ve korpus kavernozum içerisinde staz meydana gelmekte ve sonuç olarak asidik, anoksik, hiperkarbik ve glukopenik bir ortam meydana gelmektedir(36,37). İskemi 4-6 saatten uzun sürerse geri dönüşümsüz korporal doku nekrozu ve fibrotik doku oluşumu izlenebilmektedir (42–44). İskemik priapizmde düz kas nekrozu, korporal fibrozis ve perminant erektil disfonksiyon (ED) gibi irreversibl sonuçları azaltmak için acil medikal müdahale gereklidir(136,137).

Reperfüzyon, iskemiye maruz kalan doku ya da organların yeniden kanlanması ve oksijenlenmesi olayıdır. Reperfüzyon hasarı ise, iskemi periyodunu izleyen yeniden kanlanma döneminde doku ya da organlarda meydana gelen hasar olarak tanımlanır. Hücre içine moleküler oksijenin sunumuyla hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri en çok suçlanan faktör olmakla birlikte, reperfüzyon hasarından birçok mekanizma sorumlu tutulmuştur(71). Oluşan serbest oksijen radikalleri biyolojik membranlarda ve serumda bulunan lipidler ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna yol açmakta, bu da iyon kanallarına ve DNA'ya zarar vererek hücresel ve metabolik süreçleri sekteye uğratmaktadır(138,139).

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidan, bu olaya da antioksidan savunma denir(104). Bu savunmada yer alan enzimlerden en önemlileri de SOD, katalaz ve GSHPx'dır. Ayrıca diğer savunma sistemleri olarak vitamin A, vitamin C, vitamin B9, vitamin E ve oksidasyon zincirini kıran çeşitli fitokimyasallar bulunmaktadır(140).

Fenolik bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin araştırılması özellikle son yıllarda popüler

olmuştur. 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.

Kafeik asit, doğal olarak birçok bitkide bulunan bir fenolik asittir. Fenolik asitler, bitkilerde bulunan ve antioksidan özelliklere sahip organik bileşiklerdir. Kafeik asit, kahve, sebzeler, meyveler ve bazı türlerdeki otlarda bulunabilir. Kafeik asit, kahvede (özellikle kahve çekirdeklerinde), sebzelerde (örneğin, enginar, brokoli), meyvelerde (örneğin, elma, armut) ve bazı otlarda doğal olarak bulunur. Ayrıca, propolis gibi arı ürünlerinde de kafeik asit bulunabilir(128).

CAPE, kafeik asidin bir ester türevidir. Kafeik asidin fenetil esteri, propolis içinde bulunan önemli biyoaktif bir bileşen olarak bilinir. CAPE'nin antioksidan özellikleri vardır. Antioksidanlar, vücuttaki serbest radikalleri nötralize ederek hücresel hasarı azaltabilir ve genel sağlığı destekleyebilir. CAPE'nin propolis içindeki diğer bileşenlerle birlikte bakteri, mantar ve virüslere karşı potansiyel antimikrobiyal etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. CAPE'nin anti-enflamatuar özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Bu, inflamasyonu azaltabilme ve bağışıklık sisteminin yanıtını düzenleyebilme potansiyeli anlamına gelir.

Bazı araştırmalar, CAPE'nin antitümör özelliklere sahip olabileceğini ve kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebileceğini göstermektedir. Ancak, bu konuda daha fazla çalışma ve klinik araştırmaya ihtiyaç vardır (129). Ayrıca antioksidan aktiviteye sahip olması nedeniyle lipid peroksidasyonu hasarlarının azaltılmasında da etkin rol oynamaktadır (17). Propolis, bal arıları tarafından kozalaklı ağaç ve bitkilerin tomurcuklarından ve sızıntılarından toplanan natüropatik bir formülasyondur. Arılar tarafından kovanda koruyucu bariyer olarak kullanılır.

CAPE, antibakteriyel, antiviral, antioksidan, antiinflamatuar ve anti-kanser de dahil olmak üzere çok sayıda önemli biyolojik aktiviteye sahiptir. CAPE, transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) iyi bilinen ve iyi belgelenmiş bir inhibitörünün yanı sıra apoptozun bir indükleyicisidir. (131) CAPE aracılı apoptoza, insan lösemik HL-60

hücrelerinde kaspaz-3'ün aktivasyonu, Bcl-2'nin aşağı regülasyonu ve Bax'ın yukarı regülasyonu eşlik eder. Düşük dozlarda CAPE ayrıca lipid peroksidasyonunu baskılar ve antioksidan aktivite gösterir.

Jing Wu ve arkadaşları (2011) kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) antikanser aktivitesi üzerine çalışmışlar ve CAPE'nin çeşitli konsantrasyonlarının tümör ve normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişler. Tümör hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. CAPE tümör hücreleri üzerinde hem bir uyarıcı hem de hücre ölümünü gerçekleştiren bir biyomoleküldür. Aynı zamanda iyi bir serbest radikal uzaklaştırıcı olmasıyla vitaminlere katkı olması ve ilave besinler ile alınması kanser riskini azaltmak açısından önem taşımaktadır(130).

Propolis ekstraktının aktif bir bileşeni olan kafeik asit fenetil ester, mikromolar konsantrasyon aralığında 5-lipoksijenazı inhibe eder. İnhibisyon rekabetçi olmayan tiptedir, yani inhibitör enzim-substrat kompleksine bağlanır ancak serbest enzime bağlanmaz (132).

Biz 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 biyokimyasal verileri (Doku TOS, TAS, OSI, GSH, MPO, GRP78, ATF6, CHOP, MDA, SOD, GPx) inceledik. Doku seviyelerindeki değişiklikler ve uygulanacak olan kafeik asit fenetil esterinin I/R hasarı üzerine olası koruyucu etkisinin oksidan-antioksidan denge açısından değerlendirilmesini amaçladık.

Çalışmamızdaki histopatolojik veriler değerlendirildiğinde CAPE'in priapizmde oluşan inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve konjesyonunu azalttığı izlenmiş olup tunika albugineada ayrılma üzerinde etkisi gözlenmemiştir.

Plazma antioksidan bileşenlerinin antioksidatif etkisi olduğu için, toplam antioksidan kapasite ölçümü (TAS) plazma antioksidan durumunu yansıtır. TAS vücut sıvılarındaki ve plazmadaki bütün antioksidanların etkisini yansıtırken, TOS bütün oksidanların toplam

etkisini yansıtır(145). Yaptığımız çalışmada parametrik veriler içerisinde değerlendirilen doku TAS seviyelerinde Pri/Rep grubunda kontrol grubuna göre yükselmenin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüş; Pri/Rep+CAPE grubunda ise Pri/Rep grubuna göre doku TAS düzeylerindeki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Doku TOS seviyelerinde Pri/Rep grubunda kontrol grubuna göre yükselmenin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüş; Pri/Rep+CAPE grubunda ise Pri/Rep grubuna göre doku TOS düzeylerindeki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Bu bulgular CAPE'in antioksidan özelliğini desteklemektedir.

Glutasyon peroksidaz (GPx) hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Diğer antioksidanlarla birlikte solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan GSH-Px'dır(109). Çalışmamızda GPx seviyelerinde Pri/Rep grubunda kontrol grubuna göre düşüş izlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bulgu çalışmamızın iskemi modelini desteklediğini göstermektedir.

Ozan ve ark.(152) İR modeli üzerinde yapmış oldukları çalışmada, kan ve doku MDA düzeylerini iskemi/reperfüzyon grubunda yüksek bulmuşlar. Bizim de yapmış olduğumuz çalışmamızda kan MDA düzeyleri ölçüldü. Pri/Rep grubunda ölçülen MDA düzeyi, kontrol grubuna göre artmıştı. Pri/Rep+CAPE grubunda ise kan MDA seviyesinde düşüş görülmekle beraber gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Çalışmamız 18 rat ile yapıldığından dolayı biyokimyasal ve histolojik verilerden elde ettiğimiz bulguları artırmak adına daha fazla sayıda rat ile çok merkezli deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

- Deneysel model, biyokimyasal olarak priapizm/reperfüzyon grubundaki artan doku TAS seviyelerinin CAPE verilen ratlarda azaldığını göstermiştir.
- Deneysel model, biyokimyasal olarak priapizm/reperfüzyon grubundaki artan doku TOS seviyelerinin CAPE verilen ratlarda azaldığını göstermiştir.
- Deneysel model, histolojik olarak priapizm/reperfüzyon grubundaki ratlarda izlenen inflamatuvar hücre infiltrasyonunun ve konjesyonun CAPE verilen ratlarda azaldığını göstermiştir.
- Kafeik asit fenetil esterinin, priapizm/reperfüzyon durumunda dokularda oluşabilecek biyokimyasalve histolojik hasarı engellemede etkili olabileceği görülmüştür.
- Çalışmamızda ve diğer benzeri çalışmalarda elde edilen veriler değerlendirildiğinde kafeik asit fenetil esterinin insanlarda kullanımı konusunda çalışmalara gerek duyulmaktadır.

7.KAYNAKLAR

1. Hudnall M, Reed-Maldonado AB, Lue TF. Advances in the understanding of priapism. *Transl Androl Urol*. 2017 Apr 1;6(2):199–206.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. El-Bahnasawy MS, Dawood A, Farouk A. Low-flow priapism: risk factors for erectile dysfunction. *BJU Int* [Internet]. 2002 [cited 2023 Jan 5];89(3):285–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11856112/>
6. Hatzichristou D, Salpiggidis G, Hatzimouratidis K, Apostolidis A, Tzortzis V, Bekos A, et al. Management strategy for arterial priapism: therapeutic dilemmas. *J Urol* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2023 Jan 5];168(5):2074–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12394712/>
7. 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.
8. Steers WD, Selby JB. Use of methylene blue and selective embolization of the pudendal artery for high flow priapism refractory to medical and surgical treatments. *J Urol*. 1991;146(5):1361–3.
9. Pautler SE, Brock GB. Priapism. From Priapus to the present time. *Urol Clin North Am*. 2001;28(2):391–404.

10. 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.
11. Mai F. Tolba, Hany A. Omar, Samar S. Azab, Amani E. Khalifa, Ashraf B. Abdel-Naim & Sherif Z. Abdel-Rahman (2016) Caffeic Acid Phenethyl Ester: A Review of Its Antioxidant Activity, Protective Effects against Ischemia-reperfusion Injury and Drug Adverse Reactions, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:13, 2183-2190, DOI: 10.1080/10408398.2013.
12. Huseyin Ozyurt, Birsen Ozyurt, Kenan Koca, Salih Ozgocmen, Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia–reperfusion-induced oxidative stress, *Vascular Pharmacology*, Volume 47, Issues 2–3, 2007, Pages 108-112, ISSN 1537-1891
13. Ahn, Y.H.; Seok, P.R.; Oh, S.J.; Choi, J.W.; Shin, J.-H. A Study on the Protective Effect of Antioxidants on Damage Induced by Liver Ischemia/Reperfusion in a Rat Model. *Korean J. Clin. Lab. Sci.* 2019, 51, 370–378.
14. Chen, Y.-J.; Shiao, M.-S.; Wang, S.-Y. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anti-Cancer Drugs* 2001, 12, 143–
15. Russo, A.; Longo, R.; Vanella, A. Antioxidant activity of propolis: Role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002, 73, 21–29.
16. Ahn, Y.H.; Seok, P.R.; Oh, S.J.; Choi, J.W.; Shin, J.-H. A Study on the Protective Effect of Antioxidants on Damage Induced by Liver Ischemia/Reperfusion in a Rat Model. *Korean J. Clin. Lab. Sci.* 2019, 51, 370–378.
17. Gokce A., Oktar S., Yonden Z., et al. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester on cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *Renal Failure*. 2009;31:843–847. doi: 10.3109/08860220903137517.
18. Ho, YJ., Lee, AS., Chen, WP. et al. Caffeic acid phenethyl amide ameliorates ischemia/reperfusion injury and cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 13, 98 (2014).
19. Partin AW, Dmochowski RR, R. LK, A. CP. *Campbell-Walsh-Wein Urology Elsevier Twelfth Edition*. Twelfth Ed. .

20. Graham SD, Keane TE. Glenn's urologic surgery(Penil And Scrotum's Anatomy), 8th ed. 2016.
21. Tanagho EA, McAninch JW. Smith's general urology: McGrawHill Professional.; 2008.
22. Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. Campbell-Walsh urology: expert consult premium edition: enhanced online features and print, 4-volume set: Elsevier Health Sciences; 2011.
23. 15. Mundy A, Healy J. Muscles and fasciae of the perineum: true pelvis, pelvic floor and perineum. Gray's Anatomy 39th ed London: Elsevier Churchill Livingstone. 2005:p1365-71.
24. 46. Sam D. Graham, Jr. M, Thomas E. Keane M. Anatomy of the Penis and Scrotum. In: Glenn's Urological Surgery. Lippin Cott Williams & Wilkin's; 2010. p. 465–6.
25. Halata Z, Munger BL. The neuroanatomical basis for the protopathic sensibility of the human glans penis. Brain Res. 1986 Apr 23;371(2):205–30.
26. Junqueira LC. Luis Carlos Junqueira JC. Temek Histoloji Text & Atlas. 2006: Nobel Tıp Kitabevi.446. .
27. 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.
28. Ralph DJ. Normal erectile function. Clin Cornerstone. 2005;7(1):13–7.
29. Lue TF: Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction and priapism. Campell's Urology (Patrick C.Walsh, ed.). 8th ed. Vol.2, 2002, 1589-1618.
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. Steers WD: Neuroanatomy and Neurophysiology of erection. Sexuality and disability; vol.12: No:1 1994, 17-27.
32. Akyuz M, Dincer K, Inanır M, Cakıcı A: Medulla spinalis yaralanmalı erkeklerin cinsel aktiviteleri, problemleri ve ilgileri: Fiziksel Tıp;2: 1998, 21-26.
33. 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.

34. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N. Temel Üroloji Kitabı. Üçüncü Baskı Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara. 2008:210-4.
35. Partin AW, Dmochowski RR, R. LK, A. CP. Campbell-Walsh-Wein Urology Elsevier Twelfth Edition. Twelfth Ed.
36. 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.
37. Burnett AL, Bivalacqua TJ. Priapism: new concepts in medical and surgical management. Urol Clin North Am. 2011 May;38(2):185–94.
38. 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.
39. Pryor J, Akkus E, Alter G, Jordan G, Lebreton T, Levine L, et al. Priapism. J Sex Med. 2004;1(1):116–20.
40. Roghmann F, Becker A, Sammon JD, Ouerghi M, Sun M, Sukumar S, et al. Incidence of priapism in emergency departments in the United States. J Urol. 2013 Oct;190(4):1275–80.
41. Tay YK, Spornat D, Rzetelski-West K, Appu S, Love C. Acute management of priapism in men. BJU Int. 2012 Apr;109 Suppl 3(SUPPL. 3):15–21.
42. Ralph DJ, Garaffa G, Muneer A, Freeman A, Rees R, Christopher AN, et al. The immediate insertion of a penile prosthesis for acute ischaemic priapism. Eur Urol. 2009 Dec;56(6):1033–8.
43. Muneer A, Minhas S, Freeman A, Kumar P, Ralph DJ. Investigating the effects of high-dose phenylephrine in the management of prolonged ischaemic priapism. J Sex Med. 2008;5(9):2152–9.
44. Costa WS, Felix B, Cavalcanti AG, Medeiros J, Sampaio FJ. Structural analysis of the corpora cavernosa in patients with ischaemic priapism. BJU Int. 2010 Mar;105(6):838–41.
45. 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* [Internet]. 2001 [cited 2022 Oct 2];13 Suppl 5:S39–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11781746/>.
46. Cherian J, Rao AR, Thwaini A, Kapasi F, Shergill IS, Samman R. Medical and surgical management of priapism. *Postgrad Med J*. 2006 Feb;82(964):89–94.
 47. LeRoy TJ, Broderick GA. Doppler blood flow analysis of erectile function: who, when, and how. *Urol Clin North Am*. 2011 May;38(2):147–54.
 48. Ozan T, Firdolas F, Orhan I. Priapism in Experimental Studies: Reflections on the Practice. *Türk Üroloji Semin Urol Semin*. 2011;2(10):281–7.
 49. 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.
 50. Sanli O, Armagan A, Kandirali E, Ozerman B, Ahmedov I, Solakoglu S, et al. TGF-beta1 neutralizing antibodies decrease the fibrotic effects of ischemic priapism. *Int J Impot Res*. 2004 Dec;16(6):492–7.
 51. UL-HASAN M, EL-SAKKA A, LEE C, YEN TS, DAHIYA R, LUE T. Expression of TGF-beta-1 mRNA and ultrastructural alterations in pharmacologically induced prolonged penile erection in a canine model. *J Urol*. 1998 Dec;160(6 Pt 1):2263–6.
 52. 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.
 53. Claudino MA, Franco-Penteado CF, Priviero FBM, Camargo EA, Teixeira SA, Muscará MN, et al. Upregulation of gp91phox subunit of NAD(P)H oxidase contributes to erectile dysfunction caused by long-term nitric oxide inhibition in rats: reversion by regular physical training. *Urology*. 2010 Apr;75(4):961–7.
 54. 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.
 55. 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.

56. 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.
57. Dean RC, Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am*. 2005 Nov;32(4):379–95.
58. 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;5(8):1876–82.
59. Shamloul R. The potential role of the heme oxygenase/carbon monoxide system in male sexual dysfunctions. *J Sex Med*. 2009;6(2):324–33.
60. Ünüş İ, Fırdolaş F, Özcan M, Karakeçi A, Onur R Oİ. Bosentan, Teofilin ve Vardenafil'in priapizm tedavisinde kullanımı. 9Ulusal Androloji Kongresi. :92. .
61. 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.
62. Lin CS. Phosphodiesterase type 5 regulation in the penile corpora cavernosa. *J Sex Med*. 2009;6 Suppl 3(SUPPL. 3):203–9.
63. Bialecki ES, Bridges KR. Sildenafil relieves priapism in patients with sickle cell disease [1]. *Am J Med*. 2002 Aug 15;113(3):252. .
64. Burnett AL, Bivalacqua TJ, Champion HC, Musicki B. Long-term oral phosphodiesterase 5 inhibitor therapy alleviates recurrent priapism. *Urology*. 2006 May;67(5):1043–8.
65. Lin CS, Lin G, Lue TF. Cyclic nucleotide signaling in cavernous smooth muscle. *J Sex Med*. 2005;2(4):478–91.
66. 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.
67. Muneer A, Minhas S, Freeman A, Kumar P, Ralph DJ. Investigating the effects of high-dose phenylephrine in the management of prolonged ischaemic priapism. *J Sex Med*. 2008;5(9):2152–9.

68. Raja SG, Dreyfus GD. Current status of bosentan for treatment of pulmonary hypertension. *Ann Card Anaesth*. 2008 Jan;11(1):6–14.
69. Dhillon S, Keating GM. Bosentan: a review of its use in the management of mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2009;9(5):331–50.
70. 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.
71. Damjanov I, Linder J. Cell injury and cellular adaptations. *Anderson's Pathology*. Tenth Edition. Volum 1: 357-365. .
72. Moreland RB, Gupta S, Goldstein I, Traish A. Cyclic AMP modulates TGF- β 1-induced fibrillar collagen synthesis in cultured human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Int J Impot Res*. 1998;10(3):159–63.
73. Sanli O, Armagan A, Kandirali E, Ozerman B, Ahmedov I, Solakoglu S, et al. TGF-beta1 neutralizing antibodies decrease the fibrotic effects of ischemic priapism. *Int J Impot Res*. 2004 Dec;16(6):492–7.
74. Uluocak N, Atilgan 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.
75. 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.
76. Obinger C. Chemistry and biology of human peroxidases. *Arch Biochem Biophys*. 2006 Jan 15;445(2):197–8.
77. Wang JG, Mahmud SA, Thompson JA, Geng JG, Key NS, Slungaard A. The principal eosinophil peroxidase product, HOSCN, is a uniquely potent phagocyte oxidant inducer of endothelial cell tissue factor activity: a potential mechanism for thrombosis in eosinophilic inflammatory states. *Blood* [Internet]. 2006 Jan 15 [cited 2023 Jan 5];107(2):558–65. Available from: ,
78. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*. 2006 Sep;7(9):880–5.
79. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*. 2009 Aug;14(8):996–1007.

80. Lin JH, Walter P, Yen TSB. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:399–425.
81. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest.* 2002 Nov 15;110(10):1389–98.
82. Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res.* 1997;80(1):76–81.
83. Schaffer SW, Roy RS, McMord JM. Possible role for calmodulin in calcium paradox-induced heart failure. *Eur Heart J.* 1983;4 Suppl H(SUPPL. H):81–7.
84. Valko M, Morris H, Cronin M. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005 Apr 30;12(10):1161–208.
85. 70. Ozcan O, Erdal H, Yonden Z. İskemi-reperfüzyon hasari ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakiş. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi.* 2015;6(23):27-33.
86. 63. Şener G, Bç Y. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg.* 2009;22(3):5-14.
87. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994 Sep 10;344(8924):721–4.
88. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.* 1987;107(4):526–45.
89. Lebensztejn DM, Chwiećko M, Semeniuk J, Kaczmariski M, Farbiszewski R. The role of free oxygen radicals in children with chronic viral hepatitis B. *Rocz Akad Med Bialymst* 1995; 40: 667-672.
90. Bianchi G, Marchesini G, Fabbri A, et al. Lipoperoxide plasma levels in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 784-788.
91. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000 Jul 28;109(1):33–44.
92. Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J.* 2005 Sep 1;390(Pt 2):377–94.
93. S J Davies SYR-PVIR. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney - PubMed. *Exp Nephrol.* 1995;348–54. .
94. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(4–5):404–33.

95. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol.* 1998;275(2).
96. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol.* 1993;16(4 Suppl 1):19–26.
97. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL. Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol.* 1999 Sep;36(13–14):941–8.
98. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg.* 1991;78(6):651–5.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. Davies S, Reichardt-Pascal S, Vaughan D, Russell G. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Experimental nephrology.* 1995;3(6):348-54.
103. 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 [Internet].* 2007 [cited 2023 Jan 9];39(1):44–84. Available from: .
104. Matés JM, Pérez-Gómez C, de Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999 Nov;32(8):595–603.
105. Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları. Afyonkarahisar. 2000.

106. 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* [Internet]. 2007 [cited 2023 Jan 9];39(1):44–84. Available from: .
107. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2006 Mar 10 [cited 2023 Jan 9];160(1):1–40. Available from: .
108. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2023 Jan 5];57(3):145–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12818476/>
109. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınevi, Konya,1995.
110. Cadenas E, Packer L. Handbook of antioxidants. Marcel dekker New York. 1996.
111. Krajcovicova-Kudlackova M, Dušinská M, Valachovičová M, Blažíček P, Pauková V. Products of DNA, protein and lipid oxidative damage in relation to vitamin C plasma concentration. *Physiol Res*. 2006;55(2):227–31.
112. Azqueta A, Arbillaga L, Pachón G, Cascante M, Creppy EE, Cerain AL de. A quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivative induces DNA oxidative damage not attenuated by vitamin C and E treatment. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2007 Jun 30 [cited 2023 Jan 9];168(2):95–105. Available from: .
113. Bader N, Bosy-Westphal A, Koch A, Mueller MJ. Influence of vitamin C and E supplementation on oxidative stress induced by hyperbaric oxygen in healthy men. *Ann Nutr Metab* [Internet]. 2006 May [cited 2023 Jan 9];50(3):173–6. Available from: .
114. Azzi A, Gysin R, Kempná P, Ricciarelli R, Villacorta L, Visarius T, et al. The role of α -tocopherol in preventing disease: From epidemiology to molecular events. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2003 [cited 2023 Jan 9];24(6):325–36. Available from: .
115. Larson RA. Naturally occurring antioxidants. Lewis publishers. New York. 1997.
116. Reiter RJ. Melatonin: Clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2003;17(2):273–85.
117. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov S v., Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May;1757(5–6):573–89.

118. Aydılek N, Aksakal M. Testosteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. YYÜ Vet Fak Derg. 2003;142: 22-25.
119. Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. Altern Med Rev. 2002; 7: 22-44.
120. Dekhuijzen PNR. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. 2004 Apr;23(4):629–36.
121. Amanvermez R, Tunçel ÖK, Demir Ş, Kefeli M, Bek Y, Çelik C. Protective effects of cysteine, methionine and vitamin C on the stomach in chronically alcohol treated rats. J Appl Toxicol. 2008 Jul;28(5):591–8.
122. Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. Mol Aspects Med. 2005 Aug;26(4–5):256–67.
123. Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. The American Journal of Clinical Nutrition, 81(1), 215S-217S.
124. Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chemistry, 84(3), 329-339.
125. Burak, M., Çimen, Y., 1999, Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. T Klin Tıp Bilimleri , 296-304.
126. Morton LW, Croft KD, Puddey IB, Byrne L. Phenolic acids protect low density lipoproteins from peroxynitrite-mediated modification in vitro. Redox Rep. 2000;5(2–3):124–5.
127. Marwah, R. G., Majekodunmi, O. F., Mahrooqi, R. A., Varma, G. B., Abadi H. A., Al-Burtamani S. K. S., 2007 Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman., Food Chemistry 101 465–470.
128. Shahidi, F., & Naczk, M. (1995). Food phenolics: Sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company.
129. Chen, Y. J., Shiao, M. S., & Wang, S. Y. (2007). "The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells." Anticancer Research, 27(5A), 3367-3377.

130. Wu J., Omene C., Karkoszka J., et al. (2011) Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Derived from a Honeybee Product Propolis, Exhibits a Diversity of Anti-tumor Effects in Preclinical Models of Human Breast Cancer. *Cancer Lett.* 308(1): 43-53.
131. Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Apoptosis by Inhibition of NF κ B and Activation of Fas in Human Breast Cancer MCF-7 Cells*, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 279, Issue 7, 2004, Pages 6017-6026, ISSN 0021-9258
132. Sud'ina, G.F., Mirzoeva, O.K., Pushkareva, M.A., et al. (2015) Caffeic Acid Phenethyl Ester as a Lipoxygenase Inhibitor with Antioxidant Properties. *FEBS Letters.* 509(2): 299-304. Kubo, I., Matsumoto, T., Ninomiya, M., et al. (2002) Anti-inflammatory Effects of Artepillin
133. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978;86(1):271–8.
134. 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.
135. Karagüzel E, Bayraktar C, Kutlu O, Yulug E, Mentese A, Okatan AE, et al. The possible protective effects of dipyridamole on ischemic reperfusion injury of priapism. *Int Braz J Urol.* 2016 Jan 1;42(1):146–53.
136. El-Bahnasawy MS, Dawood A, Farouk A. Low-flow priapism: risk factors for erectile dysfunction. *BJU Int.* 2002;89(3):285–90.
137. Spycher MA, Hauri D. The ultrastructure of the erectile tissue in priapism. *J Urol.* 1986;135(1):142–7.
138. 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.
139. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol.* 2001 Aug 24;426(1–2):1–10.
140. Poli G, MUD EA. Free Radicals: from Basic Science to Medicine. Vol. 21. 1993. 1993 p. .
141. The Protective Role of CAPE Pretreatment On Renal Ischemia-reperfusion Injury in

Rats - PubMed.

142. Jadon A, Bhadauria M, Shukla S. Protective effect of Terminalia belerica Roxb. and gallic acid against carbon tetrachloride induced damage in albino rats. *J Ethnopharmacol*. 2007 Jan 19;109(2):214–8.
143. Bayramoglu G, Kurt H, Bayramoglu A, Gunes HV, Degirmenci İ, Colak S. Preventive role of gallic acid on hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Cytotechnology*. 2015 Oct 24;67(5):845–9.
144. Baltalarli A, Ozcan V, Ferda B, Aybek H, Sacar M, Onem G, et al. Ascorbic acid (vitamin C) and iloprost attenuate the lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities of rats. *Ann Vasc Surg*. 2006;20(1):49–55.
145. Aslan R, Kutlu R, Civi S, Tasyurek E. The correlation of the total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and paraoxonase activity (PON1) with smoking. *Clin Biochem*. 2014;47(6):393–7.
146. Arnhold J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Mosc)*. 2004;69(1):4–9.
147. Harma M, Harma M, Kocyigit A, Erel O. Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *Mutat Res*. 2005 May 2;583(1):49–54.
148. Zhang C, Cai Y, Adachi MT, Oshiro S, Aso T, Kaufman RJ, et al. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem*. 2001 Sep 21;276(38):35867–74.
149. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF- κ B (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb 15;21(4):1239–48.
150. Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol* [Internet]. 1999 [cited 2023 Jan 11];300:156–66. Available from: .
151. Kazaz IO, Demir S, Kerimoglu G, Colak F, Alemdar NT, Akman AU, Cekuc OC, Mentese A. Effect of chrysin on endoplasmic reticulum stress in a rat model of testicular torsion. *J Invest Surg*. 2022; 35(5): 1106-1111.

152. Ozan E., Koyutürk L., Sapmaz T. Böbrek iskemi reperfüzyon hasarında antioksidan olarak prostoglandin E1 (PGE1) kullanımının incelenmesi. Fırat Tıp Dergisi. 9(3):67-71, 2004.



Bu tez çalışması,

KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimince desteklenmiştir (TTU-2022-20)

