

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RESİSTİNİN TAVŞAN KORPUS
KAVERNOZUMDAKİ ETKİSİ ÜZERİNDE
RESVERATROLÜN ROLÜ**

Türkan GÜNGÖR

FARMAKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2016970035

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RESİSTİNİN TAVŞAN KORPUS
KAVERNOZUMDAKİ ETKİSİ ÜZERİNDE
RESVERATROLÜN ROLÜ**

FARMAKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Türkan GÜNGÖR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Nergiz DURMUŞ

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2018.KB.SAG.066 sayısı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2016970035

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, Farmakoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Türkan GÜNGÖR **'Resistinin TavşanKorpusKavernozumdaki Etkisi Üzerinde Resveratrolün Rolü'** konulu Yüksek Lisans tezini 14.06.2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Nergiz DURMUŞ
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
BAŞKAN

Doç. Dr. Ozan BOZKURT

ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Doç. Dr. Gülnur SEVİN

ÜYE

(Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi)

Prof. Dr. Şule KALKAN

YEDEK ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)
Fakültesi)

Prof. Dr. C. Kemal BUHARALIOĞLU

YEDEK ÜYE

(İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Eczacılık

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
KISALTMALAR	v
ÖZET	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Ereksiyon Fizyolojisi	7
2.2. Erektile Disfonksiyon	8
2.3. Resistin.....	10
2.3.1. Resistin Biyolojisi ve Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü.....	10
2.3.2. Resistin ve Endotel Disfonksiyon İlişkisi.....	12
2.4. Resveratrol.....	18
2.4.1. Resveratrol Antioksidan Özelliği ve Endotel Fonksiyonla İlişkisi	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	23
3.1. Araştırmanın Tipi	23
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	23
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	23
3.4. Çalışma Materyali	23
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	23
3.6. Veri Toplama Araçları.....	23
3.6.1. Vücut Ağırlığı Ölçümü.....	23
3.6.2. Deney Gruplarının Hazırlanması	24
3.6.3. <i>İn Vitro</i> Organ Banyosu.....	27

3.6.4 NADP+/NADPH Ölçümü	29
3.6.5. Kullanılan Araç, Gereç ve Kimyasallar	30
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	32
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	33
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	33
3.10. Etik Kurul Onayı.....	34
4. BULGULAR	35
4.1. <i>İn Vitro</i> Organ Banyosunda Korpus kavernosumun Fonksiyonel Yanıtlarının Değerlendirilmesi	35
4.1.1. 24 Saat İnkübasyonun Doku Canlılığı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	35
4.1.2. Organ Banyosu Deney Protokolü Öncesi ve Sonrasında Doku Canlılığının ve Endotel Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi	36
4.1.3. Asetilkolin Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi	36
4.1.4. Endotelin-1 Aracılı Kasılma Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	37
4.1.5. Sodyum Nitropurisd Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi	38
4.2. NADP+/NADPH Ölçümünün Değerlendirilmesi	39
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
7. KAYNAKLAR.....	48
8. EKLER	56
8.1 EK-1 Etik Kurul Onayı.....	56
8.2 EK-2 Özgeçmiş	57

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışma Protokolünün Gruplara Göre ve n Sayılarına Göre Ayrımını Gösteren	
Tablo	27



SEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Penil Düz Kas Hücrelerinde NO/cGMP Yolağı ile Gerçekleşen Vazodilatasyon .	8
Şekil 2. Resistinin Potansiyel Etki Mekanizması	14
Şekil 3: Resistinin Endotel Üzerine Etkileri	16
Şekil 4. Sıçanlarda Fruktoz ile Oluşturulan MetS Modelinde İntrakavernöz Basınç Ölçümü ve Penil eNOS Protein Ekspresyonu	17
Şekil 5. Tavşan Penil Doku Vasküler Reaktivite Sonuçları.....	20
Şekil 6. Hiperkolesterolemik Tavşan Modelinde Penil Doku eNOS Ekspresyonları.....	21
Şekil 7. Tavşan Sakrifikasyonu.....	24
Şekil 8. Dokuların Temizlenmesi	25
Şekil 9. 24 Saatlik İnkübasyon İçin Çalışma Gruplarının Hazırlanması	26
Şekil 10. Deney Protokolünün Gruplara Göre Ayrımını Gösteren Şema.....	26
Şekil 11. <i>İn Vitro</i> Organ Banyosu Sistemi	28
Şekil 12. <i>İn Vitro</i> Organ Banyosunda Dokunun Asılması	28
Şekil 13. NADP+/NADPH Ölçümüne Dokuların Hazırlanması	30
Şekil 14. Araştırma Planı ve Takvimi	32
Şekil 15. 24 Saatlik İnkübasyonun Doku Canlılığı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	35
Şekil 16. Çalışma Protokolü Başlangıcındaki ve Bitişindeki KCl Yanıtları.....	36
Şekil 17. Ach Aracılı Gevşeme Yanıtları.....	37
Şekil 18. ET-1 Aracılı Kasılma Yanıtları	38
Şekil 19. SNP Aracılı Gevşeme Yanıtları	39
Şekil 20. NADP+/NADPH Ölçümü.....	40

KISALTMALAR

ED	Erektile disfonksiyon
KVS	Kardiyovasküler Sistem
Ach	Asetilkolin
SNP	Sodyum nitroprusid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
KCl	Potasyum klorür
Phe	Fenilefrin
MetS.....	Metabolik sendrom
ROS.....	Reaktif Oksijen Türleri
NO	Nitrik oksit
ET-1	Endotelin-1
PDE5	Fosfodiesteraz tip 5
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
nNOS.....	Nöronal nitrik oksit sentaz
eNOS.....	Endotelyal nitrik oksit sentaz
sGC	Çözülebilir guanilat siklaz
GTP	Guanozin trifosfat
K ⁺	Potasyum
PKG.....	Protein kinaz G
Ca ²⁺	Kalsiyum
MLC.....	Miyozin hafif zincir
PI3-kinaz	Fosfatidilinositol 3-kinaz
RELM.....	Resistin benzeri molekül
CAP	Siklaz ile ilişkili protein
TLR	Toll-like reseptör
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
PBMC.....	Periferel kan mononükleer hücreleri
TNF-a	Tümör nekroz faktörü-a

IL-6	İnterlökin-6
LPS.....	Lipopolisakkarit
DM2	Tip 2 Diyabetes Mellitus
mRNA.....	Mesajcı ribonükleik asit
EAT	Epikardiyal adipoz doku
MAPK.....	Mitojen aktiviteli protein kinaz
JNK	c-Jun N terminal kinaz
IRS.....	İnsülin reseptör substratı
SOCE.....	Depo ile işletilen Ca^{+2} girişi
ERK	Hücre dışı sinyalle regüle edilen kinaz
XO.....	Ksantin oksidaz
NOX	NADPH oksidaz katalitik subunit
O_2^-	Süperoksit
OH^-	Hidroksil radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	Fosfat buffer salin
Emaks	Maksimum gevşeme yanıtı

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca aldığım kararların arkasında olan, bilgi ve birikimini tüm içtenliği ile aktaran saygı duyduğum ve örnek aldığım danışman hocam Prof. Dr. Nergiz DURMUŞ'a,

Tüm tez çalışmalarımın aşamalarında her zaman bana yardımcı olan, bıkmadan tüm ayrıntıları ile anlatan çalışmaktan keyif aldığım ekip arkadaşım Uzm. Ecz. Selin ACAR'a,

Tez çalışmamda önemli katkısı olan Dr. Ahmet Salih TÜZEN'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince her türlü desteklerini esirgemeyen Dokuz Eylül Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda bulunan tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın moleküler bölümünde bana yardımcı olan ekip arkadaşım Dr. Erkan KAHRAMAN'a,

Her sorunumda bana yardım eden oda arkadaşım Oğuzhan ŞİMŞEK'e,

İşimle birlikte tez sürecimi birlikte götürmemeye sonuna kadar destek olan Gen İlaç ve Sağlık Ürünleri SMA grubu yöneticilerime,

Çalışmamın her aşamasında psikolojik destekçim Sercan KANTARCI'ya,

Her konuda bana sonsuz destek olan, sabreden ve bana inanan çok sevgili canım aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eczacı Türkan GÜNGÖR

İzmir-2019

ÖZET

Resistinin Tavşan Korpus Kavernozumdaki Etkisi Üzerinde Resveratrolün Rolü

Türkan GÜNGÖR. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı. 35340 Balçova-Izmir

Amaç

Erektile disfonksiyonun (ED) en önemli nedeni endotelial disfonksiyondur. Resveratrol penil dokuda hiperkolesterolemiye bağlı gelişen ED'ü düzeltmektedir. Kardiyovasküler sistem (KVS) hastalıklarında endotelial fonksiyonları bozduğu bilinen resistinin ED'da rolünün olup olmadığı araştırılmamıştır. Bu amaçla *in vitro* koşullarda resistinin erektile doku üzerindeki fizyopatolojik etkisinin direk ortaya konulması ve bu etkinin resveratrolle geriye döndürölüp döndürölmeceğı araştırılmıştır.

Yöntem

Projemizde 19 adet sağlıklı yeni zellanda türü 2000-3000g ağırlığında erkek tavşanlar kullanılarak *in vitro* organ banyosu yöntemi ile krebs, resistin ve resistin+resveratrol ile 24 saat inkübe edilen korpus kavernozum dokularında asetilkolin (Ach) ile endotel bağımlı gevşeme yanıtları, endotelin-1 aracılı kasılma yanıtları ve sodyum nitropurid (SNP) ile endotelden bağımsız gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. Yine bu gruplarda oksidatif strese arttığı bilinen nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz ölçümü yapılmıştır.

Bulgular

24 saat inkübasyon sonrasında ve dokuların deney protokolü sonundaki canlılıklarını göstermek amacıyla 120 mM potasyum klorür (KCl) dokulara uygulanmış, KCl'ye bağlı kasılma yanıtları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir.

Krebs grubu, resistin grubu ve resistin+resveratrol grupları için fenilefrin (Phe) kasılması sonrası Ach ve SNP oluşturulan gevşeme yanıtları ile endotelin-1 aracılı kasılma yanıtlarında gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Resistin varlığında uygulanan resveratrol sadece resistin uygulanan gruba göre NADPH oksidaz aktivitesini anlamlı olarak azaltmıştır.

Sonuç

Resistinin NADPH oksidaz aktivitesini değiştirme potansiyeli olabileceğini ve resveratrolün ED üzerinde alternatif bir tedavi hedefi olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Erektile disfonksiyon, resveratrol, resistin, korpus kavernosum, tavşan

ABSTRACT

Role of Resveratrol On The Effect of Resistin On Rabbit Corpus Cavernosum

Türkan GÜNGÖR. Dokuz Eylül University Institute of Health Sciences, Department of Pharmacology.
35340 Balçova-Izmir

Objective

The most important reason of erectile dysfunction (ED) is endothelial dysfunction (ED). Resveratrol improves the ED in the penile tissue due to hypercholesterolaemia. It has not been investigated whether the resistance of endothelial function defect in the cardiovascular system (CVS) has a role in ED. For this purpose, it was investigated that the physiopathological effect of resistin on erectile tissue was directly determined *in vitro* conditions and this effect would be reversed with resveratrol.

Method

In our project, 19 rabbits weighting 2000-3000 g were used and *in vitro* organ bath method was used to evaluate endothelium-dependent relaxation responses with acetylcholine (ACh), endothelin-1 mediated contractile responses and endothelium-free relaxation responses with sodium nitropruside (SNP) the corpus cavernosum tissues incubated with krebs, resistin and resistin +resveratrol for 24 hours. In these groups, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, which is known to increase in oxidative stress was measured.

Results

After 24 hours of incubation and in order to demonstrate the viability of the tissues at the end of the experimental protocol, 120 mM potassium chloride (KCl) was applied to the tissues and no significant difference was observed between KCl-induced contractile responses.

There was no significant difference between groups in terms of relaxation responses generated by Ach and SNP after phenylephrine (Phe) contraction and endothelin-1 mediated contraction responses for Krebs group, resistin group and resistin + resveratrol groups. Resveratrol administered in the presence of resistin significantly reduced NADPH oxidase activity compared to the group treated with resistin alone.

Conclusion

Resistin may have the potential to alter NADPH oxidase activity, and resveratrol may be an alternative treatment target for ED.

Key words: Erectile dysfunction, resveratrol, resistin, corpus cavernosum, rabbit.

1. GİRİŞ ve AMAC

İnsanlarda kan düzeyindeki resistin artışı, tip 1 ve tip 2 diyabet, koroner arter hastalığı ve aterojenik dislipidemide gösterilmiştir ve bu artış metabolik sendrom (MetS), ateroskleroz, diyabet, hipertansiyon gibi hastalıkların erken dönem bulgusu olan endotelial disfonksiyon ile ilişkilendirilmektedir. İnsanlarda yüksek resistin konsantrasyonuna eşdeğer resistin konsantrasyonunun çalışıldığı *in vitro* deneysel çalışmalarda, bu konsantrasyonun damarlarda endotel disfonksiyon oluşturduğu endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarını da bozduğu gösterilmiştir [1,2]. Bu etkilerini reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırıp endotel aracılı gevşeme yanıtına aracılık eden nitrik oksid (NO) etkinliğini azaltarak yapmaktadır [2]. Vasküler tonusta disfonksiyon oluşturma nedenlerinden bir tanesi de, vazokonstriktör bir madde olan endotelin-1 (ET-1) salınımını arttırmak olabileceği vurgulanmaktadır [3].

Vasküler bir yapı olarak kabul edilen penil doku disfonksiyonunun en başta gelen nedeni endotelial disfonksiyondur. Yapılan araştırmalarda, endotelial disfonksiyonda resistinin rolü ortaya kapsamlı bir şekilde ortaya konarken ED patofizyolojisinde rolünü vurgulayan bir çalışma yoktur. Sadece bir klinik çalışmada tip 2 diyabete eşlik eden ED'nu olan hastalarda kan resistin düzeyinde artış olduğu bildirilmektedir [4]. Bu konuda yapılan ilk deneysel çalışma laboratuvarımızda gerçekleştirilmiş olup bu çalışmada sıçanlarda metabolik sendroma bağlı olarak penil kan basıncının azaldığı, erektile yanıtların bozulduğu ve bu hayvanların penil dokularında resistin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (yayına gönderilmiştir). Ancak bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgularla erektile fonksiyonlardaki bozulmanın penil dokudaki resistin artışına bağlı olduğu sonucu direk olarak ortaya konmamıştır.

Çok yönlü farmakolojik etkileri ve çok hedefli moleküler etkileri olan resveratrol, çeşitli fizyopatolojik koşullarda NO'nun sentezinde rol oynayan enzimin inaktivasyonunu önlemek, ekspresyon ve aktivasyonunu artırmak ve NO'nun yıkımını önlemek gibi NO yolağını birçok basamakta etkilemektedir [5]. Laboratuvarımızda yapılan bir başka çalışmada, resveratrolün penil dokuda hiperkolesterolemiye bağlı gelişen endotelial disfonksiyonu NO yolağı üzerinden hem fonksiyonel hem de

hücreseel düzeyde düzelittiğı gösterilmiştir [6]. Ayrıca resveratrolün, obeziteye bağı yağ dokusunda artan resistin ekspresyonunu azalttığı bildirilmektedir [7].

Amaç

Bu bilgilerden yola çıkarak amacımız;

- a. Penil dokuda resistinin oluşturduğu hücreseel etkiler ve bunun fonksiyonel yanıtlara yansımalarını araştırmak.
- b. Resistine bağı oluşabilecek etkilerin resveratrol uygulamasıyla geriye dönüp dönmediğini değerlendirmek.

Bu nedenle;

-*In vitro* organ banyosunda vasküler reaktivite çalışmalarıyla yüksek resistin düzeyine maruz bırakılan korpus kavernosum dokusunda Ach ile indüklenen NO-bağımlı (endotel bağımlı), ET-1 aracılı kasılma yanıtı ve SNP ile indüklenen endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarına etkisini fonksiyonel olarak değerlendirilmesi,

-Penil dokuda oksidatif stres artışına bağı ROS artışından sorumlu önemli enzimlerden biri olan NADPH oksidaz düzeyinin değerlendirilmesi,

-Resveratrol varlığında bu basamaklardaki değişikliklerin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

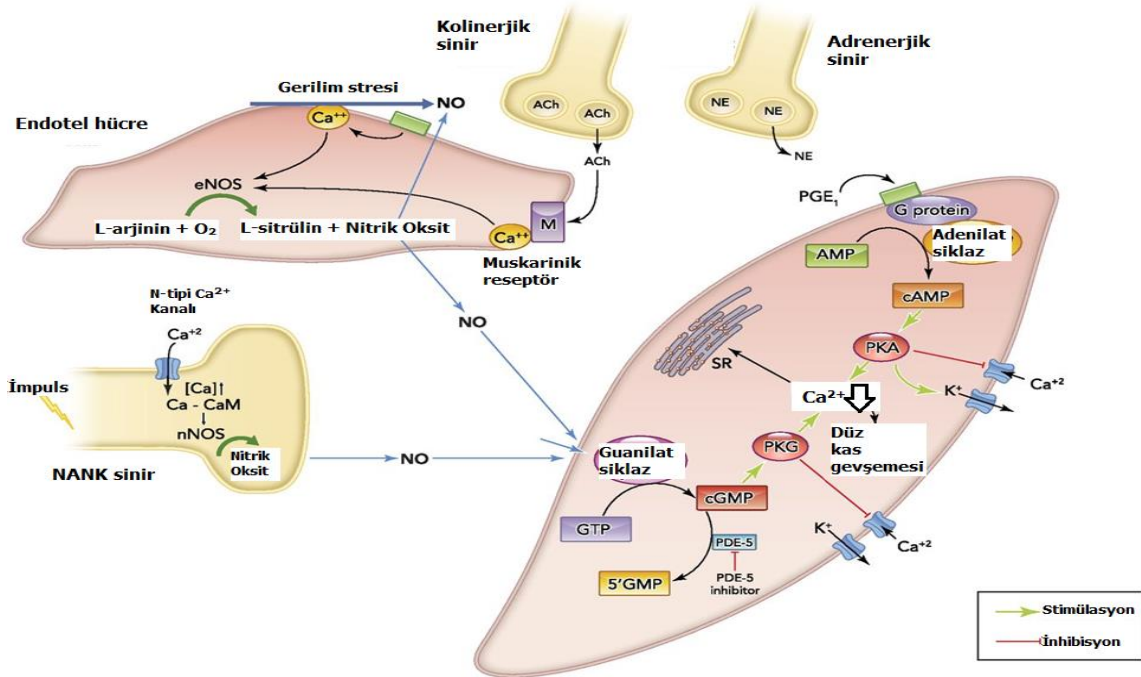
2.1. Ereksiyon Fizyolojisi

Ereksiyon, çeşitli düzeylerde nöronal ve hümorale mekanizmaların birbiriyle etkileşimine dayanmaktadır. Ereksiyon, penil afferent sinirlerin uyarımı ile başlatılır ve çeşitli uyarılar aracılığı ile refleks olarak da gerçekleşir. Uyarılara bağlı olarak parasempatik, sempatik ve somatik sinirler uyarılır, penil dokuda gevşeme meydana gelir ve ereksiyon gerçekleşir. Bu nedenle ereksiyon fizyolojisinde pek çok yolak yer almaktadır [8].

Penil ereksiyonda, vazodilatör ve vazokonstriktör tonus arasında denge bulunmaktadır ve bu faktörler arasındaki denge ve etkileşim penis düz kas tonusunda belirleyici faktördür. Penis dokusunun gevşeme yanıtı tümesansı başlatır ve kolinerjik ve nitrejik sistemler ile ilişkilidir. Kasılma yanıtı ise detümesansı başlatmaktadır ve detümesans, alfa-adrenoreseptör aktivitesi sonucu vazokonstriktör ile fosfodiesteraz-5 (PDE5) enzim aktivasyon sonucu siklik guanozin monofosfat (cGMP) seviyesinin azalması ile meydana gelmektedir. Kasılma yanıtı, alfa-adrenerjik reseptörler dışında endotelin, anjiotensin ve tromboksan A₂'nin uyarılmasıyla RhoA/Rho-kinaz yolağı aracılığı ile detümesans başlatılır. Duysal uyarının santral sinir sistemindeki yolları aktive etmesiyle tümesans başlatılmaktadır. Bu süreçler ile birlikte kolinerjik ve nonadrenerjik-nonkolinerjik periferel sinirler uyarılır. Bu sinirlerin uyarılması sonucu NO salınımı meydana gelir. NO, sinir ucundan ve endotel hücrelerinden penil ereksiyondaki yolları kontrol etmektedir ve tümesansın başlamasına aracılık eder [9].

Korpus kavernozum düz kasında NO/cGMP yolağı gevşemeye aracılık etmektedir. Tümesansın başlamasına 2 farklı şekilde sentezlenen NO aracılık eder. İlk olarak korpus kavernozumda nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) enzimi tarafından sentezlenen NO'tır [10]. İkinci olarak parasempatik sinir sistemi uyarılması sonucu Ach aracılı endotel muskarinik reseptör 3 uyarılması sonucu endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimi aktivasyonu ve NO sentezi gerçekleşir. NO kavernöz kasa diffuz olarak çözülebilir guanilat siklaz (sGC) uyarır. Bu uyarılma sonucu guanozin

trifosfattan (GTP) ikincil mesajcı olan cGMP oluşumu gerçekleşir. cGMP oluşumu ile potasyum (K^+) kanallarında membran bağlı proteinlerin fosforilasyonunu başlatan protein kinaz G (PKG) aktivasyonu gerçekleşir. Bu stimülasyonla K^+ iyonları, ekstrasellüler matrikse geçer ve hiperpolarizasyona neden olur. Böylece L-tipi kalsiyum (Ca^{2+}) kanalları kapanır ve intrasellüler Ca^{2+} iyon konsantrasyonunun azalmasına sebep olur. Bununla birlikte, miyozin hafif zincir (MLC) kinaz aktivasyonu azalır ve MLC zincirin fosforilasyonu azalır. Böylece aktin-miyozin etkileşimi azalarak vazodilatasyon gerçekleşir. Bu yolların aktivasyonu ile kan akımı artar ve gerilim stresi indüklenir ve PI3-kinaz (fosfatidilinositol3-kinaz)/Akt/eNOS yolağını aktive etmesi ile NO salınımında bir artış meydana gelir. Bu NO salınımı sonucunda fizyolojik ereksiyon gerçekleşir (Şekil 1) [11,12].



Şekil 1. Penil düz kas hücrelerinde NO/cGMP yolağı ile gerçekleşen vazodilatasyon [12]

2.2. Erektile Disfonksiyon

Ereksiyon fizyolojisinde nörolojik ve endokrin faktörlerin etkileşimi denge halindedir. Korpus kavernoza düz kas hücrelerinde vazodilatasyon (tümesans) ve/veya kontraksiyonun azalması (detümesans) ile bu denge sağlanmaktadır. Bu sistemlerin herhangi bir yerinde sorun olması durumunda ereksiyon fizyolojisi bozulur

ve erektil disfonksiyon meydana gelir. Halk arasında bu terim 'iktidarsızlık' olarak bilinmektedir fakat günümüzde bu patolojik durumun daha iyi açıklanması amacı ile 'erektil disfonksiyon (ED)' adıyla tanımlanmıştır. ADB Ulusal Sağlık Enstitüsü ED'ü bir erkeğin sürekli ya da tekrarlayan şekilde, cinsel performans için yeterli penil ereksiyona (sertleşmeye) ulaşamaması ve/veya bunu koruyamaması olarak tanımlamıştır [9].

ED'nun ortaya çıkmasında ve sürmesini sağlayan birçok faktör bulunmaktadır ve bu faktörler birbirleriyle ilişkili olabilmektedir. Buna sebep olan faktörler organik, psikojenik ve karma tip olmak üzere üçe ayrılmaktadır[13]. ED'da psikojenik ve organik nedenler birçok vakada birlikte olabilmektedir. Bu durum tanı koymada zorluk yaratmaktadır. ED organik bir sebepten ötürü meydana geliyorsa genellikle kişide performans anksiyetesine yol açarak hastalığın daha da karmaşıklaşmasına neden olmaktadır [14]. ED'nun organik nedenleri arasında diyabetes mellitus (DM), yüksek tansiyon, hiperlipidemi, metS, KVS hastalıkları, epilepsi, nörodejeneratif hastalıklar, hiperprolaktinemi, tiroid bozukluğu, hipogonadizm gibi hastalıklarının yanı sıra alkol ve madde kullanımı da sayılmaktadır [15,16]. Psikojenik nedenler arasında ise depresyon, performans anksiyetesi, ilişki problemleri, psikososyal problemler ve kişilik bozuklukları bulunmaktadır [14,17].

ED dünyada erkeklerin yaşam kalitelerini olumsuz olarak etkileyen önemli bir hastalıktır. Yapılan çalışmalara göre 40-70 yaş arası erkeklerde ED prevalansı ABD'de %52 olarak görülmüştür [18]. Türk Androloji Derneği'nin yaptığı araştırmaya göre ise Türkiye'de 40 yaş üzerinde %69.2 oranında ED görülmektedir [19]. İngiltere'de yapılan bir çalışmada ise 30-80 yaşları arasındaki erkeklerde ED yaygınlığı %19 olarak belirtilirken, yaşamın herhangi bir zamanında ED sorunuyla 1-2 kez karşılaşma oranı %70-75 olarak belirtilmektedir [13].

ED dünya çapında giderek artan bir klinik durum haline gelmiştir. Son 20 yılda yapılan çalışmalara bakıldığında genel olarak ED patogenezinde rol alan moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılması için araştırma yapıldığı görülmüştür. ED'na neden olan birçok multifaktöriyel sebep bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi ve ağırlıklı

olarak görüleni ise vasküler yapının bozulması ve endotel disfonksiyon sonucu oluşan ED'dur.

2.3. Resistin

Resistin, resistin benzeri moleküller (RELM'ler) olarak bilinen bir salgı protein ailesinin bir üyesi olup sistein açısından zengin bir C terminaliyle karakterize edilmiştir [20]. İlk olarak 2001 yılında farelerde tanımlanmıştır ve insülin rezistansından ötürü resistin adı verilmiştir [21]. Farede tanımlanan resistinin, insan resistinine benzer özellikleri taşıdığı görülürken farklılıkları olduğu da tespit edilmiştir.

2.3.1. Resistin Biyolojisi ve Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

Fare resistini, 11 kDa sistein açısından zengin bir polipeptittir. Fare RELMs ailesinde RELM α , RELM β , RELM γ ve resistin olmak üzere 4 üyesi bulunmaktadır[20] ve fare resistin geni kromozom 8 üzerinde lokalize haldedir. 20 amino asit sinyal dizisi ve 94 amino asit olgun segment ile 114 aminoasitlik prekürsör olarak sentezlenir. Moleküller arası 5 adet disülfid bağı ve çoklu β dönüşleri içerir. Resistin, disülfid ve disülfid-olmayan bağlar yoluyla farklı boyutlarda homodimerler veya multimerler oluşturabilirken, bu dimerlerin veya multimerlerin oluşumu, biyoaktivitesi için gerekli değildir [22,23].

İnsan resistini, 108 aminoasitten oluşur ve 12.5 kDa sistein açısından zengin bir peptiddir. İnsan RELMs ailesinde sadece resistin ve RELM β bulunmaktadır [20] ve insan resistin geni, 19. kromozomda yer almaktadır. Fare ve insan resistininin olgun segmentlerinin aminoasit yapısında benzerlikler bulunurken, genler, farklı düzenleme mekanizmalarını, doku dağılımını ve fonksiyonlarını gösteren promoter bölgelere sahiptir [21]. Olgun segment bölümü oligomer oluşturma eğilimi gösterir, bu yüzden insan serumunda birkaç farklı düşük molekül ağırlığında ve yüksek molekül ağırlıklı izoformlarda dolaşır [24].

İnsan resistin reseptörü halen net olarak bilinmemektedir. Bazı etkilerine adenilil siklaz ilişkili protein 1 (CAP 1) ve toll-like benzeri reseptör 4 (TLR 4) aracılık ettiği gösterilmiştir [25,26]. TLR4, insan miyeloid ve epitelyal hücrelerinde rekombinant

insan resistininin proinflamatuvar etkilerine aracılık etmektedir [25]. Ek olarak, sıçanlardaki son bulgulara göre, hipotalamusta insan resistinin TLR4'e doğrudan bağlanmasının proinflamatuvar yolların ve insülin direncinin aktivasyonu ile sonuçlandığını ve bu da TLR4'ün resistin için bir bağlanma bölgesi olabileceğini doğrulamaktadır [27]. İnsan monositlerinde CAP1, resistin reseptörü olarak gösterilmiştir [26]. Resistin monositlerde CAP1'e bağlanarak siklik adenosin monofosfatı, protein kinaz A ve inflamatuvar sitokinlerin nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ile ilişkili transkripsiyonunu aktive eder [27]. Fakat çeşitli metabolik süreçlerde resistinin biyolojik etkilerinin açıklığa kavuşturulması için bu reseptörlerle ilgili olarak daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

İnsan ve fare resistini, değişken N-terminali ve benzer sistein kalıntısı içeren birincil yapısı ile aminoasit seviyesinde % 59 benzerlik gösterirken, [28] yapılan çalışmalara göre kemirgenlerde ve insanlarda resistin ekspresyonu önemli düzeyde farklılık göstermektedir. Kemirgenlerde resistin öncelikle adipositler tarafından salgılanırken, insan resistini ağırlıklı olarak periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) ve makrofajlar tarafından salgılanmaktadır [29]. İnsan resistini, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) interlökin (IL-6) -6 veya lipopolisakkarit (LPS) gibi çeşitli inflamatuvar uyaranlara yanıt olarak indüklenir ve inflamasyonda proinflamatuvar sitokinleri indükler [30]. Buna bağlı olarak obezite, insülin rezistansı [31] ateroskleroz, malinite, astım, otoimmün hastalıklar, kronik böbrek yetmezliği, romatoid artrit, sepsis gibi pek çok patolojik süreçte rol almaktadır [32].

Resistin ilk olarak 2001 yılında tanımlanıp insülin direnciyle ilişkisi ortaya konunca [21] obezite ile ilişkisi araştırılmaya başlanmıştır. Diyete bağlı obez ve genetik olarak obez olan fare modellerinde plazma resistin seviyelerinin arttığı görülmüştür; anti-resistin antikorunun uygulanması sonucu obez ve insüline dirençli hayvanlarda insülin duyarlılığını arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu gözlemlerden yola çıkarak, resistinin, diyabetik fare modelinde insülin direnci ve obezitede önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır [23].

İnsanlarda obezite, insülin direnci ve yüksek serum resistin arasında pozitif bir korelasyon birçok çalışmayla desteklenmektedir. İlk olarak, resistinin insan hepatositlerinde eksprese edildiği ve insülin direncini indüklediği gösterilmiştir [46]. Aynı zamanda, resistin mRNA seviyelerinin, insan PBMC'lerinde kolayca tespit edilebildiği ve diyabetes mellitus 2 (DM2)'li kadın hastalarda, sağlıklı kadınlara kıyasla daha yüksek olduğu, insan DM2'nin patogeneğinde resistinin rol oynadığı ortaya konmuştur [47].

Resistin ile obezite ve diyabet arasındaki ilişkiyle ilgili verilerde farklılıklar da mevcuttur. Bazı rodent modellerinde, obez hayvanların adipoz dokusundaki resistin mRNA ekspresyonunun, sırasıyla serum insülini veya glukoz ile korele olmadığı gösterilmiştir [48]. İnsan çalışmalarında dolaşımdaki resistin seviyeleri ve resistin gen ekspresyonunun obezite ve insülin direncinde hem artmış hem de değişmemiş olduğu rapor edilmiştir [49,50,51,52]. Adipoz dokudaki ekspresyonunun yanı sıra tip 2 diyabetli hastalarda pankreas adacık hücrelerinde [53] yine diyabetik hayvan modellerinde, kalpte resistin ekspresyonunun arttığı ve kardiyak disfonksiyona neden olduğu bildirilmektedir [54].

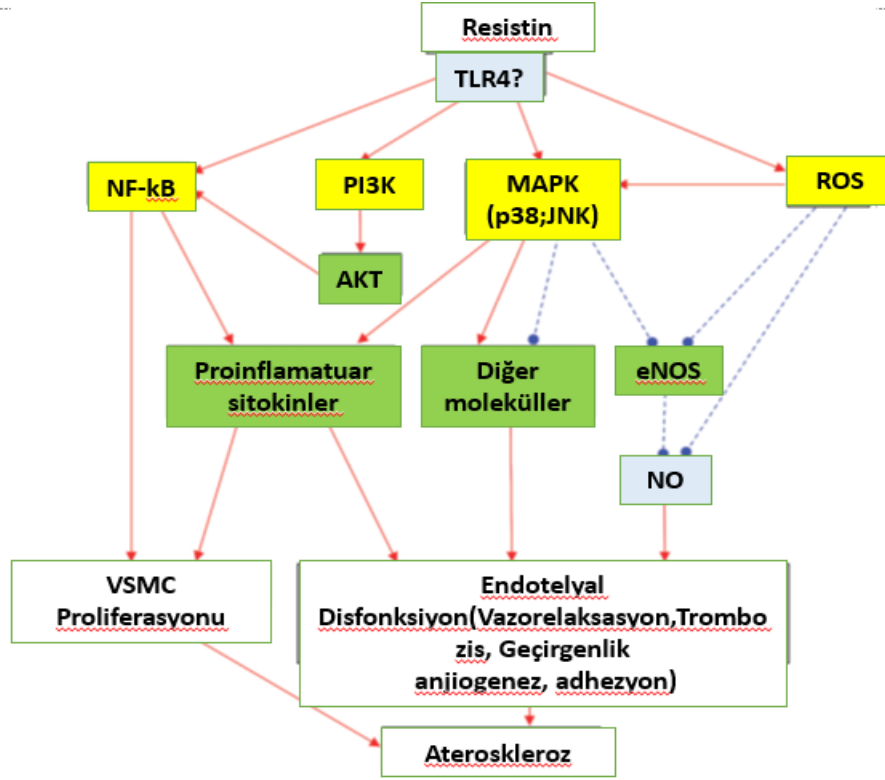
2.3.2. Resistin ve Endotel Disfonksiyon İlişkisi

Endotel hücreleri, kan ve arter duvarı arasındaki ana fiziksel engeli oluşturur ve çözünen maddelerin ve sıvıların, vasküler alandan çevre dokulara hareketini kontrol eder. Endotel hücrelerinden, prostasiklin, endotel kaynaklı gevşetici faktör/NO, anjiyotensin II ve ET-1 gibi bir çok vazoaaktif madde salınır [33,34,35]. Bu maddeler vasküler büyümeyi, vazomotor reaktiviteyi, trombosit fonksiyonunu, pıhtılaşmayı ve immünolojik ve inflamatuvar yanıtları kontrol etmek için gereklidir [36]. Endotel hücreleri, birincil endotel bariyer fonksiyonunu sağlayan endotel hücre kavşağı adı verilen özel yapılar yoluyla bağlanır. Endotel hücre bariyerinin parçalanmasından kaynaklanan, endotel disfonksiyon sonucu endotel tabakası boyunca geçirgenlik artar. Lökositlerin, monositlerin ve makrofajların endotel tabakasına yapışması artar ve kolesterol taşıyan lipoproteinlerin subendotelyal birikimi, aterogeneze katkı sağlar [37,38]. Akut koroner sendromlu hastalarının epikardiyal adipoz dokusundan (EAT)

koşullu ortamlarda üretilen yüksek konsantrasyonda resistin konsantrasyonlarının, endotel hücre geçirgenliğini önemli ölçüde artırarak *in vitro* endotel fonksiyonunu etkilediği bildirilmektedir [39]. Bu bulgular, EAT'den salgılanan resistinin, insan umbilikal ven endotel hücrelerinde yüksek oranda geçirgenliği arttırması yoluyla endotel hasarının önemli indükleyicilerinden biri olduğunu göstermektedir. [40].

Resistinin etkisine aracılık eden reseptörlerle ilgili çalışmalara bakıldığında TL4'ün insülin rezistansı, hipertansif ve inflamatuvar etkilerine aracılık ettiği bildirilmesine rağmen, [41] resistinin reseptörü veya hücre içi sinyal yolları henüz tam olarak tanımlanmamıştır.

Endotelial disfonksiyona neden olan resistinin aracılık ettiği mekanizmalardan bir tanesi, resistinin membrana bağlı TLR4 reseptörü- PI3K/Akt aracılığıyla NFkB'yı aktive etmesi, bu aktivasyon ile pro-inflamatuvar sitokin genlerinin transkripsiyonuna ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonuna neden olmasıdır. Resistin, ayrıca mitojen aktiviteli protein kinaz (MAPK) p38 ve c-Jun N terminal kinaz (JNK) yoluyla proinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarır. Resistin, eNOS gen ekspresyonunu inhibe eden ve NO'nun biyoyararlanımını azaltan süperoksit anyonlarının da üretimini arttırır. Vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve bozulmuş vazorelaksasyon, artmış tromboz, hiperpermeabilite, anjiyogenez ve artmış hücre adezyonu endotel disfonksiyonuna neden olur ve disfonksiyon ile ateroskleroz oluşumuna katkı sağlar. Aşağıdaki şekilde kesintisiz kırmızı oklar aktivasyonu gösterirken, kesik mavi çizgiler inhibisyonu gösterir (Şekil 2) [23].

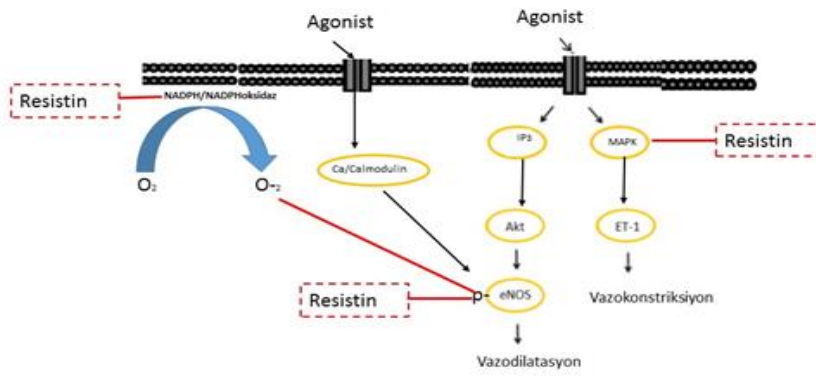


Şekil 2. Resistinin potansiyel etki mekanizması [23]

Resistinin endotelin fonksiyonel etkilerini değerlendiren çalışmalara bakıldığında, aslında etkisinin net olarak ortaya konulmadığı, farklı dokularda farklı mekanizmaların devreye girdiği görülmektedir. Vasküler tonusun düzenlenmesinden sorumlu, endotelden salınan maddelerin modülasyonu ile endotelial disfonksiyon oluşturabileceği görülmektedir. (Şekil 3)

- a) *İn vitro* resistin uygulamasının (40ng/ml, 30 dk) hem sağlıklı hem de diyabetik fare aortasında Ach aracılı endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını azalttığı bildirilmektedir [1].
- b) *İn vitro* resistin uygulamasının (10 ve 40 ng/ml, 24 s) domuz koroner arterinde bradikinin aracılı endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını ve SNP aracılı endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarını azalttığı, süperoksid radikallerini arttırdığı ve eNOS mRNA düzeyini azalttığı bildirilmektedir [2].

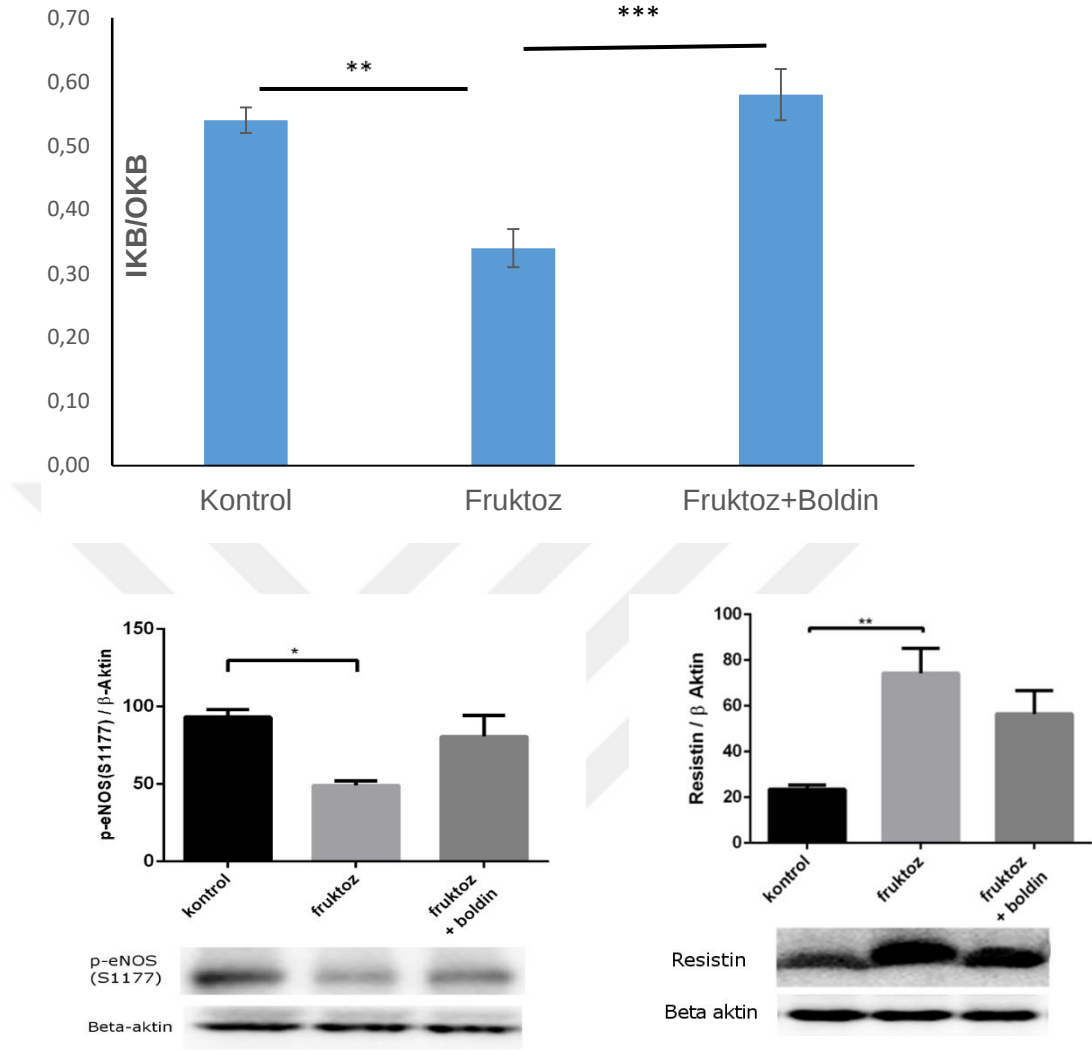
- c) *İn vitro* resistin uygulamasının (10 veya 40 ng/ml, 10 dk) köpek koroner arterinde Ach aracılı endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını etkilemezken, bradikinin aracılı endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını azalttığı bildirilmektedir. Gevşeme yanıtındaki bu azalmanın; ROS miktarındaki artışa bağlı olmadığı, bradikinin reseptörü üzerinden etki oluşturmuş olabileceği bildirilmektedir [42].
- d) Vasküler düz kas hücrelerinde resistinin, NADPH oksidazı arttırarak ROS'u arttırdığı ve NADPH oksidaz inhibitörleri varlığında, resistin aracılı oluşan bu etkinin azaldığı bildirilmektedir [43].
- e) *İn vitro* resistin uygulamasının (5 mmol/L, 30 dk) fare torasik aortası ve mezenterik arterlerinde insülin aracılı NO aktivasyonunu bozup insülin aracılı gevşeme yanıtlarını azalttığı, ayrıca bunu Ach ile uyarılan eNOS /Akt fosforilasyonlarını üzerinden değil, insülin ile uyarılan eNOS /Akt fosforilasyonlarını üzerinden yaptığı, sonuç olarak bu etkisini insülin reseptör substratı (IRS) -1 tirozin /serin fosforilasyonu ve sonucundaki fosfatidilinositol 3-kinaz ile etkileşimi üzerinden yaptığı bildirilmektedir [44].
- f) *İn vivo* kan basıncı çalışmasında, resistinin ET-1 ile indüklenen kan basıncındaki artışları hızlandırıp ve uzattığı, in vitro çalışmada vasküler düz kas hücrelerinde ve ET-1 –Ca⁺² etkinliğini arttırmakta olduğu, resistinin neden olduğu bu kalsiyum artışının, depo ile işletilen Ca⁺² girişi (SOCE) ve hücre dışı sinyalle regüle edilen kinaz (ERK) blokerleri tarafından tersine çevrildiği bildirilmektedir [45].
- g) Rekombinant insan resistini ile inkübe edilen (10-100 ng/ML, 24 saat) endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada, resistinin ET-1 salgısını arttırdığı, NO düzeyini değiştirmedeği bildirilmektedir [3].



Şekil 3. Resistinin endotel üzerine etkileri

Resistinin insülin rezistansı ve endotelial disfonksiyon patogenezindeki rollerinden yola çıkarak planlanan Dokuz Eylül Üniversitesi Farmakoloji Laboratuvarında planlanan önceki çalışmada yüksek fruktoz diyetiyle sıçanlarda MetS oluşturarak

- intrakavernozal basınçlardaki azalma ile ED oluştuğunu,
- ereksiyon fizyolojisinde major transmitter olan NO sentezinden sorumlu eNOS enzim aktivitesinin azaldığını,
- penil dokuda resistin protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. (Şekil 4)



Şekil 4. Sıçanlarda fruktoz ile oluşturulan metabolik sendrom modelinde intrakavernöz basınç azalmakta, penil dokuda p- eNOS (S1177) protein ekspresyonu azalmakta ve resistin ekspresyonu artmaktadır.

Bu bulgular erektil fonksiyonlardaki bozulmanın resistin artışıyla ilişkili olabilir mi sorusunu düşündürmüştür. Ancak önceki proje ile bu bağlantı tam olarak ortaya konmamıştır. Çalışmayı destekler nitelikte olan klinik bir çalışmada ise, resistin düzeyinin tip 2 diyabet ve ED'nu olan hastalarda ED olmayanlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir [4].

2.4. Resveratrol

Resveratrol 3,4',5-trihidroksistilben molekül yapısında olan, farmakolojik potansiyeli nedeniyle yakın zamanda çok fazla araştırılan bir nutrasötiktir. Üzüm, yer fıstığı ve çilek gibi birçok bitkide bulunan bir fitoaleksinin olan resveratrol, ilk olarak 1940'larda *Veratrum grandiflorum*'dan veya beyaz hellebore olarak bilinen bitkiden izole edilmiştir [55]. Stilben bileşikler, bitkilerde mikrobiyal ve fungal enfeksiyonlara karşı direnç gösterme kabiliyetleri ile bilinmektedir [56] ve yapılan araştırmalarda, resveratrolün, yaralı, enfekte olmuş ve ultraviyole işlemleriyle yapraklarda büyük miktarlarda bulunduğu gösterilmiştir [57]. İşlenmiş bitki ürünleri ayrıca önemli miktarda resveratrol içermektedir. Kırmızı şarapta 0.1-14.3 mg/L konsantrasyonunda bulunmaktadır ve diyetlerinde doymuş yağ oranı yüksek olmasına rağmen çok fazla kırmızı şarap tüketen Güney Fransız halkında beklenmedik derecede düşük kalp hastalığı oranının gözlemlendiği "Fransız paradoksuna" neden olduğu çalışmalarla gösterilmiştir [58,59].

2.4.1. Resveratrol Antioksidan Özelliği ve Endotel Funksiyonuyla İlişkisi

Oksijen iyonları ve peroksitleri içeren ROS, konsantrasyona bağlı hem fizyolojik hem de patolojik rollere sahip olabilmektedir. Orta konsantrasyonlarda ROS, sinyal molekülleri olarak hareket ederek vasküler homeostazın önemli düzenleyicileridir. Buna karşılık, aşırı ROS üretimi veya arızalı antioksidan savunma sistemleri nedeniyle yüksek bir ROS konsantrasyonu, oksidatif strese neden olur [60].

NADPH oksidaz, ksantin oksidaz (XO), mitokondriyal solunum zincirinin enzimleri ve disfonksiyonel eNOS; vasküler duvardaki ROS üreten enzim sistemleri arasında büyük öneme sahiptir [60].

NADPH oksidazlar, iki membrana bağlı alt birimden (NOX ve p22phox) ve birkaç sitozolik düzenleyici alt birimden oluşan, çok alt birimli enzim kompleksleridir [61,62]. Vasküler duvarda, vasküler düz kas hücreleri NOX4 ve NOX1'i eksprese ederken, endotel hücreleri baskın olarak NOX4 ve NOX2'yi eksprese etmektedir [60]. NADPH oksidazlar, vaskülatürde başlıca ROS kaynakları olup, süperoksit (O_2^-) ve ayrıca

hidrojen peroksit (NOX4 tarafından) üretir. Önemli olarak, NADPH oksidaz, uncouple eNOS, XO ve mitokondri dahil diğer kaynaklardan ROS üretimini tetikleyebilmektedir. [63,64].

Fizyolojik koşullar altında eNOS, endotelin vazoprotektif fonksiyonunda anahtar bir elementi temsil eden NO üretmektedir [65] fakat patolojik koşullar altında, eNOS işlevsiz hale gelebilir [60]. Oksidatif stres, temel olarak NO'ı, fazla miktarda O_2^- ile hızlı oksidatif etkisizleştirmesinden dolayı, endotel disfonksiyonuna açıkça katkıda bulunmaktadır. İkinci adımda, kalıcı oksidatif stres eNOS ayrışmasına neden olur ve böylece eNOS enzimini bir O_2^- üreticisine dönüştürmektedir.

Daha önce laboratuvarımızda gerçekleşen iki çalışmada da uzun dönem *in vivo* resveratrol uygulamasının, hiperkolesterolemiye bağlı oluşan endotelial disfonksiyonda, çeşitli damar segmentlerinde ve korpus kavernozum dokusunda endotel yanıtlarını koruduğu, eNOS mRNA düzeyini arttırdığı gösterilmiştir [66]. Takip eden diğer çalışmada ise hiperkolesterolemik korpus kavernozum dokusunda, hem endotel yanıtlarını koruduğu hem de bozulan endotel yanıtları düzelttiği, bu etkilerine eNOS fosforilasyonundan sorumlu domaininin ekspresyonunu arttırarak, eNOS aktivasyonunu artırması ve oksidatif stresten sorumlu olan NADPH oksidaz enzimini azaltmasının aracılık ettiği gösterilmiştir (Şekil 5 ve 6) [5].

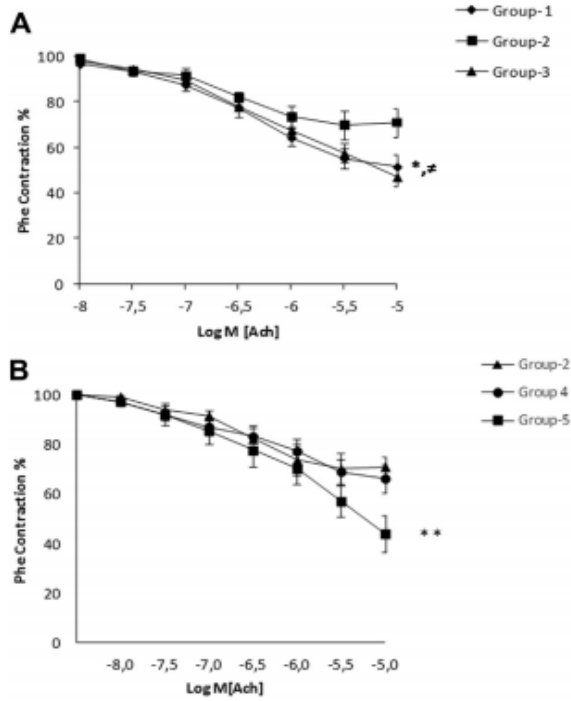


Figure 2. Protective and restorative effects of resveratrol on Ach-induced relaxations in CC. Concentration-response curves of Ach precontracted with Phe obtained in A. Protocol 1, B. Protocol 2. Number of strips in Group 1:14; Group 2:16; Group 3 (8 mg):19; Group 4:12; Group 5 (8mg): 8. Data are presented as the mean $\pm$ SEM of the maximal relaxation expressed as percentage of Phe-induced contraction. One-way ANOVA was used in comparison of groups. * $P < .01$ vs Group 2; $^{\#}P < .001$ vs Group 2; ** $P < .01$ vs Group 4.

Şekil 5. Tavşan penil doku resveratrolün vasküler reaktivite sonuçlarına etkisi [6]. Grup 1 kontrol grubu, Grup 2 Hiperkolesterolemili grup, Grup 3 resveratrol ve hiperkolesterolemik diyet ile eş zamanlı tedavi alan grup, Grup 4 hiperkolesterolemi grubu ve Grup 5 hiperkolesterolemi oluştuktan sonra resveratrol tedavisi alan grup

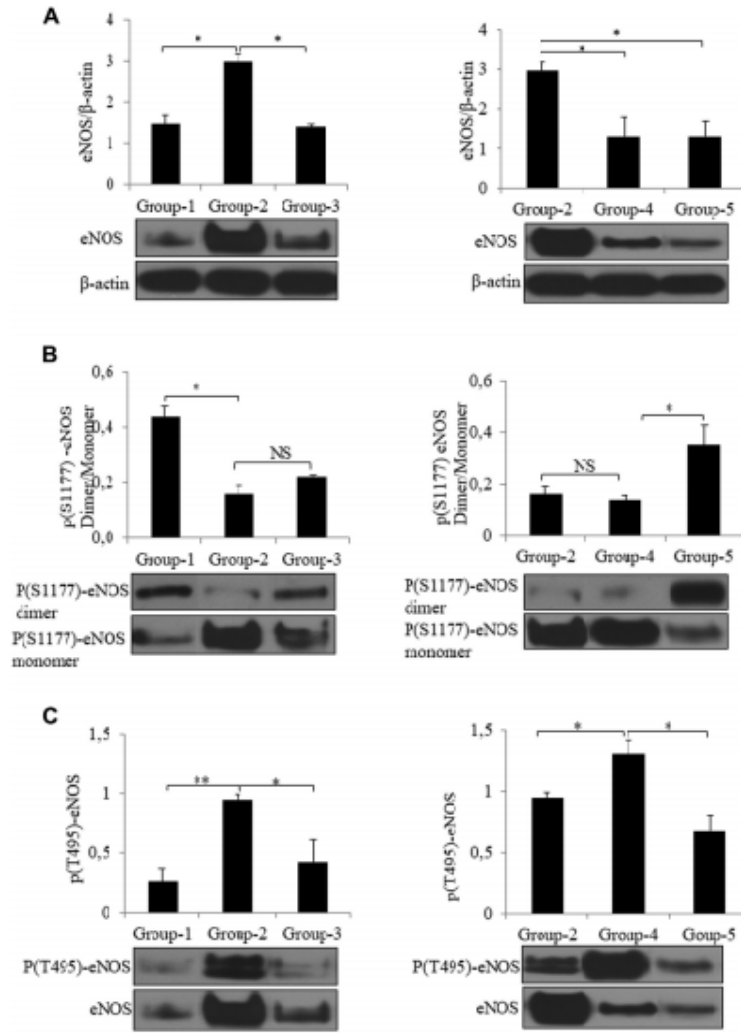


Figure 3. Protective and restorative effects of resveratrol on eNOS expression, activation and inhibition. Protein extracts from hypercholesterolemic and healthy rabbits were subjected to Western blot analysis with the indicated antibodies. A. Data were presented as the relative density of each protein compared with that of β -actin. B. data were presented as the relative density of dimer forms of p(S1177)-eNOS compared with that of monomer forms. C. data were presented as the relative density of monomer forms of p(T495)-eNOS compared with total eNOS. Each bar represents the mean $\pm$ SEM from $n = 6-7$ animals per group. Data are representative of 3 independent Western blots. One-way ANOVA was used in comparison of groups (* $P < .05$; ** $P < .001$; NS = not significant).

Şekil 6. tavşan Penil dokusunda eNOS ekspresyonları [6] Grup 1 kontrol grubu, Grup 2 hiperkolesterolemili grup, Grup 3 resveratrol ve hiperkolesterolemik diyet ile eş zamanlı tedavi alan grup, Grup 4 hiperkolesterolemi grubu ve Grup 5 hiperkolesterolemi oluştuktan sonra resveratrol tedavisi alan grup

Bir polifenolik bileşik olarak resveratrol, hidroksil radikal ($\text{OH}^\cdot$), $\text{O}_2^\cdot$, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit dahil olmak üzere çeşitli oksidanları doğrudan temizlediği *in vitro* sistemlerde gösterilmiştir. Fenton reaksiyonunu $\text{OH}^\cdot$ kaynağı olarak kullanan hücre içermeyen bir sistemde, resveratrolün ($\geq 300 \mu\text{M}$ konsantrasyonlarda) Fenton reaksiyonunun inhibitörü değil bir temizleyicisi olarak

işlev gördüğü gösterilmiştir. Resveratrolün hidroksil radikal temizleme özelliği, fenolik gruplarından kaynaklanmaktadır [67]. Resveratrol'ün ($\geq 100 \mu\text{M}$ konsantrasyonlarında) O_2^- 'yi doğrudan enzimatik olmayan, hücre içermeyen bir sistemde temizlediği gösterilmiştir [68]. Resveratrol (1 veya 24 saatlik inkübasyonunda), doza bağımlı olarak parakuat veya ultraviyole ışığı ile tedavi edilen kültür arterlerinde H_2O_2 konsantrasyonunu azaltmıştır [69]. Bununla birlikte resveratrolün, *in vivo* oksidatif hasara karşı etkilerinin, doğrudan ROS süpürme aktivitesinden ziyade, bir gen regülatörü olarak etkilerine bağlanması da muhtemeldir [70].



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Randomize kontrollü deneysel araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Ekim 2016 tarihinde literatür taraması ile başlayarak 14.06.2019 tarihinde tez savunması ile sonlandırılmıştır. Laboratuvar çalışmaları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmanın evreni ve örneklemi yoktur.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada 19 adet sağlıklı 2000-3000 gram ağırlığında Yeni Zelanda türü erkek tavşan kullanılmıştır.

Deney hayvanları Ocak 2019'da Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir ve çalışma sabahı Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirilmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişkenler: Kasılma-gevşeme yanıtları

Bağımsız değişkenler: Resistin, resveratrol

3.6. Veri Toplama Araçları

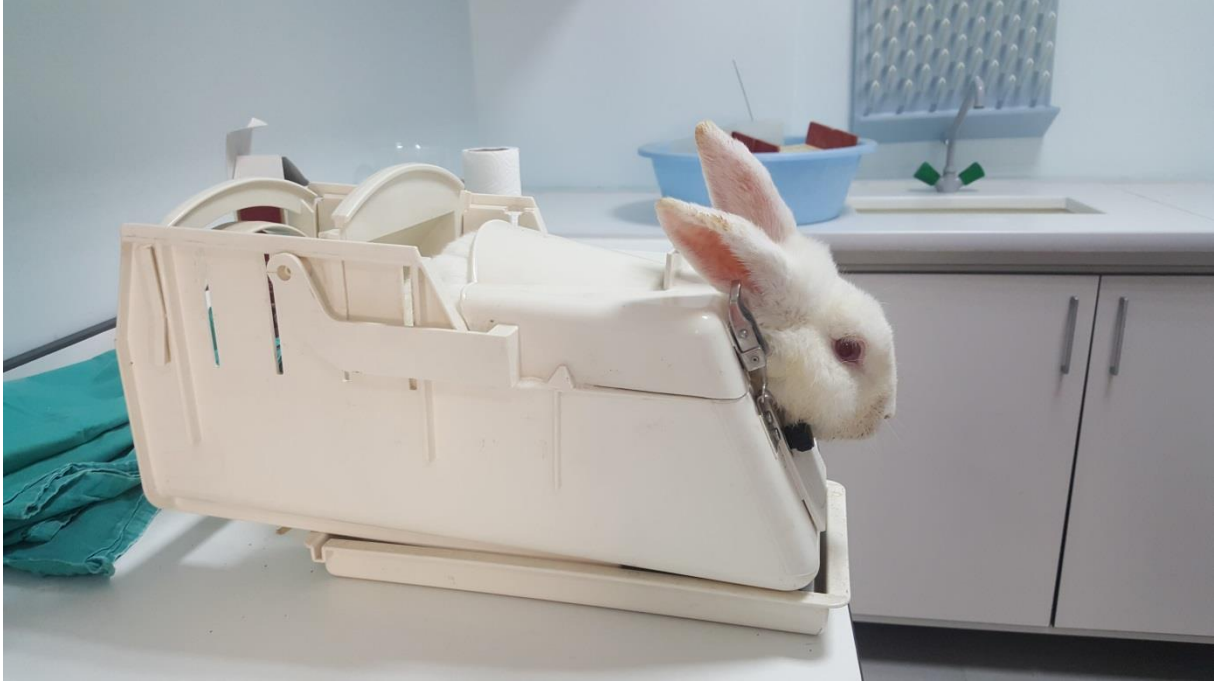
3.6.1. Vücut Ağırlığı Ölçümü

Çalışma modeli olan Yeni Zelanda türü tavşanlar çalışma sabahı Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'nda vücut ağırlıkları ölçülmüştür.

Başlangıç ağırlıkları 2000-3000 gram ağırlığındaki tavşanlar ile çalışılmıştır. Ortalama olarak $2528,84 \pm 286,87$ kilogram ağırlığındadır.

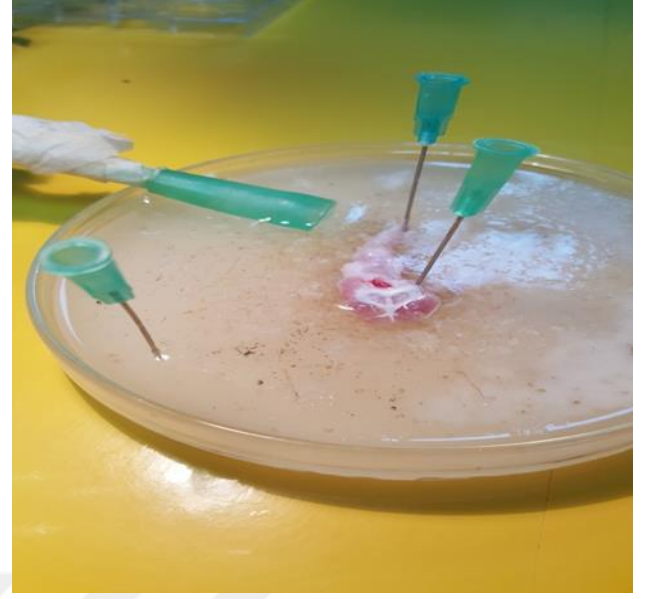
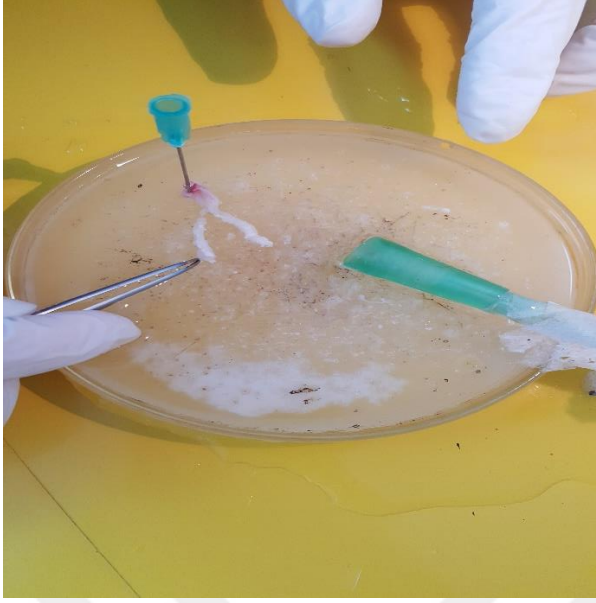
3.6.2. Deney Gruplarının Hazırlanması

Tavşanlar kulak veninden 60mg/kg sodyum tiyopental verilerek sakrifiye edilmiştir. (Şekil 7)



Şekil 7. Tavşan Sakrifikasyonu

Tavşanların penis dokusu eksize edilip soğuk (+4°C) Krebs solüsyonu (Korpus kavernosum (mM): NaCl 136.9, KCl 2.7, KH_2PO_4 0.5, CaCl_2 1.8, MgSO_4 0.6, NaHCO_3 11.9, glukoz 11.5.; pH:7.4) içerisine alınmıştır. Penis dokusu, doku hasarına sebep olmayacak şekilde dikkatlice tunika albugineadan temizlenmiştir. Korpus spongiozum dokusu uzaklaştırıldıktan sonra sağ ve sol korpus kavernosum dokuları ayrılarak her bir dokudan $3 \times 3 \times 4 \text{ mm}^3$ lük boyutlarda şeritler hazırlanmıştır. Bir hayvana ait penisten ortalama 3 veya 4 adet preparat hazırlanmıştır. (Şekil 8)



Şekil 8. Dokuların temizlenmesi

2 hayvandan hazırlanan n=8 şerit, protokole göre 24 saat süre ile +37°C etüvde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) solüsyonu içinde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sürenin sonunda organ banyosunda çalışılmış ve dokuların canlılıklarını kaybettikleri görülmüştür. Bu yüzden protokol değişikliğine gidilerek çalışma aşağıdaki şekilde optimize edilmiş ve preparatlar hazırlanmıştır. (Şekil 9 ve 10) (Tablo 1)

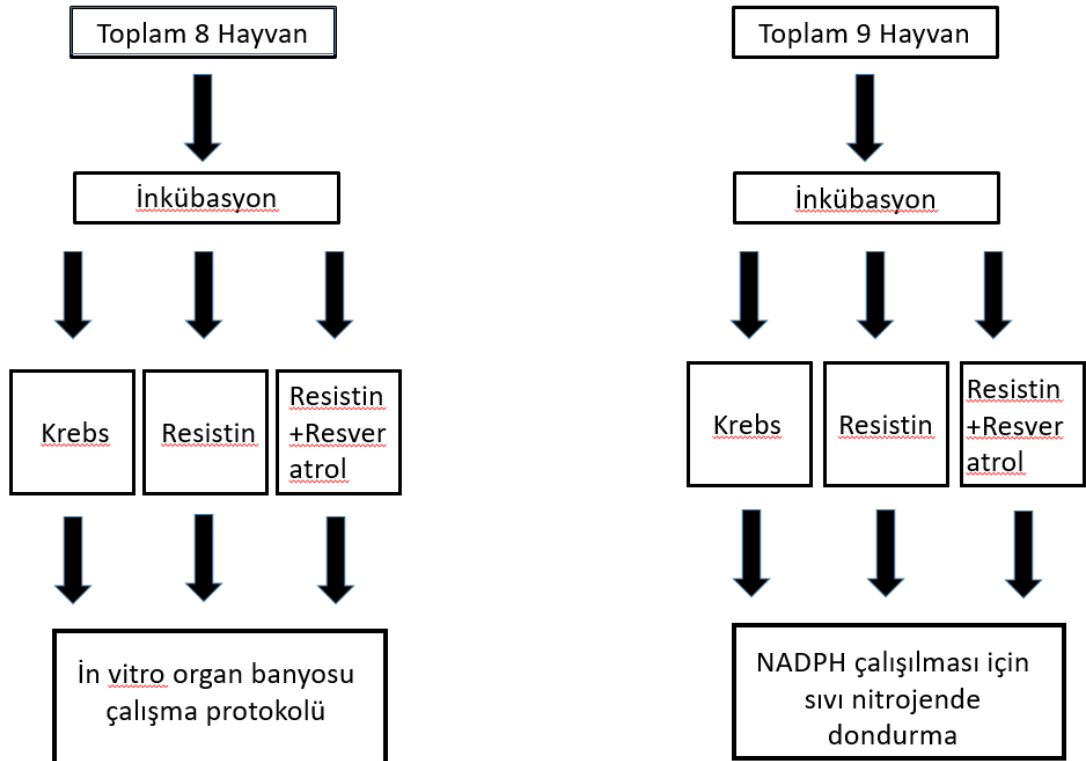
Hazırlanan şeritler 3 ayrı grup olacak şekilde 24 saatlik süre ile +4°C buzdolabında;

- I. **Kontrol Grubu:** Hiç bir madde eklenmeden sadece fizyolojik koşulların sağlandığı çalışma solüsyonu olan Krebs 10 ml içinde
- II. **Resistin Grubu:** Krebs solüsyonuna resistin (40 ng/ml) [2] eklenerek
- III. **Resistin+Resveratrol Grubu:** Resistin ile inkübasyonunun son iki saatine resveratrol (30 uM) [71] eklenerek inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 9. 24 saatlik inkübasyon için çalışma gruplarının hazırlanması

24 saat Krebs solüsyonunda bekleyen dokuların canlılığının değişmediğini göstermek amacıyla karşılaştırma yapabilmek için çalışmada 2 hayvan kurbanı ediliş dokuları temizlendikten sonra bekletilmeden hemen *in vitro* organ banyosunda çalışılmıştır.



Şekil 10. Deney protokolünün gruplara göre ayrımını gösteren şema

Tablo 1. Çalışma protokolünün gruplara göre ve n sayılarına göre ayrımını gösteren tablo

ÇALIŞMA PROTOKOLÜ	<i>Endotel bağımlı ve endotelden bağımsız gevşeme ve kasılma yanıtları</i>	<i>Moleküler çalışmalar</i>
<i>Krebs çözeltisinde 24 saat inkübe edilen korpus kavernosum dokuları</i>	- Ach(10^{-8} M- 10^{-5} M) - ET-1 (10^{-11} - 10^{-7} M) - SNP (10^{-9} M- 10^{-6} M) <i>n=10 şerit</i>	-NADPH oksidaz ölçümü, n=9 şerit
<i>40ng/ml resistin ile 24 saat inkübe edilen korpus kavernosum dokuları</i>	- Ach(10^{-8} M- 10^{-5} M) - ET-1 (10^{-11} - 10^{-7} M) - SNP (10^{-9} M- 10^{-6} M) <i>n=10 şerit</i>	NADPH oksidaz ölçümü, n=8 şerit
<i>40ng/ml resistin ile 24 saat inkübasyonun <u>son iki saatinde</u> 30 μM resveratrol inkübe edilen korpus kavernosum dokuları</i>	- Ach(10^{-8} M- 10^{-5} M) - ET-1 (10^{-11} - 10^{-7} M) - SNP (10^{-9} M- 10^{-6} M) <i>n=8 şerit</i>	NADPH oksidaz ölçümü, n=8 şerit

3.6.3. İn Vitro Organ Banyosu

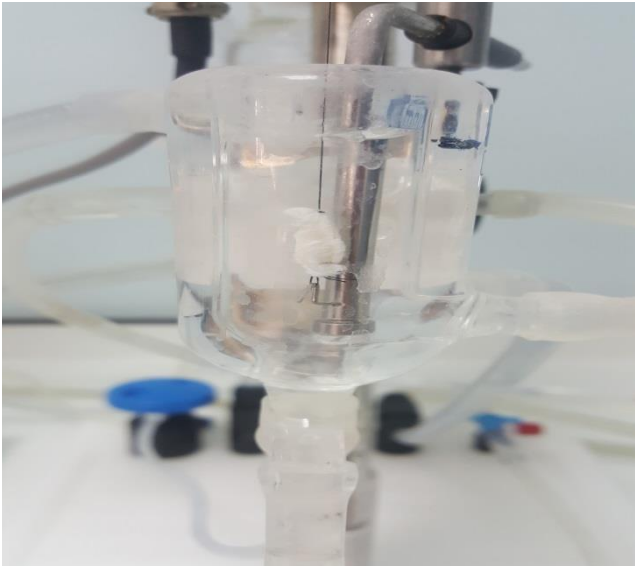
Hazırlanan korpus kavernosum şeritleri her iki ucundan ipek iplikler ile bağlanarak %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılan ve sıcaklığı 37°C'de sabit tutulan modifiye Krebs solüsyonu içeren izole organ banyolarına asılmıştır. Stabilizasyon için

şeritler 1 g'lık gerilimin ardından 1.5 saat süre ile her 15 dakikada bir Krebs solüsyonu değiştirilerek bekletilmiştir. (Şekil 11 ve 12)



Şekil 11. *İn vitro* organ banyosu sistemi

Dinlenme periyodunu takiben, dokuların canlılığını değerlendirmek amacıyla 120 mM KCl ile kasılıp plato elde edildikten sonra dokular yıkanıp yarım saatlik dinlenme periyodunun ardından çalışma protokolüne geçilmiştir.



Şekil 12. *İn vitro* organ banyosunda dokunun asılması

Endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını değerlendirmek amacıyla preperatlar submaksimal dozda (3×10^{-6} M) Phe ile kasılarak, kasılma sabit bir platoya ulaştığında (yaklaşık olarak 10 dakika) kümülatif olarak artan dozlarda Ach (10^{-8} - 10^{-5} M) [6] uygulanarak doz-cevap eğrileri elde edilmiştir.

Yarım saatlik dinlenme periyodunun ardından organ banyoları ET-1 direk ışığa maruz kalmasın diye alüminyum folyo ile kaplanarak, kümülatif artan dozlarda ET-1 (10^{-11} - 10^{-7} M) verilerek doz-cevap eğrileri elde edilmiştir.

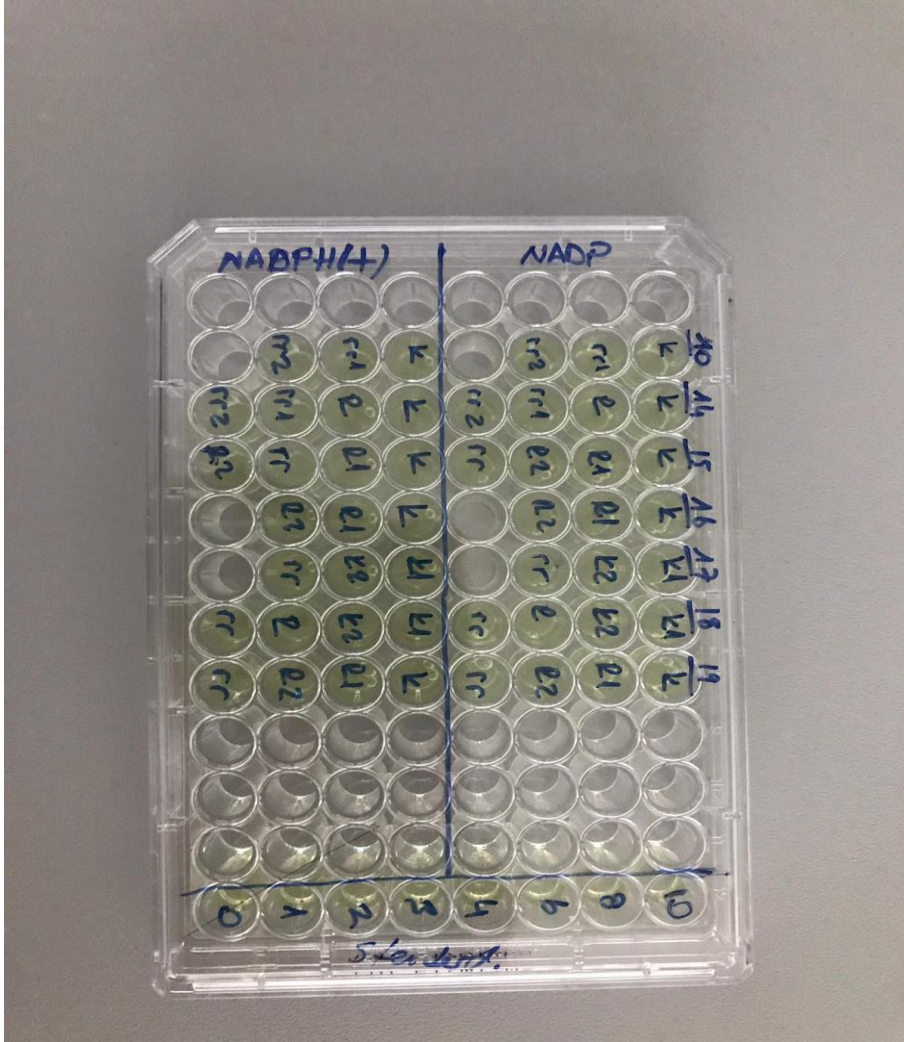
Dokular 30 dk dinlendirildikten sonra endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarını değerlendirmek amacıyla, preperatlar submaksimal dozda (3×10^{-6} M) Phe ile kasılarak, kasılma sabit bir platoya ulaştığında (yaklaşık olarak 10 dakika) kümülatif olarak artan dozlarda SNP (10^{-9} M- 10^{-6} M) [72] uygulanmıştır.

Çalışma protokolü tamamlandıktan sonra dokular tekrar 120 mM KCl ile kasılıp canlılıkları kontrol edilmiştir.

3.6.4. NADP+/NADPH Ölçümü

Çalışma sabahı dokuların hazırlanması sırasında zaman farkını ortadan kaldırmak amacıyla, ependorflara kit içerisinde çıkan 100 µl NADP+ ve NADPH extraction buffer'lar konmuştur. Ardından sıvı nitrojenle dondurulan dokular çıkarılmış, her bir örnek bistüri yardımı ile kesilmiştir ve soğuk fosfat buffer salin (PBS) çözeltisinde yıkandıktan sonra, hassas terazide 20 mg olarak tartılmıştır. Tartımdan sonra alüminyum folyo ile dokular korunarak porselen havanda dövülmüştür. Hazırlanan dokular extraction solüsyonlu ependorflara alınmıştır ve önceden hazırlanmış su banyosunda, 60 °C'de 5 dakika ısıtılmıştır. Sonrasında 20 µl kit solüsyonu eklenmiş ve hafif vortekslenmiştir. Vorteksten sonra 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir ve santrifüj bitiminde süpernatantlar temiz bir tüpe alınmıştır. Kalibrasyon eğrisini çizmek amacıyla premix hazırlanmış, ardından 96'lı well platelere 40 µl süpernatantlar eklenmiştir. Reaksiyonu başlatan çalışma reaktifi deney sonunda hazırlanmış, ölçümden hemen önce 96'lı well platelere 80 µl eklenmiştir. 565 nm'de ilk ölçüm yapılmış ve zaman olarak sıfır kabul edilmiş, 30 dakika oda sıcaklığında reaktifle

inkübasyona bırakılmıştır. 30 dakikanın sonunda 565 nm’de tekrar ölçüm alınmıştır. (Şekil 13)



Şekil 13. NADP⁺/NADPH ölçümüne dokuların hazırlanması

3.6.5. Kullanılan Araç, Gereç ve Kimyasallar

Cihazlar

1. İzole organ banyosu sistemi (Biopac Systems, Inc)
2. Tartı (Acculab ACL3100)
3. Hassas terazi (Precisa XB220A)
4. Vorteks (Heidolph Reax top, Germany)
5. Sıvı nitrojen tankı (AirLiquid GT2)
6. No-frost buzdolabı (Arçelik)

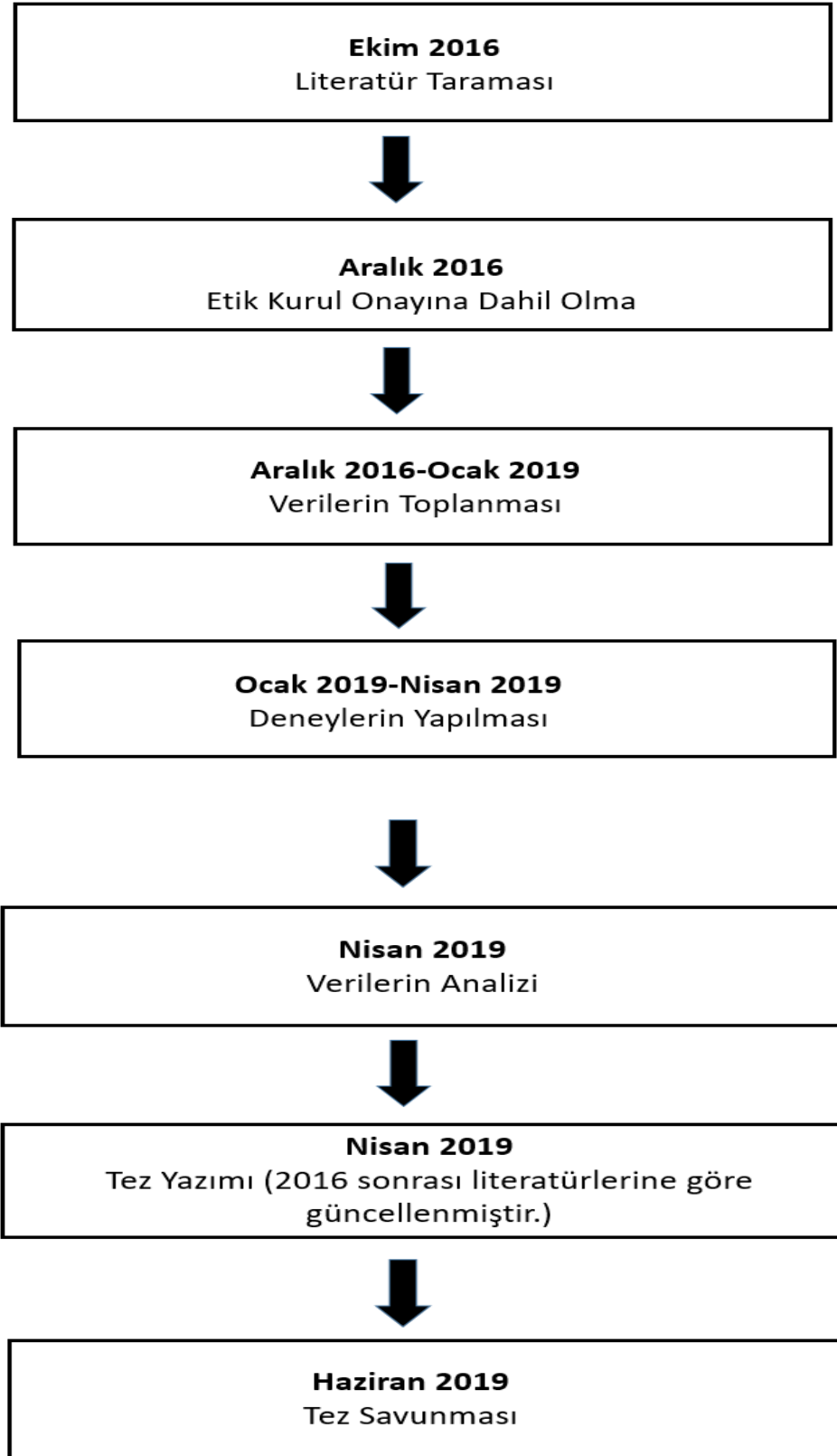
7. Manyetik karıştırıcı (Labar SH-5)
8. pH metre (InoLab WTW)
9. Spektrofotometre (Biotek Synergy HT)
10. Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Sigma Laboratory Centrifuges 3K30)
11. Su banyosu (Memmert)

Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

1. Cerrahi aletler
2. Rekombinant İnsan Resistini (Abcam, Lot: GR61266-12)
3. Resveratrol (Biovision, Lot: 8J171758)
4. Fenilefrin (Sigma Aldrich, Lot: SLBN9020V)
5. Asetilkolin (Sigma Aldrich, Lot: BCBV3168)
6. Sodyum Nitroprussid (Sigma Aldrich, Lot: BCBS5309V)
7. Endotelin-1 (Sigma Aldrich, Lot: 097M4842V)
8. Pental Sodyum (İ.E. Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş., Parti No: 708004)
9. İnsülin Enjektörü (GMED steril enjektör)
10. NADP+/NADPH Assay Kit (Abnova, Katalog Numarası:KA1663)
11. DMSO (Merck, Cas No:67-66-5)
12. Korpus kavernosum Krebs solüsyonu(mM): NaCl 136.9, KCl 2.7, KH₂PO₄ 0.5, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 0.6, NaHCO₃ 11.9, glikoz 11.5. ; pH:7.4
13. Korpus kavernosum 120 mM KCl solüsyonu(mM): NaCl 19.6, KCl 120.0, KH₂PO₄ 0.5, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 0.6, NaHCO₃ 11.9, glikoz 11.5. ; pH:7.4

Krebs solüsyonu ve KCl solüsyonları için gerekli olan tüm kimyasallar Sigma Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D) firmasından elde edilmiştir.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



Şekil 14. Araştırma Planı ve Takvimi

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Endotel bağımlı gevşeme yanıtları değerlendirilirken 1. Phe uygulanması ile oluşan kasılma yanıtı %100 olarak alınıp, Ach gevşeme yanıtları, bu değere göre hesaplanarak elde edilmiştir. SNP yanıtlarının değerlendirilmesi için oluşturulan 2. Phe kasılma yanıtları %100 olarak alınıp kümülatif SNP uygulaması ile oluşan gevşeme yanıtları, bu değere göre hesaplanarak elde edilmiştir. Her iki agonist için maksimum gevşeme yanıtı (Emaks) ve EC50 değerleri hesaplanmıştır.

Çalışmadaki tüm değerler, ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Deney grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık için grup ortalamaları ve standart hataları alınarak "one-way Anova post-hoc Tukey ile student t-test paired ve unpaired," aracılığı ile gruplar arası farkın önemlilik kontrolü yapılmıştır ve p değerinin 0.05'in altında olması, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Sağlıklı dokuda vasküler tonusun düzenlenmesinde kasıcı ve gevşetici ajanlar denge halindedir. *In vitro* organ banyosu deneylerinde, yüksek resistin düzeyinin bu dengeyi bazı dokularda NO aracılı gevşeme yanıtını azaltarak, bazı dokularda ET-1 aracılı kasılma yanıtını arttırarak bozduğu, ayrıca bazı çalışmalarla SNP ile indüklenen endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarını etkilediği bildirilmektedir. Resistinin bu etkileri, dokuya spesifik değişebilmektedir. Endotelde NO sentezinden sorumlu eNOS enziminin aktivasyonu, asetilkolinin indüklediği Ca^{+2} aracılı aktivasyon olabildiği gibi shear stresin, prostasiklin, vasküler endotelyal büyüme faktörünün neden olduğu eNOS enziminin fosforilasyonu ile de gerçekleşmektedir. Resistinin her ikisini de etkileyebildiğini gösteren farklı yayınlar mevcuttur. Ayrıca resistin, eNOS enzim aktivasyonunu olumsuz etkilediği bilinen reaktif oksijen ürünlerinde artışa neden olmaktadır.

Resistinin penil dokudaki etkilerini araştırmak üzere planladığımız çalışmamızda, korpus kavernoza dokusunda Ach ile indüklenen NO-bağımlı (endotel bağımlı) ve SNP ile indüklenen endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarına, ET-1 ile kasılma yanıtlarına etkisinin fonksiyonel olarak değerlendirilmesi, ayrıca resistin varlığında

penil dokudaki serbest oksijen radikallerindeki değişikliği ve resveratrolün bu basamaklardaki değişikliklerin ortaya konması amaçlanmıştır. Bulgularımızda Ach indüklediği NO aracılı gevşeme yanıtlarında, SNP aracılı endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarında ve ET-1'in indüklediği endotel aracılı kasılma yanıtlarında bir farklılık görölmemiştir. Ach aracılı eNOS aktivasyonu, endotelden NO salınımına aracılık eden mekanizmalardan sadece birisidir ve biz bunu sadece fonksiyonel çalışmalarla gösterebildik. Antioksidanların resistin kaynaklı eNOS'un aşağı regölasyonunu etkili bir şekilde bloke ettiği de çalışmalarda gösterilmiştir. Korpus kavernosumda eNOS enzim aktivitesinden sorumlu domainin ekspresyonunun değerlendirilememesi ve antioksidanın eNOS üzerine etkisinin gösterilememesi, çalışmamızın önemli sınırlılıklarından birisidir.

3.10. Etik Kurul Onayı

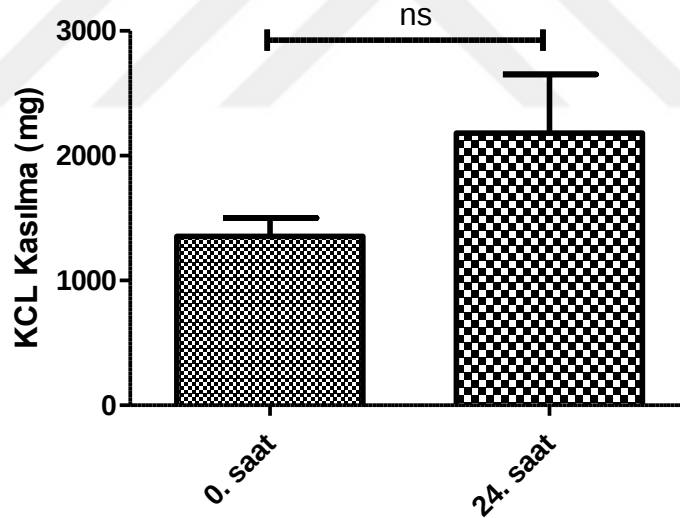
Çalışmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nca değerlendirilerek 22/2016 no'lu kararı ile onaylanmıştır.

4. BULGULAR

4.1 *In vitro* Organ Banyosunda Korpus kavernosumun Fonksiyonel Yanıtlarının Değerlendirilmesi

4.1.1. 24 saat inkübasyonun doku canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

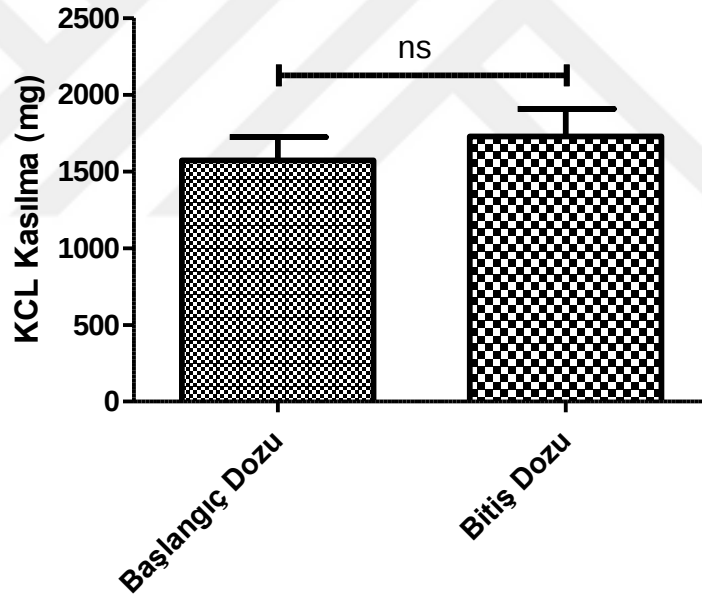
24 saat inkübasyon sonrasında doku canlılığının değişip değişmediğini değerlendirmek amacıyla penil dokudan elde edilen n=8 kavernöz şeritler, aynı gün organ banyosunda çalışılmıştır ve 120 mM KCl, korpus kavernosum dokularına uygulanmıştır. Çalışma protokolümüze göre, 24 saat inkübasyona bırakılan Krebs grubu dokularının yanıtları ile kıyaslanmıştır ve KCl'e bağlı kasılma yanıtları arasında, istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 15).



Şekil 15. 24 saatlik inkübasyonun doku canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi, student t testi unpaired kullanıldı, $p<0.05$ anlamlı kabul edildi.

4.1.2. Organ banyosu Deney protokolü Öncesi ve Sonrasında Doku Canlılığının ve Endotel Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Dokuların krebs solüsyonunda, resistin içeren krebs solüsyonunda ve 24 saatlik inkübasyonun son 2 saatinde resveratrol eklenen resistin içeren krebs solüsyonunda inkübasyonunun ardından, organ banyosu deney protokolünün başlangıcında 120 mM KCl uygulanması, korpus kavernozumlar üzerinde, her üç grupta kasılma yanıtları oluşturmuştur. Dokuların çalışma sonundaki canlılıklarının devam edip etmediğini değerlendirmek amacıyla deney sonunda, dokular tekrar 120 mM KCl ile kasılmıştır. KCl'e bağlı kasılma yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ve dokular canlılığını aynı şekilde korumuştur ($p>0.05$). (Şekil 16)

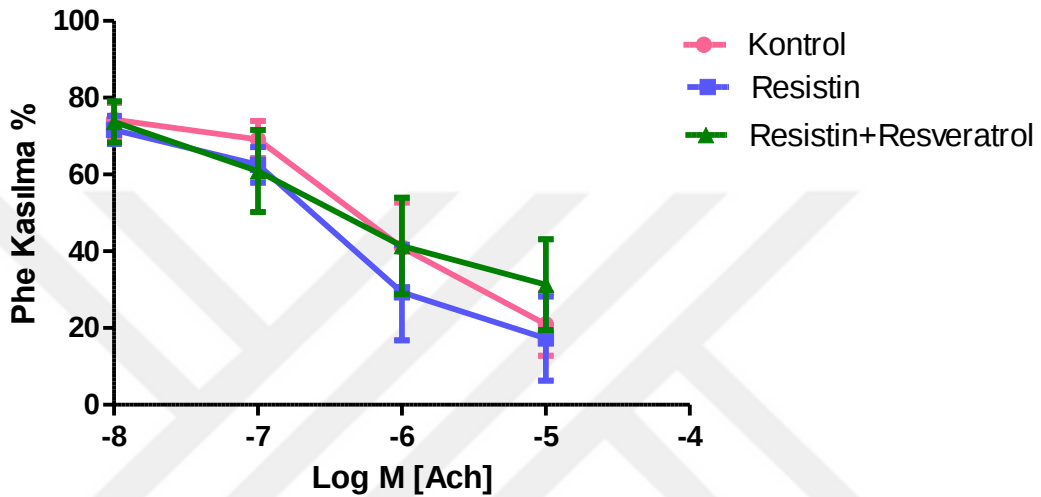


Şekil 16. Çalışma protokolü başlangıcındaki ve bitişindeki KCl yanıtları; student t testi paired kullanıldı, $p<0.05$ anlamlı kabul edildi.

4.1.3. Asetilkolin Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

24 saat inkübasyon sonrası her üç grupta, korpus kavernozum dokularının 3×10^{-6} M Phe ile kasılması sonrası kümülatif artan dozda Ach (10^{-8} - 10^{-5} M) uygulanmıştır. Phe uygulaması ile oluşan kasılma yanıtı %100 olarak alınıp, Ach

uygulanması ile oluşan gevşeme yanıtları, bu değere göre hesaplanarak elde edilmiştir. Krebs grubu, resistin grubu ve resistin+resveratrol grubunda Ach'e bağlı gözlenen maksimum gevşeme yanıtları sırası ile % 79.03 ± 8.18 ; 82.83 ± 10.91 ; 68.71 ± 11.81 olarak elde edilmiştir. Gruplar arasında fenilefrin kasılması sonrası Ach ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında herhangi anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). (Şekil 17)

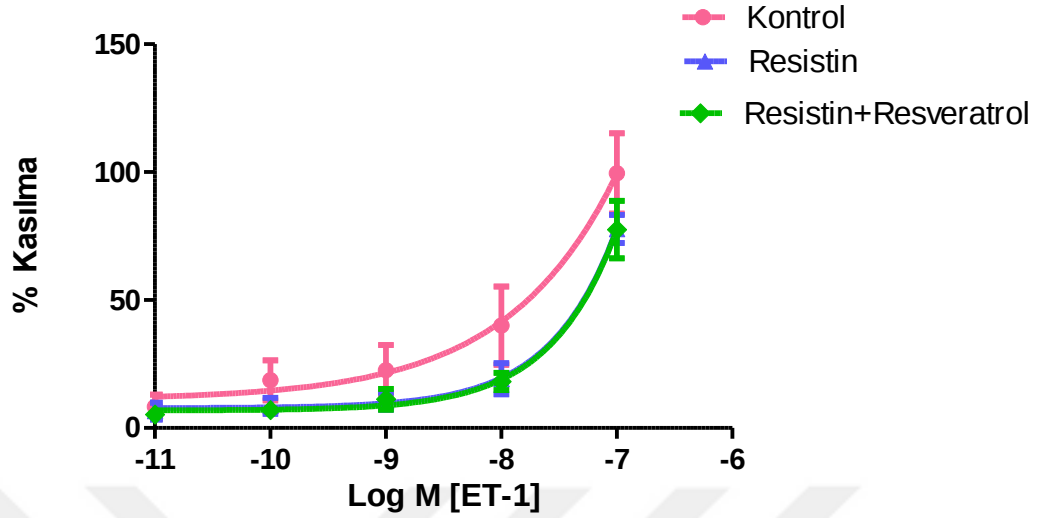


Şekil 17. Ach aracılı gevşeme yanıtları; kontrol, resistin ve resistin+resveratrol grubu n sayısı=8, one-way Anova post-hoc Tukey testi kullanıldı, $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

EC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında ise krebs grubu, resistin grubu ve resveratrol grubu sonuçları sırası ile 6.24 ± 0.23 , 6.39 ± 0.32 , 6.17 ± 0.49 bulunmuş ve gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir. ($p > 0.05$)

4.1.4. Endotelin-1 Aracılı Kasılma Yanıtlarının Değerlendirilmesi

24 saat inkübasyon sonrası her üç grupta, korpus kavernosum dokularına kümülatif olarak artan dozda ET-1 (10^{-11} - 10^{-7} M) uygulanmıştır. Krebs grubu, resistin grubu ve resistin+resveratrol grubunda, ET-1'e bağlı gözlenen maksimum kasılma yanıtları sırası ile % 99.54 ± 15.67 ; 77.8 ± 5.53 ; 77.58 ± 11.26 olarak elde edilmiştir. Gruplar arasında ET-1 ile oluşturulan kasılma yanıtlarında herhangi anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). (Şekil 18)

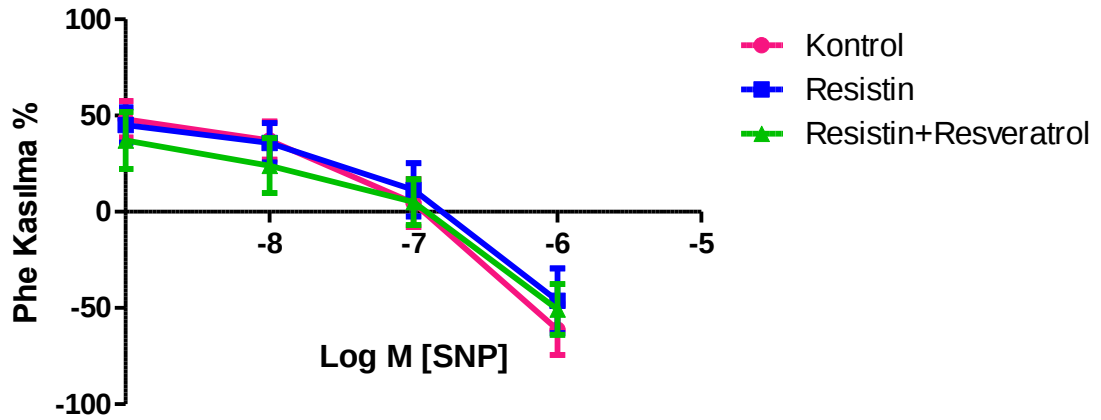


Şekil 18. ET-1 aracılı kasılma yanıtları; kontrol, resistin ve resistin+resveratrol grubu n sayısı=8, one-way Anova post-hoc Tukey testi kullanıldı, $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

EC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında ise krebs grubu, resistin grubu ve resveratrol grubu sonuçları sırası ile 8.01 ± 0.35 , 7.48 ± 0.12 , 7.41 ± 0.16 bulunmuş ve gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir. ($p > 0.05$)

4.1.5. Sodyum Nitropurisd Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

24 saat inkübasyon sonrası her üç grupta, korpus kavernosum dokuları 3×10^{-6} M Phe kasılması sonrası kümülatif olarak artan dozda SNP (10^{-9} - 10^{-6} M) uygulanmıştır. Phe uygulanması ile oluşan kasılma yanıtı %100 olarak alınıp, SNP uygulanması ile oluşan gevşeme yanıtları, bu değere göre hesaplanarak elde edilmiştir. Krebs grubu, resistin grubu ve resistin+resveratrol grubunda SNP'ye bağlı gözlenen maksimum gevşeme yanıtları sırası ile % 161.3 ± 13.17 ; 146.2 ± 16.85 ; 150.8 ± 13.15 olarak elde edilmiştir. Gruplar arasında Phe kasılması sonrası SNP ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında herhangi anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). (Şekil 19)



Şekil 19. SNP aracılı gevşeme yanıtları; kontrol, resistin ve resistin+resveratrol grubu n sayısı=8, one-way Anova post-hoc Tukey testi kullanıldı, $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

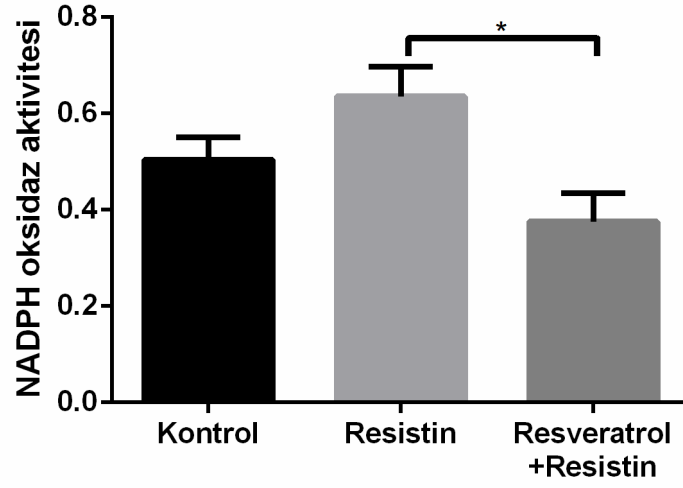
EC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında ise krebs grubu, resistin grubu ve resveratrol grubu sonuçları sırası ile 8.63 ± 0.37 , 8.58 ± 0.45 , 8.37 ± 0.42 bulunmuş ve gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir. ($p > 0.05$)

4.2. NADP⁺/NADPH Ölçümünün Değerlendirilmesi

İlk olarak örnekler ve standartların OD₃₀ değerinden OD₀ değeri çıkartılarak ΔOD değerleri hesaplanmıştır. Tüm örnek ve standartlardan ΔOD blank değeri çıkartılarak değerler standardize edilmiştir. NADPH standartlarının değerlerinden en az 5 tanesi kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Standart eğrinin R² değeri (0.9721) ve eğim denklemi $y = 0.0251x$ hesaplanmıştır. Denklemden y yerine absorbanslar yazılarak örneklerin μM cinsinden NADPH düzeyleri hesaplanmıştır. Aynı işlemler NADP⁺ içinde gerçekleştirilerek NADP⁺/NADPH oranları belirlenmiştir.

Elde edilen veriler GraphPad Prism 6.01 programına aktarılmıştır. Parametrik bir test olan one-way Anova analizi ile istatistiksel olarak gruplar arasında bir fark olup olmadığı incelenmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için post-hoc Tukey analizi yapılmıştır. Buna göre tek başına resistin uygulanan grupta

NADP⁺/NADPH oranının resveratrol+resistin uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazla olduğu görülmüştür ($p<0.05$). (Şekil 20)



Şekil 20. NADP⁺/NADPH ölçümü; kontrol, resistin ve resistin+resveratrol grubu n sayısı=7, one-way Anova post-hoc Tukey testi kullanıldı, $p<0.05$ anlamlı kabul edildi.

5. TARTIŞMA

ED; organik, ilişkisel ve psikolojik de dahil olmak üzere, erektil cevabın herhangi bir bileşeninde değişiklik içeren çok boyutlu fakat yaygın bir erkek cinsel fonksiyon bozukluğudur. MetS ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıklarla güçlü ilişkisi bulunmaktadır. ED semptomlarını azaltmak için minimal invaziv girişimler arasında yaşam tarzı değişiklikleri, oral ilaçlar, enjekte edilmiş vazodilatör ajanlar ve vakumlu ereksiyon cihazları bulunur. Bu cerrahi olmayan müdahalelere kontrendikasyonları olan hastalar, tıbbi tedaviden olumsuz etkilenenler (veya buna direnç göstermeyen) ve ayrıca penil fibrozisi veya penis damar yetmezliği olanlar da cerrahi tedavilere yönlendirilmektedir. ED, bir erkeğin yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilir; çoğu hastada cinsel performansla ilgili depresyon ve endişe semptomları yaşanmaktadır. Bu belirtiler sırasıyla çiftlerin cinsel deneyimini ve çiftlerin yaşam kalitesini etkiler [73]. Bu yüzden ED ile ilgili olarak sadece yeni tedavi hedefleri ve yeni farmakoterapi çalışmaları değil aynı zamanda devam eden pek çok klinik öncesi çalışması da bulunmaktadır.

MetS, ilk olarak 1920'lerde hipertansiyon, hiperglisemi ve gut içeren bazı tıbbi sorunların birikimi olarak tanımlandı [74]. Fakat 1998'de Dünya Sağlık Örgütü tarafından diyabet ve komplikasyonlarının bu sendromla ilişkilendirildiği ifade edilmiştir [75]. Son çalışmalara bakıldığında ise MetS'i ED ile de ilişkilendirildiği görülmüştür. MetS'li erkeklerde ED, üç kata kadar daha yaygındır [76,77]. MetS'li hastaların toplam %79-96'sında ED görülür ve ED'li hastaların % 29-66'sında ise MetS görülmektedir [78]. Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmada da yüksek fruktoz diyetiyle sıçanlarda MetS oluşturarak intrakavernozal basınçlardaki azalma gösterilmiştir. Bu çalışmanın önemli bulgularından bir tanesi MetS ile ilişkili bir hormon olan resistinin penil dokuda protein ekspresyonunun arttığı gösterilmesidir.

Resistin, insülin direnci ve obezite gelişiminde rol oynadığı ileri sürülen bir adipokindir [79]. Resistin, obezite ve insülin direnci arasındaki bağlantı farelerde yapılan çalışmalarda güçlü görünmekle birlikte [80], resistinin insanlardaki fizyolojik önemi tartışmalı olup plazmadaki resistinin plazma seviyeleri farklı popülasyonlarda açıkça tanımlanmamıştır [81]. Yapılan çalışmalarda, Tip 1 ve 2 diyabet, obezite ve

inflamatuvar durumları olan hastalarda plazma resistin seviyeleri >40 ng/ml'ye yükseldiği gösterilmiştir [82,83,84]. Aterosklerotik dokularda da yüksek düzeyde resistin saptanmıştır [85]. Bu bulgulara bağlı olarak yüksek sistemik veya lokal resistin konsantrasyonlarının endotel disfonksiyonuna neden olabileceği düşünülmüştür [86]. Resistin insülin direncindeki rolü [23,46,47] ve insülin aracılı endotel bağımlı gevşeme yanıtlarında hasar oluşturmaları [44] vasküler disfonksiyona neden olabileceği düşüncesini oluştururken, farklı dokularda *in vitro* çalışmalarla direk etkisiyle endotel hasarı oluşturduğu gösterilerek bu düşünce doğrulanmıştır. Seto ve arkadaşları organ banyosunda 40ng/ml resistin ile 30 dk inkübasyon sonrasında hem sağlıklı hem de diyabetik fare aortasında Ach aracılı endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının azaldığını göstermişler ancak bu etkisine aracılık eden mekanizmalar çalışılmamıştır [1]. Bu bulguların tersine başka bir çalışmada ise Dick ve arkadaşları, köpek koroner arterinde yaptıkları çalışmada koroner arterde düşük ve yüksek doz (10 veya 40 ng/ml) resistin ile 10 dk inkübasyonu sonrasında kümülatif artan doz Ach (0,01 uM -1 uM) ile elde edilen gevşeme yanıtlarının değişmediği, 10 ng/ml resistin ile inkübasyonun kümülatif bradikininle (0,01 uM -1 uM) elde edilen gevşeme yanıtlarını azalttığı, ancak 10 uM bradikinin konsantrasyonuna çıkıldığında ise resistinin etkisinin ortadan kalktığı görülmektedir. Bu çalışmada resistinin etkisinde NO veya prostasiklin yolları bloke edildiğinde bradikinin üzerinde oluşturduğu bu etkinin değişmediği, etkisini bu yollardan bağımsız oluşturduğu bildirilmektedir. Bradikinin yanıtlarını hasarlayıcı etkisinde O_2^- radikallerini artırarak mı yaptığı sorusu irdelendiğinde ise yine anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [42]. Domuz koroner arterinde resistinin endotel yanıtlarına etkisini değerlendiren başka bir çalışmada, 24 saat resistin inkübasyonu sonrasında bradikinin aracılı gevşeme yanıtlarında hasar oluştuğunu bildirilmektedir. Bu çalışmada Dick ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak, daha yüksek konsantrasyonda (40 ng/ml) ve daha uzun süre inkübasyon sonrasında, 10 uM bradikinine ait gevşeme yanıtlarını da bozduğu görülmektedir[2]. Literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında resistinin endotel hasarı oluşturuca etkisinin doza, süreye ve türe göre farklılık oluşturabildiği görülmektedir.

Resistinin vasküler yapılara yönelik etkileri yanı sıra, yapılan literatür araştırmalarında, resistinin vasküler komponentinin olduğu bilinen penil dokudaki fizyopatolojik değişiklikleri değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Literatür

bilgilerinin ışığı altında çalışmamızda penil dokuda resistinin oluşturduğu hücresel etkiler ve bunun fonksiyonel yanıtlara yansımaları araştırdık. Bu araştırma için *in vitro* koşullarda 40 ng/ml resistin ile inkübasyon sonrasında, organ banyosunda korpus kavernosum dokusunun endotel aracılı gevşetici ve kasıcı yanıtı değerlendirmek için Ach ile indüklenen NO-bağımlı gevşeme ve ET-1 aracılı kasılma yanıtlarını, ayrıca endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarını değerlendirmek için de SNP ile indüklenen gevşeme yanıtlarını değerlendirdik. Aynı zamanda resveratrolün yüksek doz resistin varlığında penil dokudaki etkilerini değerlendirmek amacıyla, bu koşulda resveratrolün etkinliğini araştırdık.

Öncelikle çalışmanın protokolünün doğruluğunu ve dokuların canlılığını değerlendirmek üzere, Kougias ve arkadaşlarının [2] çalışması referans alınarak 24 saat süre ile, +37°C etüvde DMEM solüsyonu içinde inkübe edilen dokular organ banyosunda çalışılmış ve dokuların canlılığını yitirdiği görülmüş, bu deney koşulu başarılı olmamıştır. Bu yüzden protokol değişikliğine gidilerek dokuları saklama koşulu olan +4°C sıcaklık ile değiştirilmiş ve dokular inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat Krebs ile inkübasyon süresinin sonunda KCl ile doku canlılığı değerlendirilmiş ve sakrifikasyonu takiben, hemen çalışılan dokularla istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Farklı bir çalışmada Göçmez ve arkadaşları, sakrifikasyondan hemen sonra çalışılan tavşan korpus kavernosum dokusunda elde ettikleri KCl kasılma yanıtlarının, bizim çalışmamızda 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen KCl yanıtlarıyla benzer olduğu görülmüştür [87]. Bulgularımıza göre 24 saat +4°C'de inkübasyonun, doku canlılığında herhangi bir değişim yapmadığı kanaatine varılarak bu koşullarda protokolümüzü uyguladık.

Penil dokuda endotel aracılı gevşeme yanıtlarına aracılık eden birçok mediatör bulunmaktadır ancak asıl etkiden sorumlu ana mekanizma NO üzerindendir. Penil dokuda vazorelaksasyon sinirsel uyarım sonucu Ach'in hücre içi Ca^{+2} artırıcı etkisi sonucu eNOS enzim aktivasyonu, NO sentezi ve salınımıyla başlamakta ve başlangıçta oluşan bu gevşemenin indüklediği gerilim stresine bağlı eNOS fosforilasyonu sonucu enzimin aktivasyonu ve NO'daki artış ile gevşeme devam etmekte ve ereksiyon oluşmaktadır. Çalışma protokolümüzde penil dokuda resistin inkübasyonu sonrası Ach aracılı gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. Literatürde resistin varlığında Ach

aracılı yanıtları değerlendiren çalışmalara baktığımızda, Seto ve ark. genetik olarak oluşturulmuş dislipidemik diyabetik fare aortasında resistinin Ach aracılı gevşeme yanıtlarını azalttığını bildirmektedir[1]. Bu bulgunun tersine Ach aracılı NO'nun oluşturduğu gevşeme yanıtlarına baktığımızda , Dick ve ark [42] bulgularına benzer olarak resistin grubunda Emaks ve EC50 değerlerimizde kontrol grubuna göre anlamlı farklılık saptanmamıştır. Yine bizimle benzer bulgu elde eden Lou ve arkadaşları, resistinin NO üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında resistinin fare aortasında Ach aracılı NO yanıtları değiştirmezken insülin aracılı NO yanıtlarının değiştirdiğini, NO yanıtlarında görülen bu azalmadan sorumlu mekanizma olarak resistinin serbest oksijen radikallerini arttırması ve bu artışın eNOS'un fosforilasyon aracılı aktivasyonu azaltmış olduğu ve serbest oksijen radikallerindeki bu artışın da NADPH oksidaz üzerinden yaptığını bildirmişlerdir [88]. Benzer olarak biz de çalışmamızda penil dokuda, NADPH oksidaz aktivite ölçümü yaptığımızda resistin inkübasyonu sonrası NADPH oksidaz aktivitesinin artma eğiliminde olduğunu gördük. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptayamadık. Lou ve arkadaşları bu etkiyi insan endotelyal hücre kültüründe göstermişlerdir. Biz ise direk doku inkübasyonu ile gösterdik. Farkı saptayamamızın bir nedeni uyguladığımız protokol sonucu resistinin yeterli oranda dokuya geçişi sağlanamaması olabilir. Bu koşulda örnek sayımız daha fazla olsaydı belki bu farkı görebilirdik. Çalışmamızın diğer önemli kısıtlılıklarından bir tanesi de sadece Ach aracılı NO yanıtlarını değerlendirip eNOS enzim aktivasyon yollarından eNOS enzim fosforilasyonunu değerlendirememizdir.

Resistin vasküler tonus üzerindeki etkisini gevşeme yanıtını azaltarak yaptığı gibi vazokonstriksiyondan sorumlu ET-1 üzerinden de yapmaktadır. Bu konuda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara bakıldığında Verma ve arkadaşları safen ven endotel hücresinde, resistin 50 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarda 24 saatlik inkübasyonu sonucunda ET-1 salınımında önemli bir artışa neden olduğunu bildirmektedir [3]. Sığır beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde ise ET-1 ekspresyonunu etkilemediği gösterilmiştir [89]. Yapılan klinik bir çalışmada ise 76 MetS hastadan alınan kan örneklerinden yapılan ölçümlerde resistin ve ET-1 düzeylerinin birbiri ile korele olduğu gösterilmiştir [90]. Sıçanlarda *in vivo* olarak yapılan bir çalışmada, 30 mg/sa/kg resistinin ET-1 ile indüklenen kan basıncındaki artışı potansiyelize ettiği gösterilmiştir [45]. Bizde çalışmamızda 24 saatlik resistin inkübasyonunun ET-1'in vasküler

reaktivite yanıtlarına etkisini değerlendirdik. Elde ettiğimiz bulgulara göre ET-1 doz bağımlı olarak kasılma yanıtı oluşturmaktadır ancak resistin varlığında bu kasılma yanıtında bir artış gözlenmemiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda resistinin ET-1 sentez ve salınımına etkisi araştırılmış ve etkisi gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda resistinin ET-1 zerine etkisini fonksiyonel olarak değerlendirdik ve elde ettiğimiz bulgu, kasılmasına aracılık eden reseptör ve postreseptör olaylar üzerindeki etkili olmadığını dşndrmştir. Bu konuda net bir sonuç verebilmek için ET-1'in sentez ve salınımını üzerine etkisini değerlendiren çalışmalar yapılması gerekmektedir.

SNP, bir NO donörüdür ve bu nedenle cGMP yolunun uyarıcısıdır. Hücrede K^+ kanallarını açarak hiperpolarizasyon meydana getirir ve endotelden bağımsız gevşeme yanıt oluşturur [91,92]. Genel olarak çalışmalarda resistinin endotel üzerinden etkisi değerlendirilirken, sadece bir çalışmada Kougias ve arkadaşları domuz koroner arterinde tek doz (1 μ M) SNP uygulaması sonucu oluşan endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı derecede (%11 oranında) azalttığını göstermişlerdir [2]. Kümülatif olarak artan dozda SNP denediğimiz çalışmamızda penil dokuda elde edilen maksimal gevşeme yanıtı % 161 iken, resistin varlığında bu yanıt %146 olarak bulunmuştur. Resistin, SNP maksimal gevşeme yanıtında %12,4 oranında bir azalma oluşursa da, bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Epidemiyolojik alışmalar, Akdeniz diyetinde bir bitki olarak yaygın şekilde tüketilen polifenol olan resveratrolün, tip 2 diyabetteki ölümlerin çoğunu oluşturan kardiyovasküler hastalık riskinin azalması ile ilişkili olduğunu göstermektedir [93,94]. Vasküler disfonksiyon, diyabet ile eş zamanlı olarak kardiyovasküler sistemde birçok hastalık durumunun ortaya çıkışında ilk adımdır ve oksidatif stresin diyabetle ilişkili vasküler disfonksiyonun patogeneğinde anahtar mekanizma olduğu bilinmektedir. [95,96]. Oksidatif stres, aşırı reaktif oksijen türlerinin üretilmesinden kaynaklanır. NO'nın ROS tarafından etkisizleştirilmesinin, NO biyoyararlanımının ve endotel disfonksiyonunun gelişmesinde kritik bir faktör olduğu kabul edilmektedir [96]. NADPH oksidaz, vasküler yapıda ve penil dokuda anahtar bir O_2^- kaynağıdır [97,98]. Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada hiperkolesterolemiye bağlı olarak penil dokuda vasküler disfonksiyon oluştuğu ve resveratrol tedavisi vasküler disfonksiyon

oluşumunu engellediği gösterilmiştir [5]. Takip eden başka bir çalışmada koruyucu etkisi yanında penil dokuda oluşan vasküler disfonksiyonu geriye döndürdüğü de gösterilmiştir. Bu etkilerini NADPH oksidaz aktivitesini azaltarak ve eNOS'un aktivasyonundan sorumlu domainin fosforilasyonunu arttırarak yaptığı ortaya konmuştur [6]. Yapılan diğer çalışmalara baktığımızda ise yine resveratrolün patolojik koşullarda artan NADPH oksidaz aktivitesini azalttığını görmekteyiz. Cheng ve arkadaşları, fruktoz ile beslenen sıçan grubunda NADPH oksidaz seviyesinin arttığını, resveratrol tedavisi alan grupta ise artmış NADPH oksidaz seviyesinin azaldığını göstermiştir [99]. Yapılan başka çalışmada ise Chen ve arkadaşları, fare beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde glukoz ile artan NADPH oksidaz aktivitesinin resveratrol ile azaldığını göstermiştir [100]. Bu çalışmamızda da resveratrolün *in vitro* koşullarda resistin ile inkübe edilen penil dokuda NADPH oksidaz aktivitesini anlamlı olarak azalttığını gösterdik. Ancak bulgularımıza göre resistin uygulanan grupta NADPH oksidaz aktivitesi kontrol grubuna göre artış gösterse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bu nedenle resveratrolün bu etkisinin patolojik koşulu düzeltmesine bağlı olduğunu söyleyemeyiz. Bu etkisi NADPH oksidazı bağlayıcı etkisinede bağlı olabilir. Çalışmamızın bir diğer kısıtlılığında resistin ile inkübe edilmiş grupta resveratrolün etkisi değerlendirilmiş, sadece resveratrol ile inkübe edilen grup olmadığı için NADPH oksidaz aktivitesine doğrudan etkinliği değerlendirilememiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ereksiyon fizyolojisinde ana mekanizma endotele bağlı düz kas gevşemesidir. Bu nedenle kavernöz dokuda endotel bütünlüğünün ve fonksiyonlarının devamının sağlanması önem taşımaktadır.

Bir adipokinin olan resistinin kemirgenlerde yapılan çalışmalarında insülin direnci ve metabolik bozukluklara aracılık eden bir mediatör olduğu kabul edilmiştir. Yine hayvan ve insan çalışmalarında, insan resistininin kardiyovasküler hastalıklar için bir biyomarker ve insan koroner arter hastalığında potansiyel bir mediatör olduğuna dair güçlü kanıtlar sağlanmıştır [101]. Kardiyovasküler hastalıklarda artış göstermesinin yanı sıra, vasküler yapılarda endotel fonksiyonunu bozduğu gösterilmiş ancak kavernöz doku gevşeme yanıtlarına etkisine dair literatürde bir bilgiye rastlanmamıştır. Resistin ED ilişkisinden bahseden tek bir klinik çalışma vardır. Bu çalışmada da sadece tip 2 diyabete eşlik eden ED'nu olan hastalarda kan resistin düzeyinde artış olduğu bildirilmiştir [4]. Bu çalışmamızla birlikte ilk defa resistinin penil dokuda gevşeme ve kasılma yanıtlarına etkisi araştırılmıştır. Ayrıca penil dokuda koruyucu ve tedavi edici etkinliği gösterilen resveratrol [6] varlığında resistine bağlı oluşan etkilerin geriye dönüşümünün olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Yüksek doz resistin varlığında penil dokudaki fizyopatolojik değişiklikleri değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalarımızın devamı niteliğinde olan *in vitro* koşullarda resistinin penil doku üzerine direk etkisi değerlendirilmiştir.

Yüksek doz resistin varlığında;

a. fonksiyonel yanıtlardaki değişiklikler

b. oksidatif strese arttığı bilinen NADPH oksidaz doku düzeyi araştırılarak,

c. Yine oksidatif stresi azalttığı ve eNOS enzim aktivasyonunu arttırdığı bilinen resveratrolün yüksek doz resistin varlığında penil dokudaki etkileri araştırılarak ilk kez resistinin penil doku fizyopatolojisindeki rolü ve bu koşulda resveratrolün etkinliği değerlendirilmiştir.

Literatürdeki çalışmalar değerlendirildiğinde resistinin türe ve konsantrasyonuna bağlı olarak vasküler tonus üzerindeki etkisine aracılık eden mekanizmaların, buna bağlı olarak da vasküler yapıdaki etkisinin değişebildiği görülmektedir. Biz çalışmamızda, etki mekanizmalarından sadece bir kısmını araştırabildik. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, resistinin NADPH oksidaz aktivitesini artırarak penil doku yanıtlarını değiştirme potansiyeli olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bunun ortaya konabilmesi için *in vitro* koşullarda farklı doz ve sürelerde resistinin etkisi değerlendirilmelidir. Ayrıca türe göre etkileri değiştiği bilindiği için insan penil dokusunda ereksiyon patofizyolojisi ve resistin ilişkisinin mekanizmalarını araştıran daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu çalışma sonuçlarına ve laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalara göre ise resveratrolün ED üzerinde alternatif bir tedavi hedefi olabileceği, yapılacak olan gelecek çalışmalara rehber oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Seto SW, Lam TY, Or PMY, Lee WYW ve ark. Folic acid consumption reduces resistin level and restores blunted acetylcholine-induced aortic relaxation in obese/diabetic mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2010; 9: 872-880.
2. Kougias P, Chai H, Lin PH, Lumsden AB ve ark. Adipocyte-derived cytokine resistin causes endothelial dysfunction of porcine coronary arteries. *Journal of Vascular Surgery*, 2005; 41(4):691-8.
3. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW ve ark. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation*, 2003; 108(6):736-40.
4. Derosa G, Romano D, Tinelli C, D'Angelo A ve ark. Prevalence and associations of erectile dysfunction in a sample of Italian males with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2015; 108(2):329-35.
5. Soner BC, Murat N, Demir O, Guven H, Esen A ve ark. Evaluation of vascular smooth muscle and corpus cavernosum on hypercholesterolemia. Is resveratrol promising on erectile dysfunction?. *Int J Impot Res*, 2010; 22(4):227-33.
6. Murat N, Korhan P, Kizer O, Evcim S ve ark. Resveratrol Protects and Restores Endothelium-Dependent Relaxation in Hypercholesterolemic Rabbit Corpus Cavernosum. *The Journal of Sexual Medicine*, 2016; 13(1):12-21.
7. Mercader J, Palou A, Bonet ML. Resveratrol enhances fatty acid oxidation capacity and reduces resistin and Retinol-Binding Protein 4 expression in white adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011; 22(9):828-34.
8. Cirino G, Fusco F, Imbimbo C, Mirone V. Pharmacology of erectile dysfunction in man. *Pharmacol Ther*, 2006; 111: 400-23.
9. d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Mirone V, Cirino G. Hydrogen sulfide and erectile function: a novel therapeutic target. *Nat Rev Urol*, 2011; 8: 286-9.
10. Qiu X, Villalta J, Lin G, Lue TF. Role of hydrogen sulfide in the physiology of penile erection. *J Androl*, 2012; 33: 529-35.
11. Hurt KJ, Sezen SF, Lagoda GF. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012; 109: 16624-9
12. Lasker GF, Pankey EA, Kadowitz PJ. Modulation of soluble guanylate cyclase for the treatment of erectile dysfunction. *Physiology (Bethesda)*, 2013; 28: 262-9
13. Braun M, Wassmer G, Klotz T, Reifenrath B ve ark. Epidemiology of erectile dysfunction: results of the 'Cologne Male Survey'. *International journal of impotence research*, 2000;12(6):305-11.

14. Kaplan HS. The Evaluation of Sexual Disorders. New York, Brunne/Mazel, 1983; 23–25.
15. Shamloul R, Ghanem H. Erectile dysfunction. *Lancet*, 2013;381 (9861):153–65.
16. Simopoulos EF, Trinidad AC. Male erectile dysfunction: integrating psychopharmacology and psychotherapy. *General hospital psychiatry*, 2013; 35(1):33–8.
17. Melnik T, Abdo CG. Psychogenic erectile dysfunction. Comparative study of three therapeutic approaches. *J Sex Marital Ther*, 2005; 31:243–255.
18. Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ ve ark. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *The Journal of Urology*, 1994; 151(1):54– 61.
19. Akkus E, Kadioglu A, Esen A, Doran S ve ark. Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Turkey: a population-based study. *European Urology*, 2002; 41(3):298–304.
20. Steppan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med*, 2004; 255:439–447.
21. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ ve ark. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001; 409:307–312.
22. Juan CC, Kan LS, Huang CC, Chen SS ve ark. Production and characterization of bioactive recombinant resistin in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2003; 103:113–117.
23. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *British Journal of Pharmacology*, 2012; 165(3):622–32.
24. Gerber M, Boettner A, Seidel B, Lammert A ve ark. Serum resistin levels of obese and lean children andadolescents: biochemical analysis and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90:4503–4509.
25. Tarkowski A, Bjersing J, Shestakov A, Bokarewa MI. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *J Cell Mol Med*, 2010; 14(6B):1419–1431.
26. Lee S, Lee HC, Kwon YW ve ark. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell Metab*, 2014; 19:484–497.
27. Benomar Y, Gertler A, De Lacy P. Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll like receptor 4. *Diabetes*, 2013; 62:102–114.
28. Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE ve ark. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science*, 2004; 304:1154–1158.

29. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 300:472-476.
30. Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF ve ark. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 309:286-29010.
31. Barnes KM, Miner JL. Role of resistin in insulin sensitivity in rodents and humans. *Curr. Prot. Peptide. Sci.* 2009; 10: 96-107.
32. Park HK, Qatanani M, Briggs ER, Ahima RS ve ark. Inflammatory induction of human resistin causes insulin resistance in endotoxemic mice. *Diabetes*, 2011; 60(3): 775-783.
33. Caldwell PR, Seegal BC, Hsu KC, Das M ve ark. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science*, 1976; 191:1050-1051.
34. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288:373-376.
35. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y ve ark. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988;332:411-415.
36. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 2001; 104:365-372.
37. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 42:1149-1160.
38. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, 2004; 15:1983-1992.
39. Langheim S, Dreass L, Veschini L, Maisano F ve ark. Increased expression and secretion of resistin in epicardial adipose tissue of patients with acute coronary syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010; 298:H746-H753.
40. Hogan SP, Seidu L, Blanchard C, Groschwitz K ve ark. Resistin-like molecule beta regulates innate colonic function: barrier integrity and inflammation susceptibility. *J Allergy Clin Immunol*, 2006; 118:257-268.
41. Jiang Y, Lu L, Hu Y, Li Q ve ark. Resistin induces hypertension and insulin resistance in mice via a TLR4-dependent pathway. *Scientific reports*, 2016; 6:22193.
42. Dick GM, Katz PS, Farias M 3rd, Morris M ve ark. Resistin impairs endothelium-dependent dilation to bradykinin, but not acetylcholine, in the coronary circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006; 291(6):H2997-3002.

43. Raghuraman G, Zuniga MC, Yuan H, Zhou W. PKC ϵ mediates resistin-induced NADPH oxidase activation and inflammation leading to smooth muscle cell dysfunction and intimal hyperplasia. *Atherosclerosis*, 2016; 253:29-37.
44. Gentile MT, Vecchione C, Marino G, Aretini A ve ark. Resistin impairs insulin-evoked vasodilation. *Diabetes*, 2008; 57(3):577-83.
45. Chuang TY, Au LC, Wang LC, Ho LT ve ark. Potential effect of resistin on the ET-1-increased reactions of blood pressure in rats and Ca²⁺ signaling in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*, 2012; 227(4):1610-8.
46. Sheng CH, Di J, Jin Y, Zhang YC ve ark. Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin resistance. *Endocrine*, 2008; 33:135–143.
47. Tsiotra PC, Tsigos C, Anastasiou E, Yfanti E ve ark. Peripheral mononuclear cell resistin mRNA expression is increased in type 2 diabetic women. *Mediators Inflamm*, 2008; 2008: 892864.
48. Lee JH, Bullen JW, Jr, Stoyneva VL, Mantzoros CS. Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005; 288:E625–E632.
49. Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M ve ark. Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88: 4848–4856.
50. Filippidis G, Liakopoulos V, Mertens PR, Kiropoulos T ve ark. Resistin serum levels are increased but not correlated with insulin resistance in chronic hemodialysis patients. *Blood Purif*, 2005; 23:421–428.
51. Hasegawa G, Ohta M, Ichida Y, Obayashi H ve ark. Increased serum resistin levels in patients with type 2 diabetes are not linked with markers of insulin resistance and adiposity. *Acta Diabetol*, 2005; 42:104–109.
52. Iqbal N, Seshadri P, Stern L, Loh J ve ark. Serum resistin is not associated with obesity or insulin resistance in humans. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2005; 9: 161–165.
53. Al-Salam S, Rashed H, Adeghate E. Diabetes mellitus is associated with an increased expression of resistin in human pancreatic islet cells. *Islets*, 2011;3(5):246-9.
54. Lebeche D. Diabetic cardiomyopathy: is resistin a culprit?. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2015;5(5):387-393.
55. Aggarwal BB. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer:preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 2004; 24:2783–2840.
56. Bavaresco LP, Cantu E. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 1997; 36:77–83.

57. Langcake PWVM. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 1979; 18:244–253.
58. Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 1992; 339:1523–1526.
59. Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? . *Eur. J. Endocrinol*, 1998; 138:619–620.
60. Li H, Forstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol*, 2013; 13:161–167.
61. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2007; 87:245–313.
62. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2011; 10: 453–471.
63. Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, Sorrentino S ve ark. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; 27: 943–948.
64. Schulz E, Wenzel P, Munzel T, Daiber A. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2014; 20: 308–324.
65. Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*, 2002; 7: 132–147.
66. Bozkurt O, Kefi A, Demir Ö, Murat N, Gidener S ve ark. Effects of resveratrol on the alterations of cavernosal eNOS and LOX-1 expression in the hypercholesterolemic condition: a preliminary study. *Turk J Med Sci*, 2016; 46(4):1083-8.
67. Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B ve ark. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 309: 1017–1026.
68. Jia Z, Zhu H, Misra BR, Mahaney JE ve ark. EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. *Mol Cell Biochem*, 2008; 313: 187–194.
69. Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinskyy N ve ark. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007; 292: H2417–H2424.
70. Xia N, Forstermann U, Li H. Resveratrol as a gene regulator in the vasculature. *Curr Pharm Biotechnol*, 2014b; 15: 401–408.
71. Boydens C, Pauwels B, Vanden L, Van J. Protective effect of resveratrol and quercetin on in vitro-induced diabetic mouse corpus cavernosum. *Cardiovasc Diabetol*, 2016; 15(1):46.

72. Akdag H, Murat N, Evcim S, Esen A ve ark. Acute effect of rosiglitazone on relaxation responses in hypercholesterolemic corpus cavernosum. *Int J Impot Res*. 2016; 28(3):110-3.
73. Yafi FA, Jenkins L, Albersen M, Corona G ve ark. Erectile dysfunction. *Nat Rev Dis Primers*, 2016; 2: 16003.
74. Haidara M, Mikhailidis DP, Yassin HZ, Dobutovic B ve ark. Evaluation of the possible contribution of antioxidants administration in metabolic syndrome. *Curr Pharm Des*, 2011; 17:3699–712.
75. Kaya E, Sikka SC, Gur S. A comprehensive review of metabolic syndrome affecting erectile dysfunction. *J Sex Med*, 2015; 12(4):856-75.
76. Ciccone MM, Iacoviello M, Puzzovivo A, Scicchitano P ve ark. Clinical correlates of endothelial function in chronic heart failure. *Clin Res Cardiol*, 2011; 100:515–21.
77. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr ve ark. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*, 2004; 110:227–39.
78. Bal K, Oder M, Sahin AS, Karatas CT ve ark. Prevalence of metabolic syndrome and its association with erectile dysfunction among urologic patients: Metabolic backgrounds of erectile dysfunction. *Urology*, 2007; 69:356–60.
79. Lazar MA. Resistin- and obesity-associated metabolic diseases. *Horm Metab Res*, 2007; 39: 710–716.
80. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci*, 2011; 108:15324–15329.
81. Yang B, Li M, Chen B, Li TD. Resistin involved in endothelial dysfunction among preclinical Tibetan male young adults. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2012; 13(4):420-5.
82. Fehmann HC, Heyn J. Plasma resistin levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and in healthy controls. *Horm Metab Res*, 2002; 34: 671–673.
83. Forsblad d'Elia H, Pullerits R, Carlsten H, Bokarewa M. Resistin in serum is associated with higher levels of IL-1Ra in post-menopausal women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2008; 47: 1082–1087.
84. Laudes M, Oberhauser F, Schulte DM, Freude S ve ark. Visfatin/PBEF/Nampt and resistin expressions in circulating blood monocytes are differentially related to obesity and type 2 diabetes in humans. *Horm Metab Res*, 2010; 42:268–273.
85. Burnett MS, Lee CW, Kinnaird TD, Stabile E ve ark. The potential role of resistin in atherogenesis. *Atherosclerosis*, 2005; 182: 241–248.

86. Chen C, Jiang J, Lü JM, Chai H ve ark. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010; 299(1): H193–H201.
87. Göçmez SS, Utkan T, Gacar N, Sarioglu Y. Chronic administration of fluoxetine impairs neurogenic and endothelium-dependent relaxation of the rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *Eur J Pharmacol*, 2011; 16;670(1):224-8.
88. Luo J, Huang L, Wang A, Liu Y ve ark. Resistin-induced endoplasmic reticulum stress contributes to the impairment of insulin signaling in endothelium. *Front. Pharmacol*, 2018; 9:1226.
89. Takahashi K, Totsune K, Kikuchi K, Murakami O. Expression of endothelin-1 and adrenomedullin was not altered by leptin or resistin in bovine brain microvascular endothelial cells. *Hypertension Research*, 2006; 29:443–448.
90. Samsamshariat SZA, Sakhaei F, Salehizadeh L, Keshvari M ve ark. Relationship between resistin, endothelin-1, and flow-mediated dilation in patient with and without metabolic syndrome. *Adv Biomed Res*, 2019; 8:16.
91. Fu Q, Yao DH, Jiang YQ. Effect of sodium nitroprusside on hemodynamics of corpus cavernosum in Chinese. *Asian J Androl*, 2001; 3(4):311-3.
92. Gao B, Xue ZY. Nitric oxide induced relaxation of isolated canine blood vessel and cavernous smooth muscle. *Chin J Urol*, 1996; 17: 109-13.92
93. Simopoulos AP. The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *J Nutr*, 2001; 131:3065S–3073S.
94. Sander GE, Wilklow FE, Giles TD. Heart failure in diabetes mellitus: causal and treatment considerations. *Minerva Cardioangiol*, 2004; 52:491–503.
95. Blann AD, Lip GY. The endothelium in atherothrombotic disease: assessment of function, mechanisms and clinical implications. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1998; 9:297–306.
96. Shah AM, Channon KM. Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease. *Heart*, 2004; 90:486–487.
97. Griendling KK. NADPH oxidases: new regulators of old functions. *Antioxid Redox Signal*, 2006; 8:1443–1445.
98. Jin L, Burnett AL. NADPH oxidase: recent evidence for its role in erectile dysfunction. *Asian J Androl*, 2008; 10(1): 6–13.
99. Cheng PW, Ho WY, Su YT. Resveratrol decreases fructose-induced oxidative stress, mediated by NADPH oxidase via an AMPK-dependent mechanism. *Br J Pharmacol*, 2014; 171:2739.

100. Chen F, Qian LH, Deng B. Resveratrol protects vascular endothelial cells from high glucose-induced apoptosis through inhibition of NADPH oxidase activation-driven oxidative stress. *CNS Neurosci Ther*, 2013; 19:675.
101. Lee SE, Kim HS. Human resistin in cardiovascular disease. *J Smooth Muscle Res*, 2012; 48(1):27-35.



8. EKLER

8.1 EK-1 Etik Kurul Onayı

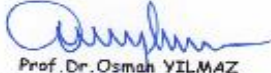
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 08/24/2016
Toplantı Tarihi : 27 Aralık 2016

35340. Incealtı, İzmir-232 412234

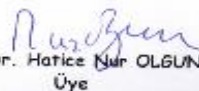
Sayın, Doç.Dr.Nergiz DURMUŞ
Tıbbi Farmakoloji AD.

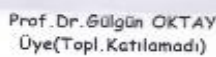
22/2016 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Resistinin tavşan korpus kavernosumundaki etkisi üzerinde resveratrolün rolü" isimli projede; Sedef Gidener'in danışman olduğu, 16 adet tavşanın kullanılacağı projede; gönderilen belgeler incelenerek, projeye Türkan Güngör, Erkan Kahraman, Ozan Bozkurt araştırmacı olarak dahil edilmesi uygun bulunmuş olup etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof. Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

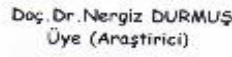

Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili


Prof. Dr. Satiye AKTAŞ
Üye


Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye


Prof. Dr. Gülgün OKTAY
Üye(Topl. Katılmadı)


Prof. Dr. Gökçe KIRKIM
Üye


Doç. Dr. Nergiz DURMUŞ
Üye (Araştırmacı)

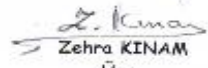

Doç. Dr. Pembe UYGUN KEŞİNOĞLU
Üye


Doç. Dr. Furkan ERTAY
Üye


Doç. Dr. Nermin Nüket GÖKMEN MAS
Üye


Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
Üye


Yard. Doç. Dr. Orhan KALEMÇİ
Üye


Zehra KINAM
Üye


Vet. Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin proje başvuru formunda bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

8.2 EK-2 Özgeçmiş



TÜRKAN GÜNGÖR

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	24295638694
Doğum Tarihi	06/02/1992
İletişim Adresi	Mansuroğlu Mah. 288/6 Sok. No:11 Kat: 7 Daire: 23-24 Yurt İş Merkezi 35030 Mimar Sinan Mah. 1487. Sok. No:5 Hasan Ercan Apt. Daire:10
Telefon	(553) 479 35 35
E-posta	turkangungor92@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

01 Eylül 2016 - Şu Anda (2 yıl 8 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, FARMAKOLOJİ (YL)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.96 / 4,0

01 Ağustos 2010 - 01 Haziran 2016 (5 yıl 11 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
ECZACILIK FAKÜLTESİ, ECZACILIK PR.
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.69 / 4,0

01 Ağustos 2006 - 01 Haziran 2010 (3 yıl 11 ay)
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI İL MİLLÎ EĞİTİM MÜDÜRLÜKLERİ VE OKULLAR DENİZLİ
İLİNDEKİ OKULLAR İL MERKEZİNDEKİ OKULLAR DENİZLİ ERBAKIR FEN LİSESİ,
TÜRKİYE
Diploma Numarası: 90.54

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Mayıs 2016 - Şu Anda (3 yıl) (Tam Zamanlı)
UZMAN, GEN İLAÇ VE SAĞLIK ÜRÜNLERİ A.Ş.

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)