



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**ASTRAGALozİT IV'ÜN BİLATERAL  
KAVERNÖZ SİNİR HASARI SONRASINDA  
GELİŞEN EREKTİL DİSFONKSİYON  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Serhat SEVGİ

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Sabri Murat KESİM

TRABZON-2022



## BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

20.07.2022  
Serhat SEVGİ

## **İthaf**

*Doktora tezimi, destek ve hoşgörüsünü esirgemeyerek her zaman yanımda olan sevgili eşime ve varlıklarıyla bana güç veren kızım ve oğluma ithaf ediyorum.*



## TEŞEKKÜR

Tüm lisansüstü eğitim sürecinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, hiçbir zaman desteklerini benden esirgemeyen KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve tez danışmanım Prof. Dr. Sabri Murat KESİM'e,

Bilime bakışımıza yön vererek bizlere bu yolu açan KTÜ Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. F. Sena SEZEN'e,

Tez çalışmamın tüm aşamalarında hep yanımda olan sevgili çalışma arkadaşım Arş. Gör. İrem Ç. NALBANTOĞLU ve minik Berin'e,

KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Araştırma Laboratuvarı'nın kuruluşunda ve akademik donanım anlamında üzerimde büyük emekleri bulunan başta Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU olmak üzere Prof. Dr. Mine DUMAN KADIOĞLU ve Prof. Dr. Ersin YARIŞ hocalarıma,

Her türlü destek ve yardımları için KTÜ Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı ailesinden Dr. Öğr. Üyesi Yeşim KAYA YAŞAR, Dr. Öğr. Üyesi Elif Nur Barut, Dr. Öğr. Üyesi Seçkin ENGİN ve Arş. Gör. Elif Gün'e,

Astragalozit IV ile tanışmama vesile olan yüksek lisans tez danışmanım KTÜ Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gülin Renda'ya,

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU ve Prof. Dr. Engin YENİLMEZ'e,

Bu süreçte her zaman yanımda olan başta sevgili annem Müzeyyen SEVGİ ve sevgili babam Abdullah SEVGİ olmak üzere tüm geniş aileme,

Çalışmalarım boyunca hep yanımda olan sevgili eşim Ecz. Sezer SEVGİ ve canım yavrularım oğlum Mete SEVGİ ve kızım Bilge SEVGİ'ye,

Doktora tez çalışmamı destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP06, Proje kodu: TDK-2020-8749) ve doktora eğitimim süresince maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a (2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı) teşekkürlerimi sunarım.

Serhat SEVGİ

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                 | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ONAY                                                                                                            |       |
| BEYAN                                                                                                           |       |
| İthaf                                                                                                           |       |
| TEŞEKKÜR                                                                                                        |       |
| İÇİNDEKİLER                                                                                                     | vi    |
| TABLolar DİZİNİ                                                                                                 | ix    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                                                                                 | x     |
| RESİMLER DİZİNİ                                                                                                 | xiii  |
| KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ                                                                       | xiv   |
| ÖZET                                                                                                            | xvii  |
| ABSTRACT                                                                                                        | xviii |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ                                                                                                | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER                                                                                               | 3     |
| 2.1. Penil Doku                                                                                                 | 3     |
| 2.1.1. Penil Doku Anatomisi                                                                                     | 3     |
| 2.1.2. Penil Ereksiyon                                                                                          | 5     |
| 2.1.2.1. Ereksiyonun Santral ve Periferel Kontrolü                                                              | 6     |
| 2.1.2.2. Ereksiyonun Moleküler Fizyolojisi                                                                      | 7     |
| 2.2. Eretil Disfonksiyon                                                                                        | 11    |
| 2.2.1. Eretil Disfonksiyonun Tanımı ve Epidemiyolojisi                                                          | 11    |
| 2.2.2. Eretil Disfonksiyon için Risk Faktörleri                                                                 | 11    |
| 2.2.3. Eretil Disfonksiyonun Tedavisi                                                                           | 14    |
| 2.3. Radikal Prostatektomi                                                                                      | 16    |
| 2.3.1. Prostat Anatomisi ve Fizyolojisi                                                                         | 16    |
| 2.3.2. Prostat Kanseri ve Epidemiyolojisi                                                                       | 17    |
| 2.3.3. Radikal Prostatektomi ve Ürogenital Sistem Üzerindeki Etkileri                                           | 18    |
| 2.4. Radikal Prostatektomi ile İlişkili Eretil Disfonksiyon                                                     | 18    |
| 2.4.1. Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi                                                                           | 18    |
| 2.4.2. Kavernöz Sinir Hasarı ile İndüklenen Eretil Disfonksiyonun Patofizyolojisi                               | 19    |
| 2.4.3. TGF-β1/Smad Sinyal Yolağının Kavernöz Sinir Hasarı ile İndüklenen Kavernozal Fibrozis Gelişimindeki Rolü | 23    |

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4.4. Radikal Prostatektomi Sonrası Gelişen Eretil Disfonksiyon Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar | 28        |
| 2.5. Deneysel Eretil Disfonksiyon Modelleri                                                   | 32        |
| 2.5.1. Kavernöz Sinir Hasar Modelleri                                                         | 33        |
| 2.5.2. Eretil Fonksiyonun <i>İn vivo</i> Değerlendirilmesi                                    | 34        |
| 2.6. Astragalozit IV                                                                          | 35        |
| 2.6.1. Astragalozit IV'ün Kökeni ve Kimyasal Yapısı                                           | 35        |
| 2.6.2. Astragalozit IV'ün Farmakokinetik Özellikleri ve Güvenilirliği                         | 36        |
| 2.6.3. Astragalozit IV'ün Farmakolojik Profili                                                | 37        |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                                     | <b>41</b> |
| 3.1. Gereç                                                                                    | 41        |
| 3.1.1. Deney Hayvanları                                                                       | 41        |
| 3.1.2. Alet ve Cihazlar                                                                       | 41        |
| 3.1.3. Kullanılan Kimyasallar                                                                 | 43        |
| 3.1.4. Antikorlar                                                                             | 44        |
| 3.1.5. Kitler                                                                                 | 44        |
| 3.1.6. Çözelti ve Tamponlar                                                                   | 45        |
| 3.2. Yöntem                                                                                   | 45        |
| 3.2.1. BKSİ ile İndüklenen Deneysel ED Modeli                                                 | 47        |
| 3.2.1.1. Deney Grupları ve Protokolleri                                                       | 47        |
| 3.2.1.2. Bilateral Kavernöz Sinir Hasar Modelinin Oluşturulması                               | 48        |
| 3.2.2. Astragalozit Çözeltisinin Hazırlanması                                                 | 48        |
| 3.2.3. Cerrahi Sonrası Uygulamalar                                                            | 49        |
| 3.2.4. Eş zamanlı OAB ve İKB Ölçümü                                                           | 49        |
| 3.2.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Saklanması                                               | 52        |
| 3.2.6. Western Blot ile Moleküler Analizler                                                   | 53        |
| 3.2.6.1. Penil Doku Homojenizasyonu                                                           | 53        |
| 3.2.6.2. Total Protein Miktar Tayini                                                          | 53        |
| 3.2.6.3. Proteinlerin Denatürasyonu ve Örneklerin Hazırlanması                                | 53        |
| 3.2.6.4. Örneklerin Tatbiki ve SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi                                    | 54        |
| 3.2.6.5. Proteinlerin Membrana Transfer Edilmesi                                              | 54        |
| 3.2.6.6. Bloklama ve Yıkama                                                                   | 54        |
| 3.2.6.7. Primer Antikor ile İnkübasyon ve Yıkama                                              | 55        |

|                                                                                                                               |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.6.8. Sekonder Antikor ile İnkübasyon ve Yıkama                                                                            | 55         |
| 3.2.6.9. Görüntüleme                                                                                                          | 55         |
| 3.2.7. Histopatolojik İnceleme                                                                                                | 56         |
| 3.2.7.1. Fiksasyon ve Dehidratasyon                                                                                           | 56         |
| 3.2.7.2. Saydamlaştırma ve Deparafinizasyon                                                                                   | 56         |
| 3.2.7.3. Blok Hazırlama ve Kesit Alma                                                                                         | 56         |
| 3.2.7.4. Deparafinizasyon ve Boyama                                                                                           | 56         |
| 3.2.7.5. Mikroskopik İnceleme                                                                                                 | 57         |
| 3.3. İstatistiksel Analiz                                                                                                     | 57         |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                                                                            | <b>59</b>  |
| 4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlıkları ve Genel Durumlarının Değerlendirilmesi                                            | 59         |
| 4.2. Fonksiyonel Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi                                                                         | 60         |
| 4.2.1. Bazal İKB ve OAB Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi                                                                  | 60         |
| 4.2.2. 7 Günlük AS-IV Tedavisinin BKSH ile İndüklenen ED Üzerine Etkisi                                                       | 61         |
| 4.2.3. 14 Günlük AS-IV Tedavisinin BKSH ile İndüklenen ED Üzerine Etkisi                                                      | 64         |
| 4.3. Penil Doku Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi                                                                   | 68         |
| 4.3.1. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisinin TGF- $\beta$ 1 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi                                     | 68         |
| 4.3.2. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisinin pSmad2(Ser <sup>465/467</sup> ), Smad2 ve Smad3 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkisi | 70         |
| 4.3.3. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisinin Smad7 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi                                              | 73         |
| 4.3.4. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisinin Fibronektin Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi                                        | 73         |
| 4.4. Histopatolojik Değerlendirme                                                                                             | 76         |
| 4.4.1. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisi Ardından Histopatolojik Bulguların Mikroskopik İncelenmesi                               | 76         |
| 4.4.2. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisinin BKSH ile İndüklenen Histopatolojik Değişiklikler Üzerine Etkisi                       | 76         |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>                                                                                                   | <b>81</b>  |
| <b>6. KAYNAKLAR</b>                                                                                                           | <b>94</b>  |
| <b>EKLER</b>                                                                                                                  | <b>119</b> |
| EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi                                                                                                 | 120        |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                               | <b>122</b> |



## TABLÖLAR DİZİNİ

| Tablo No                                                                                                 | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Tablo 1.</b> Kullanılan alet ve cihazlar                                                              | 42    |
| <b>Tablo 2.</b> Kullanılan kimyasallar                                                                   | 43    |
| <b>Tablo 3.</b> Kullanılan primer ve sekonder antikorlar                                                 | 44    |
| <b>Tablo 4.</b> Kullanılan kitler                                                                        | 45    |
| <b>Tablo 5.</b> Kullanılan çözelti ve tamponlar                                                          | 45    |
| <b>Tablo 6.</b> Deney grupları ve tedavi protokolleri                                                    | 47    |
| <b>Tablo 7.</b> Deney protokolleri sonunda sıçan korpus kavernozumlarındaki fibrozisin değerlendirilmesi | 80    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil No  |                                                                                                                                                                                                         | Sayfa |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1.  | İnsan penis dokusunun transvers kesiti ve anatomik yapısı                                                                                                                                               | 3     |
| Şekil 2.  | İnsanda penil ereksiyonuna aracılık eden anatomik yapılar ve ereksiyonun fizyolojisi                                                                                                                    | 5     |
| Şekil 3.  | İnsan penis dokusunun nöronal inervasyonu                                                                                                                                                               | 8     |
| Şekil 4.  | Kavernozal düz kas hücre tonusunu düzenleyen hücre içi ve hücreler arası mekanizmalar                                                                                                                   | 10    |
| Şekil 5.  | Penil ereksiyon ve ED tedavisinde PDE5 inhibitörlerinin yeri                                                                                                                                            | 15    |
| Şekil 6.  | İnsan prostatının bölgesel anatomisi                                                                                                                                                                    | 16    |
| Şekil 7.  | İnsan (erkek) pelvisinin lateral görünümü ve prostatın anatomik yerleşimi                                                                                                                               | 17    |
| Şekil 8.  | Kavernöz sinir hasarı ardında kavernozal dokuda indüklenen bazı hücresel, moleküler ve yapısal değişiklikler                                                                                            | 22    |
| Şekil 9.  | TGF- $\beta$ 1/Smad (kanonikal) ve TGF- $\beta$ 1/non-Smad (non-kanonikal) aracılı fibroblast aktivasyonu sonucu indüklenen fibrotik süreçler                                                           | 26    |
| Şekil 10. | Fibrozisin ilerlemesi sırasında sıçan korpus kavernozumundaki a) normal görünüm, b) hafif derecede fibrozis, c) orta derecede fibrozis ve d) ileri derecede fibrozisi temsil eden morfolojik görüntüler | 28    |
| Şekil 11. | Astragalozit IV'ün kimyasal yapısı                                                                                                                                                                      | 36    |
| Şekil 12. | Astragalozit IV'ün TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağının farklı basamaklarındaki hedefleri                                                                                                               | 39    |
| Şekil 13. | Çalışma metodolojisi, kullanılan yöntemler ve iş akış şeması                                                                                                                                            | 46    |
| Şekil 14. | Deney protokolleri kapsamındaki a) 7 ve b) 14 günlük gruplara ait vücut ağırlık değişimleri                                                                                                             | 59    |
| Şekil 15. | Deney kapsamındaki a) 7 ve b) 14 günlük grupların 1, 4 ve 8 voltluk elektriksel stimülasyonlar öncesindeki bazal İKB (mmHg) değerleri                                                                   | 60    |

|                  |                                                                                                                                                             |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 16.</b> | Deney kapsamındaki a) 7 ve b) 14 günlük grupların 1, 4 ve 8 voltluk elektriksel stimülasyonlar sırasındaki OAB (mmHg) değerleri                             | 61 |
| <b>Şekil 17.</b> | 7 günlük protokol sonunda sıçanlarda KS'lerin 1 dk'lık 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonu sırasında kaydedilen İKB ve OAB değerleri               | 62 |
| <b>Şekil 18.</b> | 7 günlük gruplarda KS'lerin 1, 4 ve 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar sonucu edilen m-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması                    | 63 |
| <b>Şekil 19.</b> | 7 günlük gruplarda KS'lerin 1, 4 ve 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar sonucu edilen t-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması                    | 64 |
| <b>Şekil 20.</b> | 14 günlük protokol sonunda sıçanlarda KS'lerin 1 dk'lık 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonu boyunca kaydedilen İKB ve OAB değerleri                | 66 |
| <b>Şekil 21.</b> | 14 günlük gruplarda KS'lerin 1 volt, 4 volt ve 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar sonucu edilen m-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması         | 67 |
| <b>Şekil 22.</b> | 14 günlük gruplarda KS'lerin 1 volt, 4 volt ve 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar sonucu edilen t-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması         | 68 |
| <b>Şekil 23.</b> | Deney protokolleri kapsamında astragalozit IV tedavisinin sıçan penis dokusundaki TGF- $\beta$ 1 ekspresyon seviyelerine etkisinin değerlendirilmesi.       | 69 |
| <b>Şekil 24.</b> | Deney protokolleri kapsamında AS-IV tedavisinin sıçan penis dokusundaki Smad2 ve Smad3 ekspresyon seviyelerine etkisinin değerlendirilmesi                  | 71 |
| <b>Şekil 25.</b> | Deney protokolleri kapsamında AS-IV tedavisinin sıçan penis dokusundaki pSmad2(Ser <sup>465/467</sup> ) ekspresyon seviyelerine etkisinin değerlendirilmesi | 72 |
| <b>Şekil 26.</b> | Deney protokolleri kapsamında AS-IV tedavisinin sıçan penis dokusunda Smad7 ekspresyon seviyelerine etkisinin değerlendirilmesi                             | 74 |

- Şekil 27.** Deney protokolleri kapsamında AS-IV tedavisinin sıçan penis dokusundaki fibronektin ekspresyon seviyelerine etkisinin değerlendirilmesi 75
- Şekil 28.** Protokoller sonunda deney gruplarındaki sıçanların korpus kavernozumlarındaki a) bağ doku/kolajen artışı ve b) düz kas kaybının değerlendirilmesi 79



## RESİMLER DİZİNİ

| Resim No                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Resim 1.</b> Sıçan penis dokusunun enine kesiti ve histomorfometrik görünümü.<br>a) Korpus kavernozum ve b) Korpus spongiozum toplam alanı.                                                                                                                                                                                                                                          | 4     |
| <b>Resim 2.</b> Çalışmalarda kullanılan deney hayvanı kafes kartı örneği                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 41    |
| <b>Resim 3.</b> BKSH modelinin oluşturulması. a) Diseksiyon tablasındaki supin pozisyonu, b) MPG ve KS'in tespiti, c) Operasyon bölgesinin şematik gösterimi, d) Sol KS'nin <i>crush</i> işlemi öncesi hemostat klemp ile sabitlenmesi, e) Abdominal insizyon bölgesinin cerrahi sütür ile kapatılması.                                                                                 | 49    |
| <b>Resim 4.</b> Sol karotid arterden <i>in vivo</i> OAB ölçülmesi. a) Supin pozisyonu, b) Boyun derisi ve kaslarının insizyonunun şematik gösterimi, c) Sol karotid arterin tespiti ve kraniyal ucunun ligasyonu, d) 22-G enjektör ucu ile karotid artere girilmesi, e) PE-50 kanülün karotid artere yerleştirildikten sonra sabitlenmesi.                                              | 51    |
| <b>Resim 5.</b> <i>In vivo</i> İKB ölçümü. a) Alt abdominal insizyonun temsili gösterimi, b) Sol KS'nin tespiti, c) Serbestleştirilmiş penil doku, d) İskiokavernöz kasın eliminasyonu sonrası <i>tunica albuginea</i> ile sarılı olan sağ korpus kavernozumun tespiti, e) PE-50 kanülün korpus kavernoza yerleştirilmesi, f) Elektriksel stimülasyon sırasında İKB ölçümünün alınması. | 52    |
| <b>Resim 6.</b> 7 günlük protokole ait sıçan penis kesitlerinin histopatolojik görünümü                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 77    |
| <b>Resim 7.</b> 14 günlük protokole ait sıçan penis kesitlerinin histopatolojik görünümü                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 78    |

## KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

### Kısaltmalar

|                       |                                    |
|-----------------------|------------------------------------|
| <b>ACh</b>            | Asetilkolin                        |
| <b>ALK</b>            | Aktivin reseptör-like kinaz        |
| <b>AMP</b>            | Adenozin monofosfat                |
| <b>AS-IV</b>          | Astragalozit IV                    |
| <b>ATP</b>            | Adenozin trifosfat                 |
| <b>A-II</b>           | Anjiotensin-II                     |
| <b>BAP</b>            | Bilimsel Araştırma Projesi         |
| <b>BKSH</b>           | Bilateral kavernoöz sinir hasarı   |
| <b>cAMP</b>           | Siklik adenozin monofosfat         |
| <b>cGMP</b>           | Siklik guanozin monofosfat         |
| <b>Co-Smad</b>        | Common-partner Smad                |
| <b>DAG</b>            | Diaçilgliserol                     |
| <b>dk</b>             | Dakika                             |
| <b>DM</b>             | Diyabetes mellitus                 |
| <b>DMSO</b>           | Dimetil sülfoksit                  |
| <b>DNA</b>            | Deoksiribonükleik asit             |
| <b>ED</b>             | Eretil disfonksiyon                |
| <b>EF</b>             | Eretil fonksiyon                   |
| <b>ET<sub>1</sub></b> | Endotelin 1                        |
| <b>eNOS</b>           | Endotelyal nitrik oksit sentaz     |
| <b>ESM</b>            | Ekstraselüler matriks              |
| <b>GGF</b>            | Glial büyüme faktörü               |
| <b>GMP</b>            | Guanozin monofosfat                |
| <b>g</b>              | Gram                               |
| <b>GTP</b>            | Guanozin trifosfat                 |
| <b>HT</b>             | Hipertansiyon                      |
| <b>i.p.</b>           | İntraperitoneal                    |
| <b>İKB</b>            | İntra kavernoöz basınç             |
| <b>iNOS</b>           | İndüklenebilir nitrik oksit sentaz |
| <b>I-Smad</b>         | İnhibitör Smad                     |

|                                    |                                     |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>IP3</b>                         | İnositol trifosfat                  |
| <b>kDa</b>                         | Kilodalton                          |
| <b>kg</b>                          | Kilogram                            |
| <b>kHz</b>                         | Kilohertz                           |
| <b>KS</b>                          | Kavernöz sinir                      |
| <b>KTÜ</b>                         | Karadeniz Teknik Üniversitesi       |
| <b>l</b>                           | Litre                               |
| <b>LAP</b>                         | Latency Associated Peptide          |
| <b>LTBP</b>                        | Latent TGF- $\beta$ Binding Protein |
| <b>m</b>                           | Metre                               |
| <b>MA</b>                          | Molekül ağırlığı                    |
| <b>MAPK</b>                        | Mitojenle aktive olan protein kinaz |
| <b>MHZK</b>                        | Miyozin hafif zincir kinaz          |
| <b>MH1</b>                         | N-terminal mad homology 1           |
| <b>MH2</b>                         | N-terminal mad homology 2           |
| <b>mİKB</b>                        | Maksimum intrakavernöz basınç       |
| <b>ml</b>                          | Mililitre                           |
| <b>mmHg</b>                        | Milimetre civa                      |
| <b>M</b>                           | Molar                               |
| <b>MPG</b>                         | Majör pelvik gangliyon              |
| <b>MPOA</b>                        | Medial preoptik alan                |
| <b>mRNA</b>                        | Messenger ribonükleik asit          |
| <b>MTB</b>                         | Masson trikrom boyama               |
| <b>NA</b>                          | Noradrenalin                        |
| <b>NANK</b>                        | Nonadrenerjik nonkolinerjik         |
| <b>NF-<math>\kappa\beta</math></b> | Nükleer faktör kappa $\beta$        |
| <b>nNOS</b>                        | Nöronal nitrik oksit sentaz         |
| <b>NO</b>                          | Nitrik oksit                        |
| <b>NOS</b>                         | Nitrik oksit sentaz                 |
| <b>OAB</b>                         | Ortalama arteriyel basınç           |
| <b>PDE</b>                         | Fosfodiesteraz                      |
| <b>PGE</b>                         | Prostaglandin E                     |
| <b>PE-50</b>                       | Polietilen-50                       |

|                        |                                             |
|------------------------|---------------------------------------------|
| <b>PKC</b>             | Protein kinaz C                             |
| <b>PKG</b>             | Protein kinaz G                             |
| <b>pSmad</b>           | Fosforillenmiş Smad                         |
| <b>RP</b>              | Radikal prostatektomi                       |
| <b>R-Smad</b>          | Reseptor-Regulated Smad                     |
| <b>SARA</b>            | Smad Anchor For Receptor Aktivasyon         |
| <b>SF</b>              | Serum fizyolojik                            |
| <b>sGC</b>             | Çözünebilir guanilat siklaz                 |
| <b>SSH</b>             | Sonic hedgehog                              |
| <b>Smad</b>            | Small mothers against decapentaplegic       |
| <b>sn</b>              | Saniye                                      |
| <b>SSS</b>             | Santral sinir sistemi                       |
| <b>TAK-1</b>           | TGF-β aktivating kinase 1                   |
| <b>TGF-β</b>           | Transforming growth factor-beta             |
| <b>TÜBİTAK</b>         | Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu |
| <b>VIP</b>             | Vazoaktif intestinal polipeptid             |
| <b>VOD</b>             | Venooklüzif disfonksiyon                    |
| <b>Formüller</b>       |                                             |
| <b>Ca<sup>+2</sup></b> | Kalsiyum iyonu                              |
| <b>K<sup>+</sup></b>   | Potasyum iyonu                              |
| <b>NaCl</b>            | Sodyum klorür                               |
| <b>Simgeler</b>        |                                             |
| <b>α</b>               | Alfa                                        |
| <b>β</b>               | Beta                                        |
| <b>δ</b>               | Delta                                       |
| <b>γ</b>               | Gama                                        |
| <b>κ</b>               | Kappa                                       |



## ÖZET

### **Astragalozit IV' ün Bilateral Kavernöz Sinir Hasar Modeli Sonrasında Gelişen Erektile Disfonksiyon Üzerine Etkileri**

Prostat kanseri yetişkin erkeklerde en sık görülen neoplazilerdendir. Tümöral dokunun rezeksiyonu amacıyla uygulanan radikal prostatektomi (RP) sırasında kavernöz sinir (KS)'lerin hasarlanması sıklıkla erektile disfonksiyon (ED) ile sonuçlanmaktadır. RP ile ilişkili ED, travmaya bağlı KS dejenerasyonu sonrası kavernozal düz kas kaybı ve fibrozis gibi morfolojik değişikliklerle karakterize iyatrojenik bir komplikasyondur. TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı kavernozal fibrozisi indükleyen ana mekanizmalardan biridir. Çalışmanın amacı birçok dokuda TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal inhibisyonu aracılı antifibrotik özellikleri gösterilen astragalozit IV (AS-IV)'ün RP ile ilişkili ED üzerindeki olası terapötik etkilerini bilateral kavernöz sinir hasar (BKSH) modeli kullanarak incelemektir. Çalışmada 72 adet Sprague-Dawley erkek sıçan (8-10 haftalık) kullanıldı. Sham ve BKSH modeli sonrasında, deney gruplarına (n=6) 7 ve 14 günlük protokoller boyunca 1 mg/kg/gün AS-IV, 5 mg/kg/gün AS-IV veya taşıyıcı intraperitoneal (i.p.) uygulandı. Protokolleri takiben eş zamanlı intrakavernozal basınç (İKB) ve ortalama arteriyel basınç (OAB) ölçüldü; maksimum-İKB/OAB (m-İKB/OAB) ve total-İKB/OAB (t-İKB/OAB) oranları erektile fonksiyon (EF) ölçütü olarak değerlendirildi. Kavernozal doku histopatolojisi Masson Trikrom yöntemiyle incelenirken; TGF- $\beta$ 1, fibronektin, pSmad2, Smad2, Smad3 ve Smad7 protein ekspresyonlarındaki değişiklikler Western Blot yöntemiyle değerlendirildi. Her iki protokolde de BKSH gruplarındaki m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB kontrol gruplarına göre anlamlı azaldı. EF'deki düşüş 14 günlük 1 mg/kg ve 5 mg/kg AS-IV tedavileriyle anlamlı önleildi. BKSH gruplarında TGF- $\beta$ 1, fibronektin, pSmad2 ekspresyonları ve pSmad2/Smad2 oranı kontrol gruplarına göre anlamlı artarken, Smad7 seviyeleri anlamlı azaldı. AS-IV tedavisi TGF- $\beta$ 1, fibronektin ekspresyonlarındaki artışı ve azalan Smad7 ekspresyonunu her iki protokolde de doz bağımlı şekilde anlamlı önlerken, pSmad2/Smad2 oranı sadece 5 mg/kg dozunda kontrole yakın anlamlı bulundu. BKSH ile indüklenen kavernozal fibrozis ise sadece 14 günlük 5 mg/kg AS-IV tedavisiyle anlamlı önleildi. Sonuç olarak; AS-IV'ün BKSH ile indüklenen ED üzerindeki koruyucu etkisi, TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal transdüksiyonunu engelleyerek gösterdiği antifibrotik özellikleriyle ilişkilendirilmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Erektile disfonksiyon, Fibrozis, Kavernöz sinir hasarı, TGF- $\beta$ 1/Smad

## ABSTRACT

### **Effects of Astragaloside IV on Erectile Dysfunction Following Bilateral Cavernous Nerve Injury Model**

Prostate cancer is one of the most prevalent neoplasia seen in adult men. Injury of cavernous nerves (CN) during radical prostatectomy (RP) performed for resection of tumoral tissue frequently results in erectile dysfunction (ED). ED associated with RP is an iatrogenic complication characterized by penile tissue morphological changes such as cavernosal smooth muscle loss and fibrosis after trauma-induced CN degeneration. TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway is one of the main mechanisms causing cavernosal fibrosis. The aim of study is to examine the possible therapeutic effects of astragaloside IV (AS-IV), which has been shown antifibrotic properties mediated by TGF- $\beta$ 1/Smads signal inhibition in many tissues, on ED associated with RP using bilateral cavernous nerve injury (BCNI) model. Sprague-Dawley 72 male rats (8-10 weeks) were used in this experiment. Following Sham and BCNI models, the experimental groups were treated with 1 mg/kg/day AS-IV, 5 mg/kg/day AS-IV or vehicle intraperitoneally (i.p.) for 7 and 14 days protocols. At the end of the protocols, intracavernous pressure (ICP) and mean arterial pressure (MAP) were measured simultaneously; maximum-ICP/MAP (m-ICP/MAP) and total-ICP/MAP (t-ICP/MAP) were evaluated as degree of erectile function (EF). While histopathology of cavernosal tissue was examined by masson trichrome method, changes in TGF- $\beta$ 1, fibronectin, pSmad2, Smad2, Smad3 and Smad7 protein expressions levels were evaluated by Western Blot method. In both protocols, m-ICP/MAP and t-ICP/MAP significantly decreased in BCNI groups compared to control groups. 14 days of 1 mg/kg and 5 mg/kg AS-IV treatments significantly prevented the decrease in EF. TGF- $\beta$ 1, fibronectin, pSmad2 expressions and pSmad2/Smad2 ratio were significantly increased in BCNI groups compared to control groups, however Smad7 levels were significantly decreased. While AS-IV treatment significantly prevented the increase in TGF- $\beta$ 1, fibronectin and the decrease in Smad7 expressions in a dose-dependent manner in both protocols, pSmad2/Smad2 ratio was significantly found to be close to the control only at 5 mg/kg dose. Cavernosal fibrosis induced by BCNI model were significantly hindered by only 14 days of 5 mg/kg AS-IV treatment. As a result, the protective effect of AS-IV on BCNI induced ED is associated with its antifibrotic properties by inhibiting TGF- $\beta$ 1/Smads signal transduction.

**Keywords:** Cavernous nerve injury, Erectile dysfunction, Fibrosis, TGF- $\beta$ 1/Smads

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Prostat kanseri erkeklerde orta-ileri yaşlarda ortaya çıkan ve yaygın görülen metastatik bir hastalıktır (1). Tümör dokusunun eradikasyonu amacıyla uygulanan radikal prostatektomi (RP) non-metastatik prostat kanserli hastalarda oldukça sık kullanılan etkin bir standart tedavidir (2). Cerrahi tekniklerdeki gelişmelere rağmen manipülasyon alanının ürogenital sistemle ilişkili nörovasküler paketlerce yoğun ve dar bir bölgede bulunması, işlem sırasında erektil dokuyu inerve eden kavernoöz sinir (KS)'lerin çeşitli nedenlerle hasarlanmasına ve erektil disfonksiyon (ED) gelişimine neden olmaktadır (3, 4). Epidemiyolojik verilerde RP sonrası bireylerin önemli bir kısmında (%10-90) ED geliştiği bildirilmiştir (5-7).

Peniste erektil fonksiyon (EF)'den sorumlu olan sinüzoidal yapıdaki korpus kavernozumlar; endotel, düz kas ve fibroblast gibi farklı hücre tiplerinden oluşmaktadır (8). Cinsel uyarılar ile indüklenen penil ereksiyon; KS'ler ile iletilen parasempatik stimülasyon aracılı arteriyel dilatasyon, kavernoza düz kas gevşemesi ve venöz oklüzyon sonucu gelişen bir süreçtir (9). Ereksiyonun etkin bir şekilde başlaması, sürdürülmesi ve sonlanması için kavernoöz dokudaki vasküler yapıların, sinir inervasyonunun ve sinüzoidal histolojik yapının sağlıklı olması gerekmektedir.(9, 10).

RP ile ilişkili ED patogeneğinde KS'lerin hasarı sonrasında nöronal mikro çevrede oluşan lokal inflamatuvar yanıtlar, nöronal apoptozis, nöronal nitrik oksit sentetaz (nNOS) ekspresyonunun azalması ve/veya inaktivasyonu önemli yere sahiptir (11, 12). RP ile ilişkili ED'de kavernoza dokuda endotelial nitrik oksit sentetaz-nitrik oksit/siklik guanozin monofosfat (eNOS-NO/cGMP) yolağının inhibisyonu ve *transforming growth faktör-β1* (TGF-β1)/Smad sinyal yolağı aktivasyonunun rol oynadığı bilinmektedir (11-14). KS'lerin kısmi rejenerasyon kapasitesi göz önünde bulundurulduğunda, inervasyon eksikliğine bağlı hipoksik süreç kavernoöz dokuda düz kas hasarını ve ekstraselüler matriks (ESM) proteinlerinin birikimi ile karakterize olan fibrozisi indükler (15-18). Kavernoöz dokuda meydana gelen irreversibl değişiklikler sonucu elastikiyetin azalması ve venöz sızıntılara bağlı olarak ED gelişmektedir (15, 17, 18).

TGF-β1 fibrotik süreçlerin regülasyonunda kritik öneme sahiptir, bu nedenle fibrozis için önemli bir terapötik hedef olarak kabul edilmektedir (19, 20). TGF-β1 kanonikal (Smad bağımlı) ve kanonikal olmayan (Smad bağımsız) yollar aracılığıyla fibrozisi indükler (21). Aktive olan TGF-β1, tip-2 TGF-β1 (TβR-2) ve tip-1 TGF-β1 (TβR-1) transmembranal

serin/treonin protein kinaz reseptörleri üzerinden yolağın sinyal düzenleyicilerinden olan sitoplazmik Smad2 ve Smad3 moleküllerinin aktivasyonunu (fosforilasyonunu) indükler. Ardından Smad4 ile kompleks oluşturan pSmad2/3 nükleusa geçerek transkripsiyon faktörü gibi davranır. Smad7 ise yolağı inhibe eder (20-22). KS hasarına bağlı nöronal dejenerasyon sonrası artan TGF- $\beta$ 1/Smad yolağının aktivasyonu profibrotik süreçlerle ilgili genetik ekspresyonları düzenleyerek kavernoza fibroziste etkin rol oynamaktadır (23).

Astragalozit IV (AS-IV) Çin tıbbında birçok klinik durumda yaygın kullanılan, biyoyarlanımı düşük, etkin ve güvenilir bir bitkisel bileşiktir (24). Literatürde mevcut bilimsel çalışmalarda AS-IV'ün nörorejeneratif, nöroprotektif, antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik özellikleri bildirilmiştir (24-26). Ayrıca başta TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı inhibisyonu olmak üzere çeşitli mekanizmalarla kardiyak, pulmoner, renal ve hepatik fibrozis gelişimini önleyebileceğini gösteren birçok prelinik çalışma bulunmaktadır (27-30).

RP ile ilişkili ED, cinsel yaşam kalitesini etkileyen önemli psikososyal sorunlara yol açması ve mevcut tedavilerin etkinliğinin sınırlı olması nedeniyle önemli bir sosyoekonomik yük oluşturmaktadır (4, 6). Patofizyolojisinin multifaktöriyel bir süreç olması ve bu patolojilere ilişkin birçok mekanizmanın aydınlatılamamış olması ise rasyonel tedavi yaklaşımlarını sınırlandırmaktadır (18). Kavernoza doku mimarisindeki irreversibl hasar ile EF arasındaki ilişki göz önünde bulundurulduğunda RP ile ilişkili ED tedavisindeki en önemli rasyonel terapi seçeneklerinin nöroprotektif/rejeneratif tedavilerden ziyade erken dönemde gelişen fibrozisi önlemeye odaklı yaklaşımlar olabileceği düşünülmektedir (31).

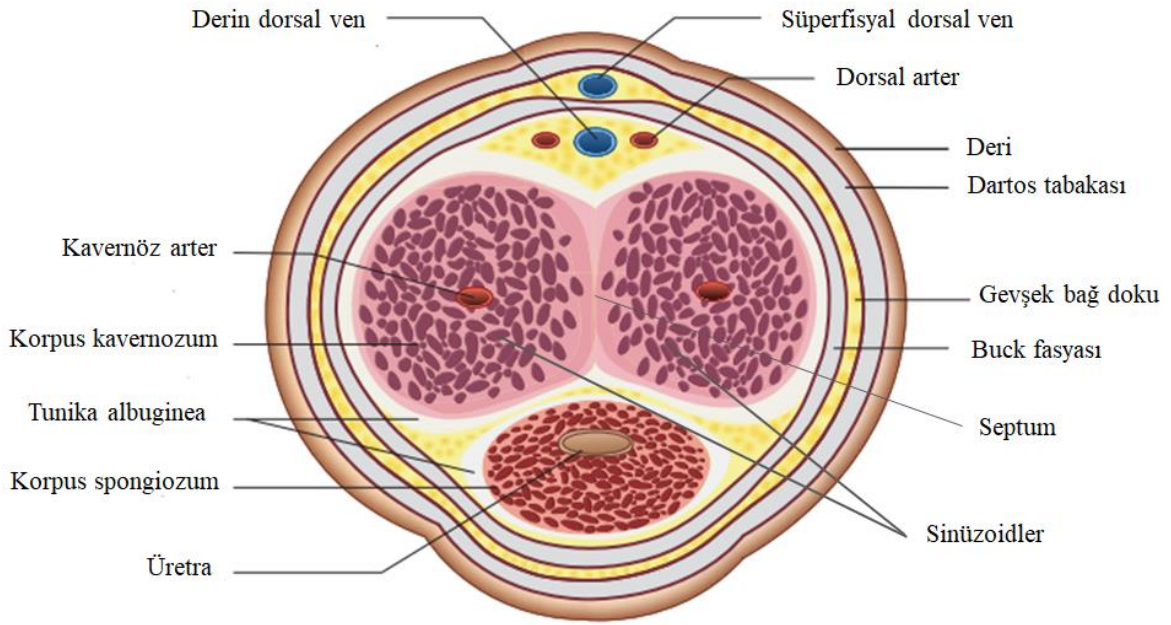
Çalışmanın amacı sıçanlarda indüklenen bilateral kavernöz sinir hasar (BKSH) modelinde AS-IV'ün EF ve kavernöz dokudaki fibrozis üzerine etkilerinin fonksiyonel, histolojik ve moleküler yöntemlerle değerlendirilmesidir. Bu kapsamda BKSH modeli uygulanan sıçanlara 7 veya 14 gün boyunca AS-IV tedavisi uygulanarak a-) eş zamanlı in vivo intrakavernoza basınç (İKB) ve ortalama arteriyel basınç (OAB) ölçümü ile EF'nin değerlendirilmesi, b-) penil dokudan elde edilen kesitlerin histopatolojik incelemesi ve c-) fibrotik süreçleri indükleyen TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3 ve pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>); fibröz belirteci olan fibronektin ile yolağın endojen inhibitörü olan Smad7 protein düzeylerinin Western Blot yöntemi ile semi-kantitatif değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Araştırma sonuçlarının, AS-IV'ün RP ile ilişkili ED tedavisinde yeni bir terapötik ajan olarak değerlendirilmesine katkı sağlayacağı ve daha ileri araştırmalar için ön veriler sunacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Penil Doku

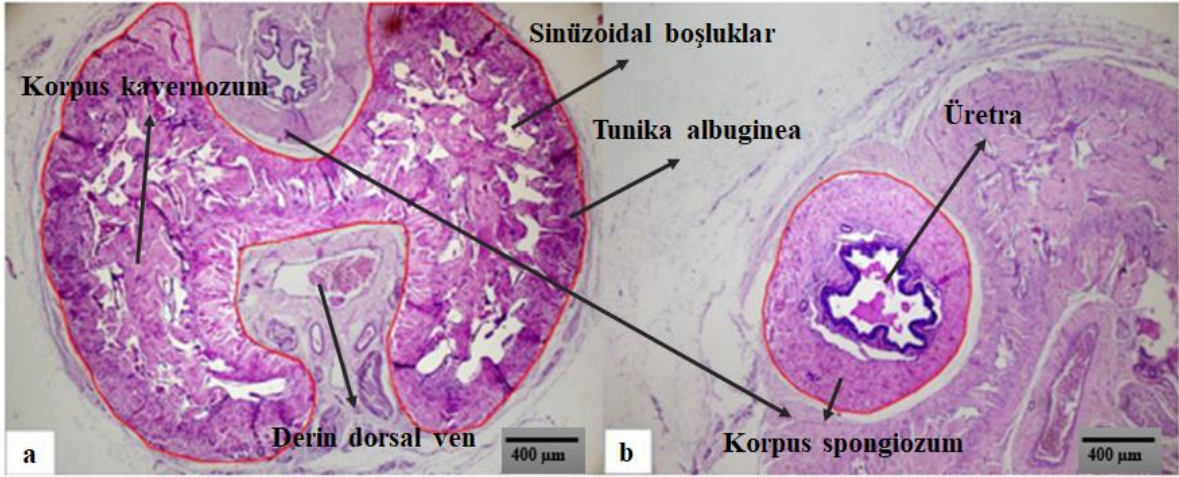
#### 2.1.1. Penil Doku Anatomisi

Penis eksternal bir erkek genital organı olup, distal ucu glans penis olarak adlandırılır. İnsanda anatomik olarak penisi çevreleyen katmanlar dıştan içe doğru; deri, fasya tabakası ve *tunica albuginea* şeklinde sıralanmaktadır (32). Penis *tunica albuginea* orjinli bir septum ile birbirinden ayrılan korpus kavernozum ve korpus spongiozum olmak üzere iki farklı silindirik yapıdan oluşmaktadır. Korpus kavernozum; ağ şeklindeki elastik liflerle çevrelenmiş, endotel içeren sinüzoidal düz kas yapısındadır. Korpus spongiozum ise ventralde üretrayı saracak şekilde glans penisi oluşturur (Şekil 1) (9, 32, 33).



**Şekil 1.** İnsan penis dokusunun transvers kesiti ve anatomik yapısı (Rehfeld'den, 32)

Kemirgenlerde korpus kavernozum tabakası integral bir yapıya sahiptir. Glans penis yerine os penis adı verilen kemiksi bir doku yer alır (34). Sıçan penis dokusunun enine kesiti ve anatomik yapıları Resim 1'de gösterilmiştir (35).



**Resim 1.** Sıçan penis dokusunun enine kesiti ve histomorfometrik görünümü. a) Korpus kavernozum ve b) Korpus spongiozum toplam alanı (Correa'dan, 35)

Büyük ve düzensiz vasküler sinüzoidleri içeren korpus kavernozum dokuları septum ile ayrılmış olmasına rağmen bütünleşik fonksiyon gösterir. Hücreler arası iyon geçişini sağlayan konneksin-43 proteini aracılığıyla eş zamanlı kasılıp gevşeyen kavernözal düz kas hücreleri histomorfometrik olarak değerlendirildiğinde flasid haldeki penil doku kesit alanının (enine) yaklaşık yarısını (%40-52) oluşturmaktadır (36-38).

*Tunica albuginea*, penise esneklik ve dayanıklılık sağlamak üzere düzensiz dağılım gösteren kolajen içeren liflerden oluşan çift katmanlı fibroelastik bir tabakadır. Ereksiyon sırasında basınçla genişleyen *tunica albuginea*, emisser venleri sıkıştırarak EF'ye katkı sağlar (39). *Tunica albuginea* kavernoza dokuları dış kısmında vertikal şekilde çevrelerken iç kısmında ise sirküler yapı ile erektile dokunun ana iskeletini oluşturur (40). *Tunica albuginea* glans penis üzerinde bulunmaz. Korpus spongiozum üzerinde ise oldukça incedir. Bu nedenle ereksiyon sırasında bu dokulardaki basınç İKB'nin ancak %35-50'si kadar olabildiğinden, korpus spongiozumun ereksiyona olan katkısı ihmal edilebilir. Bu durum ereksiyon sırasında üretra üzerindeki baskıyı azaltmaktadır (9, 40).

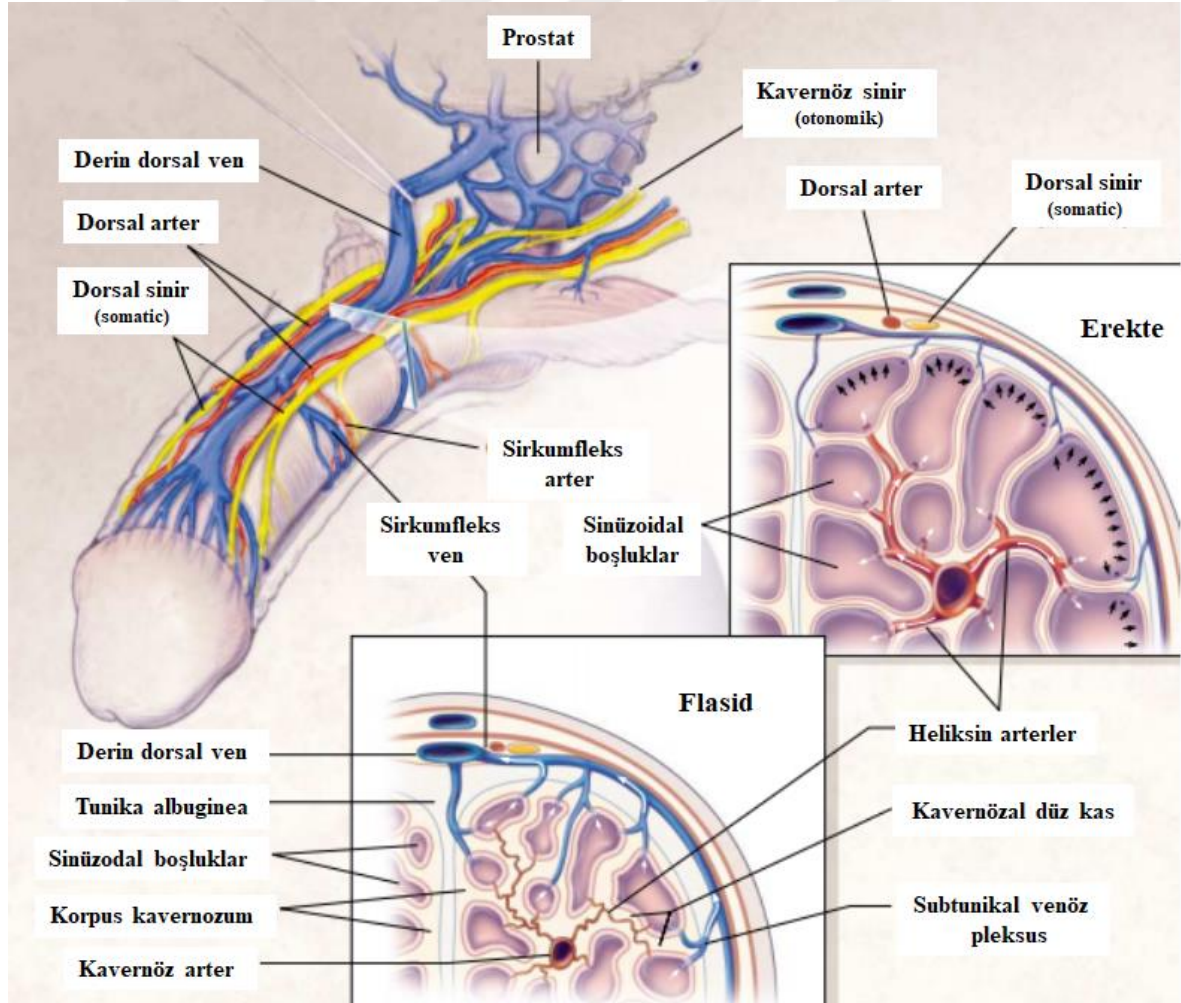
Erektile dokunun perfüzyonu bulbo-üretral arter, dorsal arter ve kavernöz arter olmak üzere dallanan ve bilateral seyreden penil arter tarafından sağlanır (36, 41). Bulbo-üretral arterler; posterolateral kenardan girerek korpus spongiozum, glans penis ve üretranın perfüzyonunu sağlarken, dorsal arterler korpus spongiozum ve glans penisin kanlanmasına katkıda bulunur (42). Penis hilumu yakınından korpus kavernozumlara giren kavernöz arterler ise trabeküler boşluklara direkt açılan heliksin arterleri oluşturarak korpus



kavernozumları perfüze ederler (36, 42). Korpus spongiosum ve korpus kavernozumların drenajını sağlayan sirkumfleks venler korpus kavernozumlar etrafında ilerlerken emisser venler ile birleşerek preprostatik pleksus aracılığıyla derin dorsal vene bağlanırlar. Subtunikal venöz pleksustan çıkan diğer emisser venler ise dorsomedial tarafta internal pudental vene bağlanarak penil doku drenajına katkıda bulunan kavernöz venleri oluştururlar (43, 44).

### 2.1.2. Penil Ereksiyon

Penil ereksiyon, seksüel uyarı ile indüklenen santral ve periferik sinir stimülasyonu sonucu lokal mediyatörler ve vasküler mekanizmaların aracılık ettiği fizyolojik bir fonksiyondur (Şekil 2) (35, 45).



**Şekil 2.** İnsanda penil ereksiyona aracılık eden anatomik yapılar ve ereksiyonun fizyolojisi (Correa'dan, 35)

Flasid durumdaki peniste, sempatik stimölasyon ile kavernoöz arterler ve düz kaslar bazal bir tonusa sahiptir. Bu durumda arterlerde vasküler direnç artmış olmasına rağmen venöz drenaj devam ettiğinden İKB değeri 35 mm Hg civarında seyretmektedir (9, 46). Tümesans fazında parasempatik inervasyon ile indüklenen vazodilatasyon sonucu kavernoza dokudaki arter ve arteriyollerde direnç azalır, kan akımı artar (36). Subtunikal venöz pleksusun *tunica albuginea* ve sinüzoidler arasında sıkışmasıyla venöz drenaj azalır. Oluşan veno-okluzyon sırasında *tunica albugineanın* gerimi artar ve İKB değeri yaklaşık 100 mmHg'ye ulaşır. Bulbokavernoza refleksin tetiklenmesi ile iskiokavernoza kaslar kanlanması artan korpus kavernozaumların tabanını kuvvetli bir şekilde sıkıştırır ve penis erekte hale gelir. Bu aşamada erektile dokunun perfüzyonu geçici olarak durur (9, 41). Detümesans fazında ise sempatik aktivasyonun etkisiyle arteriyel kan akımı azalırken, kavernoza düz kas kontraksiyonu ve venöz drenaj artmaya başlar; sinüzoidal hacim azalır ve ereksiyon sonlanır (9, 36, 47).

#### **2.1.2.1. Ereksiyonun Santral ve Periferale Kontrolü**

Santral sinir sistemi (SSS)'nin erektile doku üzerindeki ana kontrol merkezi olduğu bilinse de konuya ait klinik veriler kısıtlıdır. Preklinik çalışmalarda SSS'deki bazı merkezlerdeki dopaminerjik, oksitosinerjik, nitrerjik ve melanokortinerjik sistemlerin ereksiyonun düzenlenmesindeki etkileri kısmen de olsa aydınlatılmıştır (48, 49). Beyin ve omuriliğin farklı alanlarında yayılım gösteren bu bölgelerdeki travmalar, hemorajiler ve tümörler; alzheimer, parkinson ve multiple skleroz gibi hastalıklar ED gelişimine sebep olabilmektedir (50).

Ereksiyonun SSS temelli regölasyonunda oksitosinerjik ve dopaminerjik sistemlerin çok büyük bir önemi olduğu düşünölmekte olup klinikte dopaminerjik sistemin önemli uyarılarından olan apomorfın, levodopa ve bromokriptin uygulamalarının ereksiyonu indüklediği görölmektedir (49). Ayrıca santral noradrenerjik aktivasyonunun ereksiyonu indüklediği, seratonerjik sistemin ise reseptör alt tiplerine bağılı olarak EF'yi inhibe ettiği bilinmektedir (33).

Erektile süreçlerden sorumlu olduğu düşünölen ve üzerinde en fazla preklinik çalışma bulunan santral merkezler; başta hipotalamusta yer alan mediyale preoptik alan (MPOA) ve paraventriküler alan (PVA) olmak üzere amigdala, hipokampus, beyin sapındaki paragigantoselölaris çekirdek, lokus seruleus, ventrale tegmental alan, ventrale sibikulum ve spinal korddur. PVA'da yaygın bir projeksiyona sahip oksitosinerjik nöronların NMDA gibi



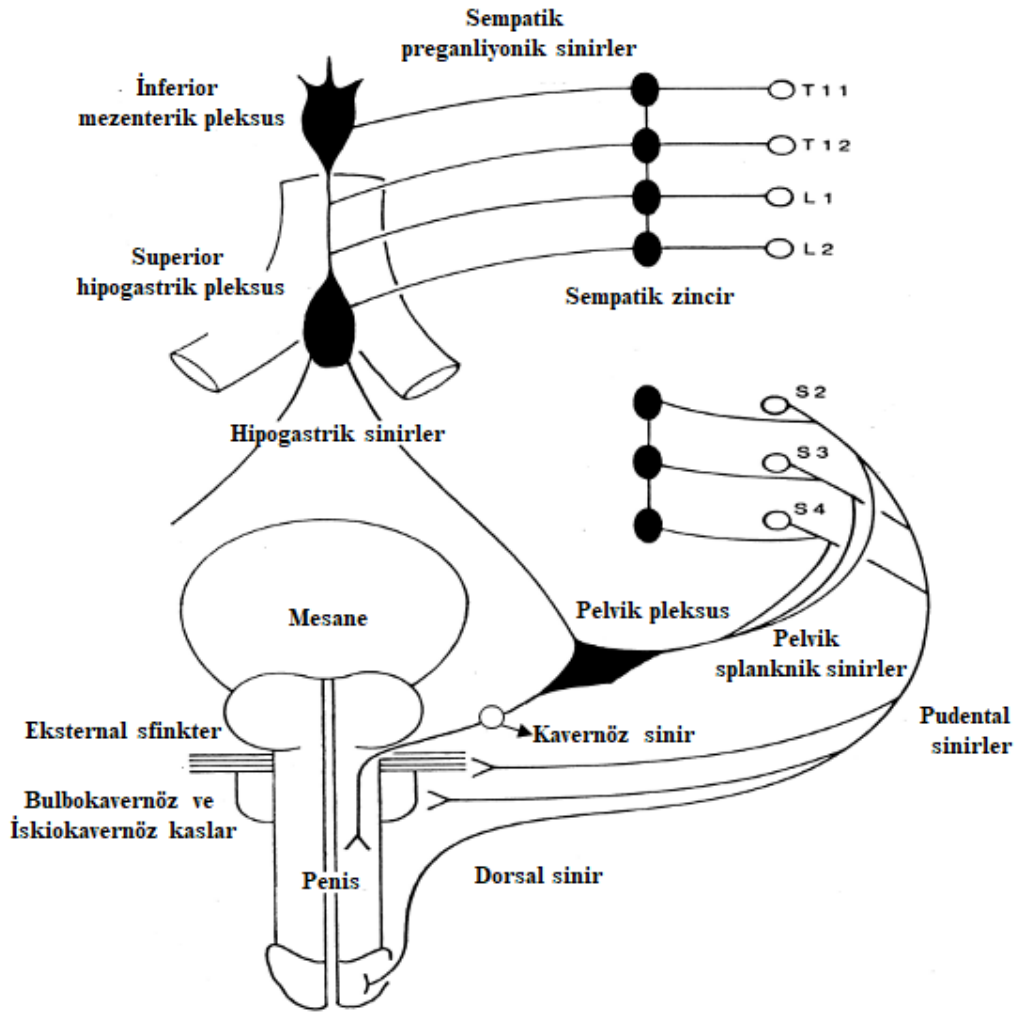
eksitator amino asitler, apomorfin, oksitosin ve dopamin agonistleri tarafından uyarılması penil ereksiyonu indüklemektedir (51-53). PVN'deki oksitosinerjik nöronlar üzerinden ereksiyonu indükleyen diğer bileşikler; kannabinoid CB<sub>1</sub> reseptör antagonistleri, NO (özellikle MPOA ve PVN), büyüme hormonu salgılatıcı peptid ve heksarelinin peptid analogları gibi ajanlardır. GABA ve agonistleri, opioid peptidler, morfin ve diğer opiyatlar ise ereksiyonu inhibe etmektedir (53). Ereksiyonun düzenlenmesinde PVA'daki ana proerektıl nörotransmitterler olduğu vurgulanan dopamin ve oksitosin benzer şekilde aynı etkiyi MPOA'daki oksitosinerjik nöronlar üzerinden de göstermektedir (48, 53). Ayrıca dopamin ve agonistlerinin penil ereksiyona D<sub>2</sub> reseptörü üzerinden santral aracılı katkılarının olduğu da bilinmektedir (49).

Penil doku direkt/indirekt olarak somatik, sempatik, parasempatik ve nonadrenerjik nonkolinerjik sinirlerle inerve edilmektedir. Penil dokuyu inerve etmek üzere T<sub>11</sub>-L<sub>2</sub> segmentlerinden çıkan sempatik preganliyonik sinirler süperior hipogastrik pleksustan sonra sağ-sol inferior hipogastrik pleksuslara (pelvik pleksus) ulaşır (41). Spinal kordun S2-S4 segmentlerinden çıkan pregangliyonik parasempatik lifler de pelvik splanknik sinirler aracılığıyla benzer şekilde pelvik pleksuslara [sıçanlarda major pelvik gangliyon (MPG)] taşınır (33). Santral ve periferel kaynaklardan çıkan otonomik sinir lifleri pelvik pleksusta sinaps yaparak dallanır; alt ürogenital sistem ve rektumu inerve eder. Penil dokunun inervasyonunu sağlayan sinirler ise KS'ler olarak adlandırılırlar. Parasempatik inervasyonun korpus kavernozumlar ve korpus spongiozum üzerindeki etkisi düz kas gevşemesi ile sonuçlanan tñmesans yani ereksiyondur (9, 54). Erektıl dokunun inervasyonuna aracılık eden nöronal yapılar Şekil 3'te gösterilmiştir (55).

#### **2.1.2.2. Ereksiyonun Moleküler Fizyolojisi**

Ereksiyon birçok mediyatör tarafından modüle edilmektedir (48). Hücre içi Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonunu regüle eden mekanizmalar kavernoza düz kas kasılması ve gevşemesinde önemli rol oynar (33). Cinsel uyarının olmadığı ve sempatik sistemin egemen olduğu durumda, kavernöz düz kas hücreleri başta noradrenalin (NA) olmak üzere birçok kasıcı ajanın etkisi altında olup flasid halde bulunur (56). NA β-adrenerjik reseptörler üzerinden ereksiyona kısmi katkı sağlar gibi görünse de, temelde vasküler ve kavernoza düz kas postsinaptik G-protein kenetli α-adrenerjik (α<sub>1A,B,D</sub> ve α<sub>2A,B,C</sub>) reseptörleri üzerinden flasid bazal tonusu ve detñmesansı indüklemektedir (33, 57). Reseptör ligand etkileşimi Gq üzerinden hücre zarına bağı bir enzim olan fosfolipaz C (PLC) enzimini aktive ederek

fosfatidil inositol bifosfattan inozitol trifosfat ( $IP_3$ ) ve diasilgliserol (DAG) oluşumunu indükler. Oluşan bu ikincil habercilerden  $IP_3$  sarkoplazmik retikulumdaki  $Ca^{+2}$  kanallarından sitoplazmaya  $Ca^{+2}$  salıverilmesini artırırken, hidroforik bir molekül olan DAG ise protein kinaz C (PKC)'yi aktive ederek sitoplazmik  $Ca^{+2}$  düzeyini artırır. Hücre içi konsantrasyonu artan  $Ca^{+2}$ , dört adet bağlanma bölgesine sahip olan kalmaduline (CaM) bağlanır. Oluşan  $Ca^{+2}$ -CaM kompleksinin miyozin hafif zincir (MHZ) kinazı aktive etmesi ile fosforillenen MHZ alt üniteleri miyozin adenozin trifosfatazı (ATPaz) aktive ederek kavernöz ve vasküler düz kas kontraksiyonunu indükler (33, 58).



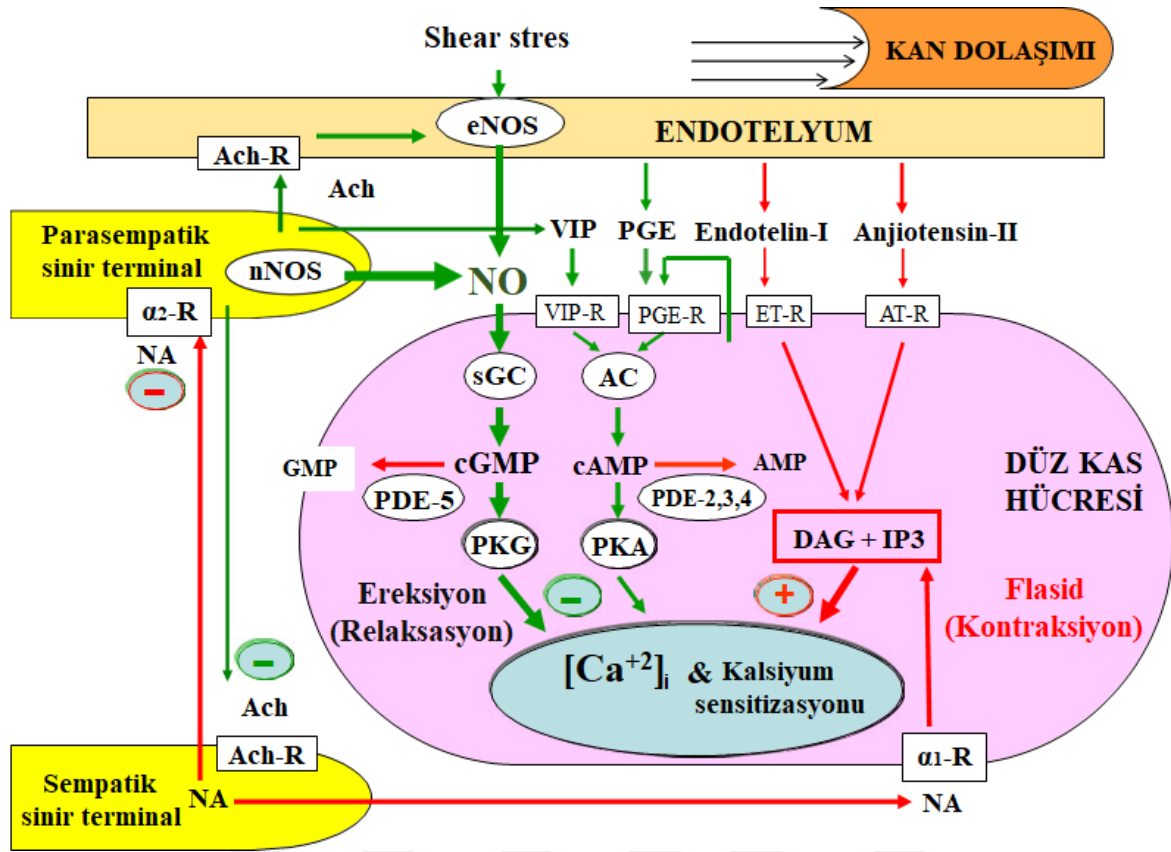
**Şekil 3.** İnsan penis dokusunun nöronal inervasyonu (Steers'den, 55)

ED tedavi stratejilerindeki yeni hedefler olarak karşımıza çıkan prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , tromboksan  $A_2$ , endotelin-1 ( $ET_1$ ), anjiyotensin-II ve nöropeptid Y penisin flasid durumunun

sürdürülmesine katkı sağlayan diğer endojen ajanlardır (33, 59). Endotelinler ( $ET_1$ ,  $ET_2$ ,  $ET_3$ ) düz kas kontraksiyonuna katkıda bulunan peptid yapılı maddelerdir. Penil detümesansını indükleyen ana izoform olarak kabul edilen  $ET_1$ , kavernozaal düz kaslar ve kavernozaal arterlerdeki  $ET_A$  reseptörü üzerinden sempatik aktivasyonu potansiyelize ederken; kavernozaal endotel hücrelerindeki  $ET_B$  reseptörleri üzerinden de NO salıverilmesini artırabilmektedir (23, 33).  $ET_1$  etkisini tıpkı anjiotensin-II gibi sitoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu artıran  $IP_3$  ve DAG oluşumunu indükleyerek göstermektedir (58).  $ET_1$ 'in ayrıca serin-treonin kinaz olan RhoA/Rho kinaz sisteminin aktivasyonunu indükleyerek MHZ fosfatazı inhibe ettiği ve kontraktıl tonusa katkı sağladığı bilinmektedir (33, 58).

Cinsel uyarı sonucu aktive olan parasempatik ve NANK sisteme ait eksitatör inputlar, arteriyel (kavernozaal-heliksin) ve kavernozaal düz kas sisteminin gevşemesi sonucu gelişen veno-okluzyon oluşumu ile ereksiyona sebep olmaktadır (60). Bu süreçte hücre içinde sGC/cGMP ve AC/cAMP sinyal yolları önemli rol oynamaktadır (36). Parasempatik ve NANK sisteme ait sinirlerce salıverilen Ach ve NO penil ereksiyonu indükleyen ana faktörlerdir (36, 60). KS stimülasyonu sonucu salıverilen Ach sempatik sinir uçlarından NA salıverilmesini inhibe ederek EF'ye indirekt katkı sağlarken; direkt etkisini muskarinik reseptörler ( $M_3$ ) aracılığıyla vasküler ve kavernozaal endotel hücrelerde hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyini arttırarak gösterir. Böylece kavernozaal doku endotel hücrelerinde endotelial nitrik oksit sentetaz (eNOS) aracılı NO salıverilmesini indükler (Şekil 4) (36, 58). Lokal konsantrasyonu artan nöronal ve endotel kaynaklı NO kavernozaal doku düz kas hücrelerine difüze olduktan sonra sGC'yi aktifleştirerek GTP'den cGMP üretimini sağlar. Hücre içi konsantrasyonu artan cGMP PKG'nin aktivasyonunu ve RhoA/Rho kinaz yolağı inhibisyonunu tetikler (36). PKG'nin çeşitli iyon kanallarını fosforillemesinin ardından  $K^+$  kanallarının açılması ve sitoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun azalması sonucu MHZ kinaz inaktivasyonu ve MHZ fosfataz aktivasyonu ile defosforillenen MHZ'ler kavernozaal ve vasküler gevşemeyi indükler (61).

L-Arjinini kullanarak NO üretimini sağlayan NOS'lerin var olan izoformlarının (nNOS, eNOS, iNOS) tümü penil dokuda eksprese edilmekte olup; iNOS'nin bu karmaşık mekanizmada etkisinin olmadığı, nNOS tarafından üretilen NO'nun tümesansın başlamasından sorumlu olduğu ve eNOS aracılı NO'nun ise rijit tümesansın sürdürülmesine katkı sağladığı bilinmektedir (62).



**Şekil 4.** Kavernoal düz kas hücre tonusunu düzenleyen hücre içi ve hücreler arası mekanizmalar (Mas'dan, 58)

Endojen kaynaklı  $H_2S$  molekülü de, kavernoal dokuda NO artışı başta olmak üzere çeşitli mekanizmalarla ereksiyonun indüklenmesinde rol oynar (63). Kolinerjik sinir kaynaklı vazoaaktif intestinal polipeptid (VIP) ve kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP); endotel kaynaklı prostaglandin  $E_1$  ve  $E_2$ , adenosin, ATP, nosiseptin ve adrenomedullin kavernoal düz kas relaksasyonuna katkıda bulunarak erektojenik etki gösteren diğer mediyatörlerdir (33, 59). VIP,  $PGE_1$  ve  $PGE_2$  tarafından cAMP aracılı PKA düzeyinin artırılması hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarını azaltarak ereksiyona katkıda bulunur (62, 64). Benzer şekilde adenosinin de  $A_2$  reseptör sinyal yolağı aracılı hücre içi cAMP seviyelerindeki artış ile erektojenik etki gösterdiği bilinmektedir (65).

Ereksiyonun sürdürülmesinde rol oynayan diğer bir sistem de serin/treonin protein kinaz Akt olarak da bilinen ve PKB'yi aktive eden fosfatidilinositol-3-kinaz sinyal yolağıdır. Sistemin aktivasyonu eNOS'un doğrudan fosforilasyonunu sağlayarak NO üzerinden ereksiyonun sürdürülmesini sağlar (60). Bunun yanında oluşan endotelial shear stres sebebiyle endotelial NO üretiminin artması EF'ye katkıda bulunmaktadır (36, 47).

Moleküler anlamda cGMP ve cAMP'nin yıkımını katalizleyen ve 11 izoformu tanımlanmış olan fosfodiesteraz (PDE) enzimleri, düz kas tonusunun regülasyonunda oldukça önemli bir role sahiptir. Kavernoza dokuda cAMP PDE 2, 3 ve 4 enzimleri ile AMP'ye dönüşürken; PDE5 ise cGMP'nin GMP'ye yıkılması ile ereksiyonun sonlanmasına katkıda bulunmaktadır (66, 67).

## **2.2. Erektile Disfonksiyon**

### **2.2.1. Erektile Disfonksiyonun Tanımı ve Epidemiyolojisi**

Erektile disfonksiyon tatmin edici bir cinsel performans için gerekli olan penil ereksiyonun başlatılamaması, sürdürülememesi veya tekrarlanamaması olarak tanımlanan bir halk sağlığı sorunudur. Bireylerin özgüven ve partnerleriyle olan ilişkilerinin kalitesini azaltan ED'nin prevalans ve insidansı dünya genelinde artma eğilimindedir (6). Dünya genelinde farklı yaş gruplarındaki erkeklerde ED prevalansı %3-76.5 aralığında olup; 2025 yılı sonunda 322 milyon erkeğin bu problemten etkileneceği tahmin edilmektedir (68). Mevcut durumda ABD'de her 5 erkekten 1'inde görülen ED vakalarının yaklaşık %25'ini 40 yaş altı bireyler oluşturmaktadır (69). Ülkemizde 40 yaş ve üzerindeki 1892 kişiyi kapsayan epidemiyolojik bir çalışmada ED prevalansının yaklaşık %70 olduğu belirlenmiş; vakalar da kendi içinde %13'ü şiddetli, %39'u orta şiddetli ve %48'i hafif şiddetli olarak derecelendirilmiştir. Ayrıca ED prevalansının ve şiddetinin komorbiditeler ile doğru orantı gösterdiği bildirilmiştir (70). 2760 katılımcının dahil edildiği benzer bir çalışmada 40-49 yaş aralığında ED prevalansının %17, 50-59 yaş aralığında %35.5, 60-69 yaş aralığında %68.8 ve 70 yaş üstü için %82.9 olduğu bildirilmiş; ED vakalarının ise %76.9'u hafif, %16.3'ü orta ve %5.7'si şiddetli olarak sınıflandırılmıştır (71).

### **2.2.2. Erektile Disfonksiyon için Risk Faktörleri**

Erektile disfonksiyonda modifiye edilebilen ve edilemeyen bir veya birden fazla risk faktörü mevcuttur (6). Özellikle kardiyovasküler sistem ile ilişkili kronik hastalıklar, diyabet ve pelvik cerrahiler başta olmak üzere yaşlanma, depresyon, nörojik hastalıklar, bazı farmakoterapötik ajanlar, hipertroidizm, vitamin D eksikliği, hipogonadizm, renal yetmezlik, benign prostat hiperplazisi ve alt üriner sistem bozuklukları, sedanter yaşam, alkol ve sigara kullanımı ED gelişimindeki temel risk faktörlerinden bazılarıdır (6, 45).

Yaşlanma ED gelişimindeki mutlak risk faktörlerinden biri olmasa da ED prevalansının artan yaş ile birlikte korelasyon gösterdiğine dair birçok epidemiyolojik çalışma

mevcuttur (6, 70, 71). Gelişen bu süreçte Rho/Rho Kinaz yolağı disregölasyonu, artan sempatik aktivite ve penil vasküler tonus, pelvik ateroskleroz gelişimi, azalan eNOS ve nNOS aktivasyonu ile eşlik eden komorbiditelerin etkili olduğı bilinmektedir (72, 73). Hormonal değışimler, fibrotik süreçlere bağı kavernoza düz kas atrofisi ve elastisitesinin azalması da yaşlanma ile indüklenen ED patogenezindeki önemli faktörlerdendir (74).

Literatürde ED'nin kardiyovasküler hastalıkların ilk klinik belirtici olabileceğı konusunda birçok kanıt bulunmaktadır (6, 45). Bu durum ED ve kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde endotel disfonksiyonun katkısının ortak olmasına dayandırılmaktadır (75). Araştırmalarda HT hastası erkeklerin yarısından fazlasının çeşitli derecelerde ED'ye sahip oldukları raporlanmıştır (76). Bu süreçte sempatik sistem ve renin anjiyotensin aldosteron sisteminin (RAAS) aktivitesinin artması sonucu NO üretiminin azalması, artan reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, ERK1/2 ve RhoA/Rho-kinaz sinyal yolağı aktivasyonu ile birlikte kavernoza dokuda aktive olan TGF-β1/Smad gibi fibrotik mekanizmaların da önemli rolü olduğı saptanmıştır (77-79).

Diyabetik erkeklerde ED prevalansı sağlıklı bireylere kıyasla 3-4 kat daha fazladır ve daha erken yaşlarda ortaya çıkmaktadır (45, 80, 81). Bu durum kardiyovasküler risk değıerlendirmesi açısından da oldukça önemlidir (82). Preklinik çalışmalarda diyabetik ED gelişiminde periferel nöropati, endotel disfonksiyon, nNOS ve eNOS inhibisyonu, oksidatif stres artışı, glikasyon son ürünleri, VEGF sinyalizasyonunun disregölasyonu, RhoA/Rho kinaz ve TGF-β1/Smad/CTGF sinyal yolağı aktivasyonu ile korpus kavernozaumlarda indüklenen fibrotik değışimler ve kavernoza düz kas apoptozisi sonucu meydana gelen morfolojik değışikliklerin etkili olabileceğı gösterilmiştir (73, 83, 84).

Spinal kord hasarı, multiple skleroz, radikal sistektomi, kolorektal cerrahi, radikal prostatektomi veya anterior rezeksiyon gibi majör pelvik cerrahileri takiben gelişen KS hasarı ED'ye sebep olabilmektedir. Pelvik cerrahiler sonrasında gelişen ED genelde nörojenik, vaskülojenik ve psikojenik kaynaklı olabilmektedir (45).

Stres ve performans anksiyetesi ile indüklenen psikojenik ED'nin erektel dokudaki sempatik aktivitenin artmasına bağı geliştiğı düşünölmektedir (45, 85). Literatürde RP gibi pelvik cerrahiler öncesinde bireylerin operasyon sonrası karşılaşılabilecekleri ED riski sebebiyle gösterdikleri stres ve depresif durum ile gelişen ED arasındaki ilişkiyi doğrulayan çalışmalr mevcuttur (18).

Sigara kullanımı ED için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (86, 87). Araştırmalarda kronik sigara kullanımı nedeniyle ED gelişme riskinin yaklaşık 2 kat arttığı bildirilmiş olup, bu durumdan gelişen endotel disfonksiyon, artmış sempatik hiperaktivasyon ve venooklüzif disfonksiyon (VOD) gibi süreçler sorumlu tutulmuştur (88, 89).

Peyronie hastalığı *tunica albugineadaki* kolajen birikimi sonucu gelişen arteriyel yetmezlik ve/veya VOD nedeniyle penil dokuda ereksiyon sırasında ağrı ve deformasyonlara yol açan; erkeklerin yaklaşık %3'ünü etkileyen bir hastalıktır (90). Klinikte peyronie hastalığı olan bireylerin %30-40'ında ED görüldüğü bildirilmiştir (91). ED problemi olan 1440 denekte peyronie hastalığının prevalansını değerlendirmek için yapılan klinik bir çalışmada, ED'li bireylerin %7.9'unun ilgili hastalığa sahip olduğu belirtilmiştir (92).

Dislipidemi nöronal ve endotel disfonksiyon aracılığıyla kavernoza NO düzeylerinde azalmaya neden olarak ED gelişimine katkıda bulunur (73). ED gelişme riskinin normal bireylerle karşılaştırıldığında vücut kitle indeksi (VKİ) 25-30 kg/m<sup>2</sup> olan bireylerde %50, 30 kg/m<sup>2</sup>'den fazla olanlarda %300 arttığı saptanmıştır (93). Ayrıca serum total kolesterol seviyesindeki her 1 mmol/L'lik artışın ED gelişim riskini %32 artırdığı, HDL'deki her 1 mmol/L'lik artışın ise ED riskinde belirgin bir azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (94). Esposito ve arkadaşları egzersiz ve kilo kaybının obez bireylerin %33'ünde EF'de anlamlı bir düzelme sağladığını göstermişlerdir (95). 1990 ile 2006 yılları arasında yapılan ve 221 araştırmanın incelendiği bir meta analizde; EF ile sağlıklı bir fiziksel aktivite arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu belirtilirken, sedanter yaşam ile EF arasında ise negatif bir korelasyon olduğu vurgulanmıştır (96).

Literatürde tüm ED vakalarının yaklaşık %25'inin kronik ilaç kullanımına bağlı ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bunlardan  $\beta$ -blokörler, diüretikler, Ca<sup>+2</sup> kanal blokörleri, anjiyotensin reseptör blokörleri, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ve  $\alpha$ -reseptör blokörleri gibi antihipertansif ajanların farklı patofizyolojik mekanizmalarla ED'ye neden olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra bazı antidepresanlar, anksiyolitikler, opiyatlar, antipsikotikler, hormonal preparatlar ve H<sub>2</sub> reseptör blokörleri de ED gelişimini tetikleyebilmektedir (97). Literatürde antidepresan ilaçlardan TSA kullanan hastaların yaklaşık %30'unda, SSRI kullanan hastaların %25-73'ünde ve SNRI kullanan hastaların ise %58-70'inde çeşitli derecelerde ED geliştiğini gösteren veriler raporlanmıştır (98). Gelişen ED'nin şiddeti ilaçların kullanım sıklığı ve dozuna bağlı olarak değişebilmektedir (97, 98).

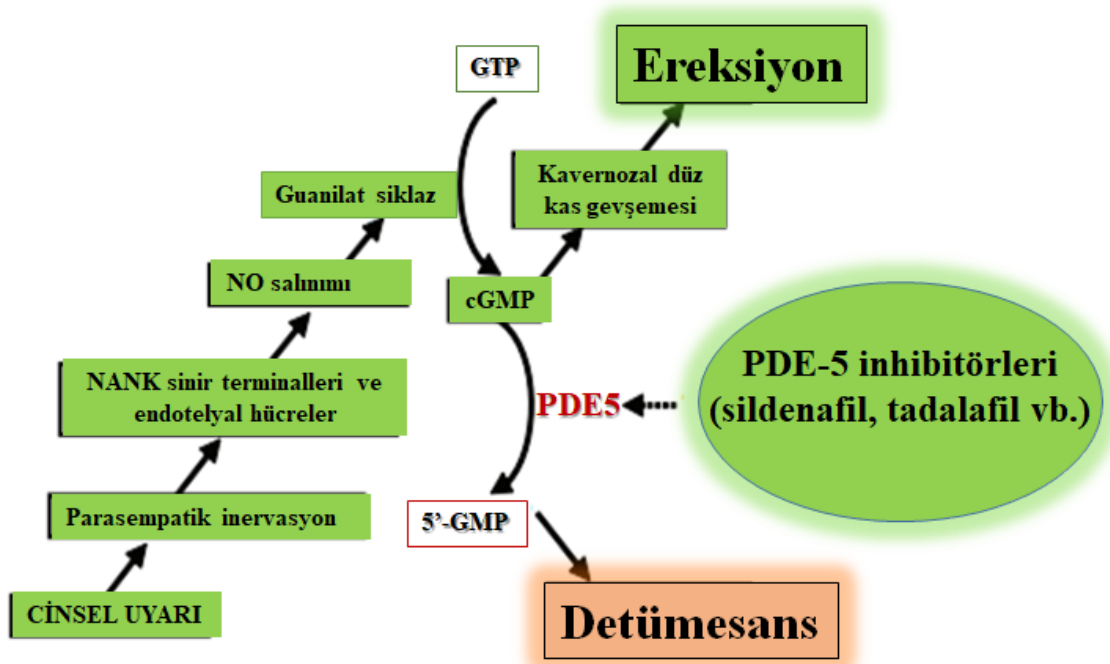
### 2.2.3. Eretil Disfonksiyonun Tedavisi

ED'nin şiddeti ve patagonezi tedavi protokölünün belirlenmesinde önemlidir (6, 45). Tedavinin planlanmasında ve etkinliğinin değerlendirilmesinde fizik muayene, klinik bulgular ve geçerliliği kanıtlanmış anketler kullanılmaktadır (99). Mevcut medikal tedaviler genellikle semptomları azaltıcı nitelikte olup rasyonel bir tedavi yaklaşımı sunmamaktadır. Birinci basamak tedaviler psikoterapi, farmakoterapi ve mekanik destek gibi yöntemleri; ikinci basamak tedaviler intraüretral ve intrakavernozal ilaç uygulamalarını içermektedir. Penil protez, venöz ligasyon ve penil revaskülarizasyon gibi operasyonel riskler barındıran cerrahi yaklaşımlar ise üçüncü basamak tedavi yöntemlerinden bazılarıdır (33, 100).

Günümüzde ED'li hastaların birinci basamak tedavisinde etkinlik, tolere edilebilirlik ve uygulama kolaylıkları açısından fosfodiesteraz (PDE5)'i inhibe ederek penil vasküler ve korporal düz kas gevşemesi için gerekli olan NO/cGMP yolağı modülasyonu ile erektile cevabın artırılmasına katkı sağlayan PDE5 inhibitörleri (sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil, udenafil vb) gibi terapötik ajanlar oral yoldan kullanılmaktadır. Korporal doku morfolojisinin bozulduğu ve NO üretiminin çeşitli nedenlerle yetersiz olduğu vasküler komplikasyonlara bağlı ED, diyabetik ED ve RP ile ilişkili ED'li bireylerde hastalığın şiddeti ile de ilişkili etkin bir tedavi elde edilememektedir (100, 101). Kimyasal yapıları cGMP ile benzerlik gösteren PDE5 inhibitörleri, PDE5 enziminin katalitik bölgesine bağlanarak cGMP'nin 5'-GMP'a yıkımını inhibe ederek etki gösterirler (Şekil 5) (102). Etkinlikleri benzer olan PDE5 inhibitörleri sadece farmakokinetik özellikleri yönünden farklılık gösterir. PDE5 inhibitörleri ED'de küratif bir tedavi sağlamadığı gibi kontrendike olduğu durumlarda (nitrat ve  $\alpha$ -blokör kullanımı) klinik kullanımlarını sınırlamaktadır (73).

Bunun dışında  $\alpha_2$  adrenerjik reseptör blokörü yohimbin,  $\alpha_{1,2}$  adrenerjik reseptör blokörü olan fentolamin, dopamin reseptör agonisti apomorfine ve trisiklik bir antidepresan olan trazodon PDE5 inhibitörleri varlığında pek tercih edilmeyen diğer erektogenik ajanlardandır (33). Hipogonadizm ile ilişkili ED'de topikal veya dokuya direkt enjeksiyon ile replasman tedavisi tek başına veya PDE5 inhibitörleri ile kombinasyon şeklinde uygulanmaktadır (103).





Şekil 5. Penil ereksiyon ve ED tedavisinde PDE5 inhibitörlerinin yeri (Beckman'dan, 102)

Başta PDE5 inhibitörleri olmak üzere oral tedavi protokollerinin etkisiz olduğu veya kontrendike olduğu vakalarda topikal, intrakavernozal ve intraüretral uygulamalar dışında vakum cihazları gibi non-farmakolojik mekanik tedaviler ve cerrahi teknikler de tercih edilmektedir (33, 104). Korpus spongiosum ve korpus kavernozumlar arasındaki sıkı bağlantı referans alınarak kavernoz dokuya enjeksiyonu yapılabilen intraüretral ajanların en önemlisi PGE<sub>1</sub> analogu olan alprostadildir. Alprostadil aynı zamanda topikal olarak da güvenle uygulanabilmektedir (33). Korpus kavernozum içine doğrudan yapılan intrakavernozal enjeksiyon ajanları ise gerektiğinde kombinasyon şeklinde de kullanılabilen papaverin (ilk klinik örnek), alprostadil, fentolamin, fenoksibenzamin, VIP ve timoksamindir (33, 45, 56). Cinsel ilişkiden kısa süre önce yapılan bu uygulama sonrasında herhangi bir cinsel uyarıya gerek kalmadan ereksiyonun sağlanması hastalar için bir avantaj gibi görünse de; mevcut tedavilerin uygulama zorluğu dışında, kullanımını kısıtlayan en önemli komplikasyonları uzamış ağrılı ereksiyon, hematoma ve korporal fibrozistir (33, 105).

Kök hücre uygulamalarının hasarlı dokuları yenileyerek ED tedavisinde etkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Yapılan prelinik ve klinik çalışmalarda intrakavernozal kök hücre uygulamasının etkinliği ve uygulama kolaylığı açısından başta

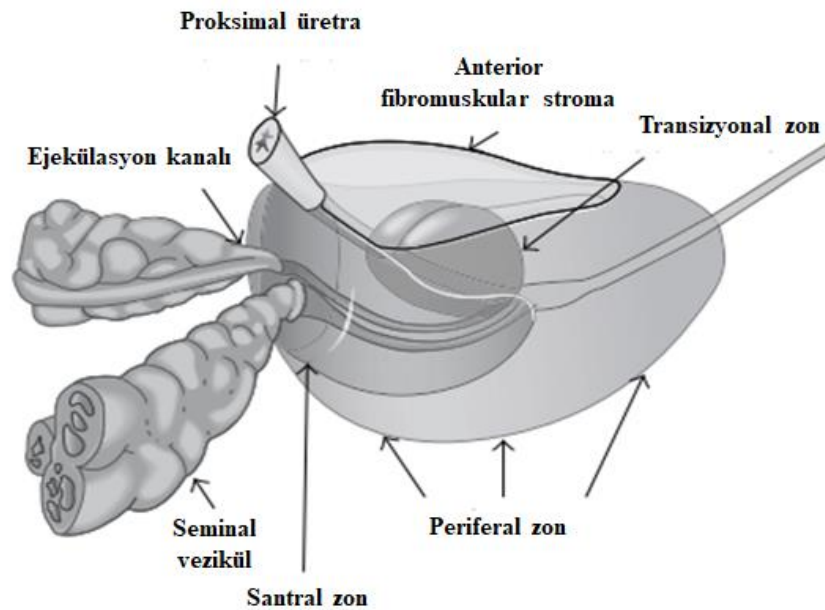
PR ile ilişkili ED olmak üzere PDE5 inhibitörlerine yanıt vermeyen hastalar için en uygun yöntem olabileceği belirtilmektedir (73).

Bireylerin cinsel yaşamını etkileyerek psikolojik stres oluşturan ED'nin tedavisi için daha etkin ve güvenilir tedavi stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla makro ve mikrovasküler bozuklukların restorasyonu, inflamatuvar ve nörodejeneratif süreçlerin baskılanması, TGF $\beta$ 1/Smad gibi kavernoza fibrozis ve apoptozisi tetikleyen yolların inhibisyonu başta olmak üzere; NO üretiminin ve biyoyararlanımının artırılması, dopamin ve melanokortin reseptör agonistleri, RhoA/Rho-kinaz yolağı inhibitörleri, anjiotensin reseptör blokörleri ve anjiyogenik büyüme faktörleri gibi EF'yi iyileştirecek mekanizmaların aktivasyonunu hedef alan periferik/santral etkili çeşitli ajanların etkinlik ve güvenlik araştırmalarına odaklanan bilimsel çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir (106-108).

## 2.3. Radikal Prostatektomi

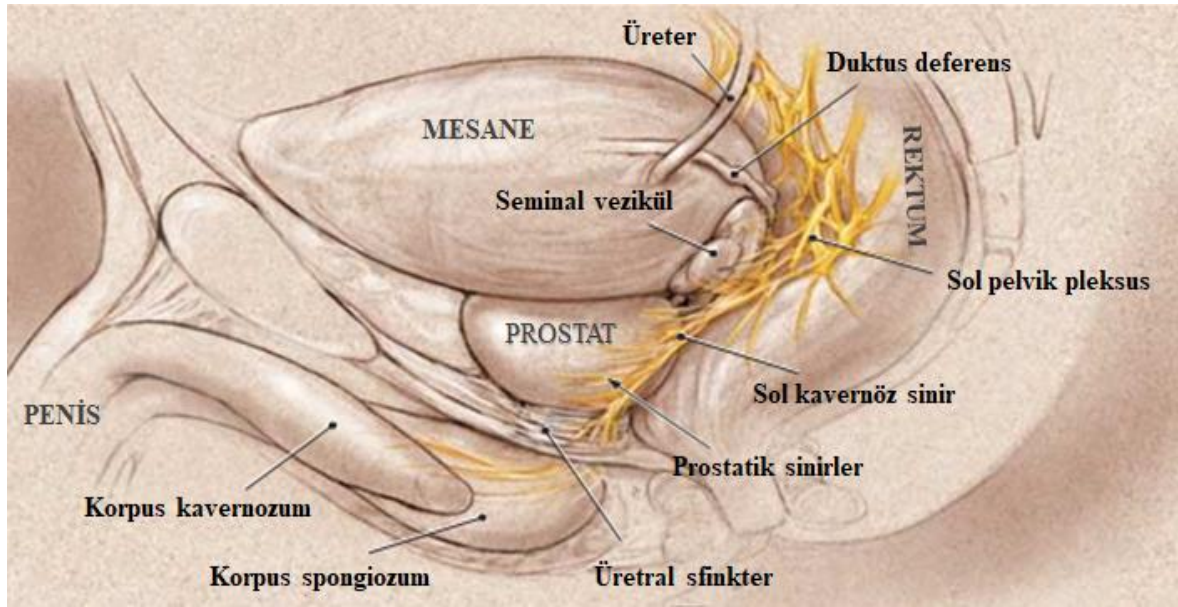
### 2.3.1. Prostat Anatomisi ve Fizyolojisi

Erkek ürogenital sisteminde yer alan, kontraktıl fonksiyonları bulunan ekzokrin bir bez olan prostat; santral, periferik, transizyonal ve anterior fibromuskular stroma olmak üzere farklı histolojik ve fonksiyonel özelliklere sahip dört bölgeden oluşan bütünleşik bir yapıdır (Şekil 6) (109, 110). Kemirgenlerde ise insanlardakinden farklı olarak bilateral seyirli ve çok loblu (farelerde dört lob, sıçanlarda üç lob) bir anatomiye sahiptir (111).



Şekil 6. İnsan prostatının bölgesel anatomisi (Bhavsar'dan, 109).

Prostat, insanlarda pelvik diyafram ile peritoneal kavite arasında; anteriorda simfiz pubis, posteriorda rektum, lateralde prostatik venöz pleksus ve levatör ani kası, inferior kısımda eksternal üriner sfinkter, superior kısımda mesane ile ilişkili olup mesanenin hemen inferiorunda proksimal üretrayı çevreleyecek şekilde lokalize olmuştur (112). İnferior hipogastrik pleksus kaynaklı dual inervasyona sahip olan prostat başta KS'ler olmak üzere ürogenital sisteme ait nörovasküler pleksuslar ile yakın bir ilişkiye sahiptir (Şekil 7) (11, 113).



**Şekil 7.** İnsan pelvisinin lateral görünümü ve prostatın anatomik yerleşimi (Burnett'ten, 11)

### 2.3.2. Prostat Kanseri ve Epidemiyolojisi

Yavaş seyirli ve erken dönemde asemptomatik olan prostat karsinomlarının büyük kısmı (%70) periferik bölge kaynaklı olmakla birlikte daha az bir kısmı transizyonel bölge kaynaklıdır (2, 109). Prostat kanseri 2018 yılında dünya genelinde 9.5 milyon yeni kanser vakasının 1.3 milyonunu oluşturmuş; prostat kanserine bağlı 350 bin can kaybı meydana gelmiştir (1, 114). Vakalara 40 yaşın altında daha az rastlanmakla birlikte, büyük bir kısmı 60 yaş üzerindeki kişilerden oluşmaktadır (115). 2040 yılı için öngörülen küresel tablo 2.4 milyon yeni tanı ve 740 bin ölümlü vaka olarak tahmin edilmektedir (1). Ülkemizde 2018 yılı içerisinde 17.5 bin yeni tanı ve 5.2 bin can kaybına sebep olan prostat kanseri ile ilgili son veriler yıllık 20 bin yeni tanı ve 5.5 bin ölümlü vaka olarak raporlanmıştır (115).

### **2.3.3. Radikal Prostatektomi ve Ürogenital Sistem Üzerindeki Etkileri**

Hasta öyküsü, klinik bulgular ve hastalığın evrelendirilmesi, mevcut tedavilerin değerlendirilmesi ve uygulanması için önemlidir. Tedavi seçenekleri karsinomun yerine/büyüklüğüne ve metastaz yapmış/yapmamış olmasına göre farklılık göstermektedir. Rasyonel tedavi tümöral dokunun prostat beziyle sınırlı olduğu durumlarda mümkündür (2). Tümöral dokunun diseksiyonu amacı ile prostat dokusunun tamamının çıkarılması olarak adlandırılan radikal prostatektomi (RP), erken evre veya tümörün lokalize olduğu orta yaş ve üstü hastalarda kansere bağlı ölümleri azaltmak amacıyla uygulanan etkin bir cerrahi yöntemdir (12, 116). KS'ler ile prostatın anatomik ilişkisinin anlaşılma başlanması ardından; 1904 yılında ilk perineal RP, 1947'de retropubik prostatektomi, 1970'te prostat spesifik antijenin keşfi, 1982'de sinir koruyucu radikal retropubik prostatektomi ve 2001 yılında ilk robotik prostatektomi gerçekleştirilmiştir. Bu süreç sonrasında prostatın pelvik plexus ve ürogenital sisteme ait nörovasküler paketler ile olan anatomik komşuluğu netleştikçe sinir koruyucu laparoskopik ve robotik destekli tekniklerin uygulanmasının yolu daha da açılmıştır (11, 14, 116-119). Buna rağmen başta ED olmak üzere ejakulasyon bozukluğu, penis morfometresinin azalması, uzun dönem üriner inkontinans ve üretral obstrüksiyon gibi komplikasyonlar halen daha RP sonrasında hastaların karşılaşılabileceği en ciddi ürogenital sistem problemleri olarak karşımıza çıkmaya devam etmektedir (6, 120).

### **2.4. Radikal Prostatektomi ile İlişkili Eretil Disfonksiyon**

#### **2.4.1. Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi**

Minimal invazif ve sinir koruyucu cerrahi tekniklere rağmen KS'lerin genellikle prostatın postolateral yüzeyi boyunca değişken dallanmalar (200-400 µm'lik) göstermesi; RP operasyonu sırasında istenmeyen travmatik (ısı veya direk temas) sinir hasarlarına sebep olabilmektedir. Bu durum RP ile ilişkili ED gelişimini indükleyen majör faktör olarak kabul edilmektedir (14, 113). Yöntemden bağımsız olarak operasyon sırasında arteriyel hasar, anastomoz bölgesinde darlıklar, lokal inflamatuvar yanıtlar gibi birçok faktörün de RP ile ilişkili ED gelişiminde etkili olabileceği raporlanmıştır (14). Aksesuar pudendal arter gibi vasküler faktörlerin RP sırasında meydana gelebilecek travmatik yaralanmalara karşı oldukça duyarlı olduğu ve RP ile ilişkili ED vakalarının %4-75'inde bu durumun etkin şekilde rol oynadığı bilinmektedir (12, 121, 122). Mulhall ve arkadaşları tarafından yapılan klinik bir çalışmada; bilateral sinir koruyucu RP geçiren erkeklerin operasyondan sonraki 4 ile 12 ay arasında, %59'unda arteriyel yetmezlik, %26'sında venöz sızıntı ve aynı zamanda

venöz sızıntısı olanların hepsinde bir dereceye kadar arteriyel yetmezlik geliştiği gözlenmiştir. Mevcut fizyolojik değişimlerin RP sonrası gelişen VOD ve dolayısıyla ED'ye katkıda bulunan patofizyolojik mekanizmaları tetikleyen önemli süreçler olduğu vurgulanmıştır (123).

Epidemiyolojik çalışmalarda RP ile ilişkili ED prevalansı (%10-90) uygulanan cerrahi tekniklere ve metodolojik yöntemlere göre farklılık göstermektedir (5, 7). Bu kapsamda, lokalize prostat kanseri teşhisi konulduktan sonra RP operasyonu geçirmiş 1164 erkek (55-74 yaş) hasta ile gerçekleştirilen kohort çalışmasında, erken (2 yıl), orta (5 yıl) ve uzun dönemde (15 yıl) deneklerin EF'lerinde sırasıyla %78.7, %75.7 ve %87 oranında farklı derecelerde yaygın düşüş olduğu raporlanmıştır (124). Nelson ve arkadaşları RP öncesi normal erektile fonksiyona sahip olan 134 denekle yaptıkları bir çalışmada, operasyondan 2 yıl sonra normal EF'lerini geri kazanan deneklerin oranını %16 olarak bildirmişlerdir. 60 yaşın üzerindeki kişilerde ise bu oranın sadece %4 olduğunu vurgulamışlardır (125). Hagling ve arkadaşlarının yaklaşık 3 yıl süren çok merkezli, prospektif ve randomize olmayan çalışmasında; robot destekli laparoskopik RP ve retropubik RP operasyonu geçiren hastalarda 12 ay sonunda farklı derecelerde de olsa ED görülme oranları sırasıyla %70.4 ve %74.7 olarak raporlanmıştır (126). Literatürde sinir koruyucu tekniklerin daha az ürogenital sistem komplikasyonlarına sebep olduğunu gösteren veriler bulunmakla birlikte, bilateral sinir koruyucu tekniklerin unilateral sinir koruyucu tekniklere göre üstün olduğu belirtilmiştir (7, 127).

#### **2.4.2. Kavernöz Sinir Hasarı ile İndüklenen Erektile Disfonksiyonun Patofizyolojisi**

Miyelinsiz KS'ler pelvik gangliyonlardan köken alır ve içerdiği sempatik/paraempatik sinir lifleri ile penisin otonomik inervasyonunu sağlar (128). RP gibi pelvik cerrahiler sonrası KS'lerde meydana gelen inflamatuvar nöropatik hasar nedeniyle EF azalır. İntakt KS liflerinin latent bir iyileşme dönemi ardından rejenere olmasıyla EF'de düzelme sağlanır (12, 129). Gelişmiş nörotrofik faktör aktivasyonu ve nöroinflamasyonda azalma ile karakterize edilen rejeneratif fazda, sempatik sinirlerin parasempatik sinirlere göre daha hızlı yenilenmesi de fonksiyonel iyileşme sürecini negatif yönde etkilemektedir (12, 14, 129).

İntraoperatif KS ve/veya gliyal hücrelerin hasarı sonrası nöronal mikro çevredeki lokal inflamatuvar yanıtlar ve nNOS-NO/cGMP sinyal yolağının inhibisyonu RP ile ilişkili ED gelişiminde rol oynar (11, 17). Nöronal hasarın erken döneminde MPG'de akut

inflatuvar fazda interlökin-6 (IL-6) ve IL-6 reseptör ekspresyon artışının etkili olduğu bilinmektedir (130). Cerrahi operasyondan sonra kaverno dokunun geçici denervasyonu atrofik ve fibrotik değişikliklere neden olarak kaverno dokuda düz kas hasarı ve kolajen birikimine yol açmaktadır (131). İntakt sinirlerdeki rejenerasyon sırasında kaverno dokuda inervasyon eksikliğine bağlı hipoksi nedeniyle gelişen endotel disfonksiyon, eNOS-NO/cGMP sinyal yolağı inhibisyonu, inflamasyon, oksidatif ve nitrozatif stres artışı kaverno doku hasarına neden olarak RP ile ilişkili ED patogenezinde etkin rol oynamaktadır (9, 14, 132). KS hasarı ile indüklenen ED'nin ana nedeninin nörojenik temelli olduğu varsayılrsa da altta yatan süreçlerin karmaşıklığı etkili tedavi protokollerinin uygulanabilirliği açısından engel teşkil etmeye devam etmektedir (12, 133).

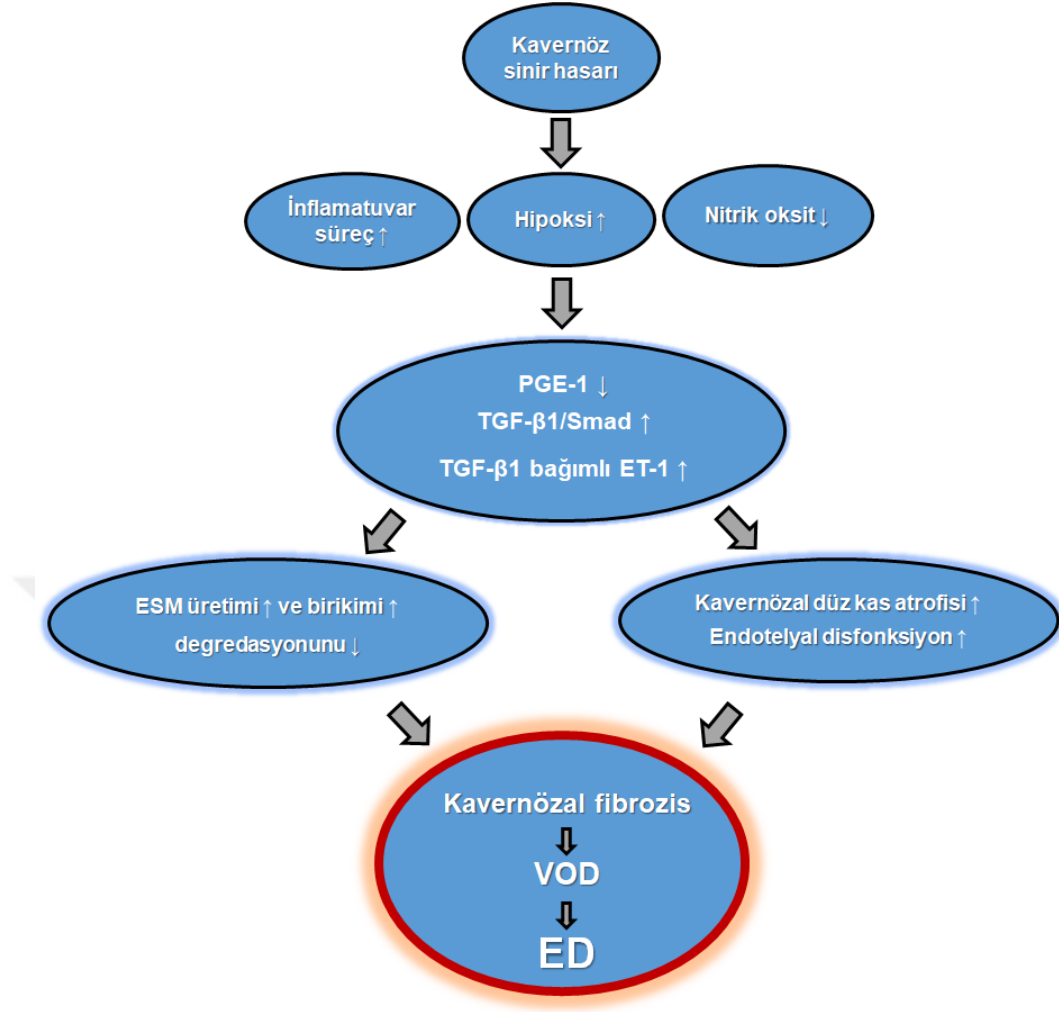
MPG ve KS'lerin *Schwann* hücrelerinde bulunan *sonic hedgehog* (SHH) proteini kaverno doku bütünlüğünün sürdürülmesinde etkin rol oynamaktadır. KS hasarı sonrası SHH düzeylerinin azalması aksonal demiyelinizasyon ve KS'lerin dejenerasyonuna sebep olur. Sinir hasarının hemen ardından KS mikroçevresine peptid amfifil nanolifleri aracılığıyla SHH proteini uygulamasının sinir rejenerasyonunu sağlayarak ve düz kas apoptozisini önleyerek EF'yi iyileştirebileceği gösterilmiştir. Hem nöronlarda hem de gliyal hücrelerde SHH proteini mevcuttur. SHH protein ekspresyonundan sorumlu olan mRNA'nın ise sadece nöronlarda bulunması, nöronlardan gliyal hücrelere parakrin olarak iletilindiğini gösterir. Bu sonuçlar, SHH sinyal yolağının nöronları hasardan koruyan ve rejenerasyonu sağlayan önemli bir hücresel mekanizma olabileceğini düşündürmektedir (17, 134). Benzer bir çalışmada sinir hasarını takiben MPG ve *Schwan* hücrelerinde adhezyon proteini olan Ninjurin-1'in düzeylerinin artmasının, nNOS eksprese eden sinirlerin rejenerasyonu ve kaverno endotelyumun yapısal ve işlevsel iyileşmesini engellediği gösterilmiştir (135). Diğer bir araştırmada, nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli bir role sahip olduğu düşünülen kalpain-1 protein aktivasyonunun KS hasarı ardından gelişen ED'de rolü olduğu bildirilmiştir (136).

Preklinik çalışmalarda KS hasarı sonrası kaverno dokularda ve MPG'de RhoA/ROCK yolağı upregülasyonu raporlanmıştır (107, 129, 137). Literatürde nöronal hasar sonrası MPG'deki RhoA/ROCK sinyal yolağı aktivasyonunun, nitrejik nöronların seçici apoptozisine neden olan kaspaz-3'ün doğrudan aktivasyonuna yol açtığını gösteren çalışmalar yer almaktadır (129). Bu kapsamda RhoA/ROCK yolağının Y-27632 gibi çeşitli ajanlarla inhibisyonu, BKSH sonrası gelişen nörodejenerasyon ve dolayısıyla NO

biyoyararlanımının artırılması, kavernozaal atrofi ve fibrozisin azaltılması yoluyla RP ile ilgili ED için uygun bir terapötik hedef olabileceğini göstermiştir (107, 138-140). Yapılan benzer çalışmalarda TGF- $\beta$ 1 ile sfingosin-1-fosfat ve RhoA-ROCK1-LIMK2-kofilin yolağı arasındaki koordinasyonun da KS hasarının neden olduğı kavernozaal fibrozis ve düz kas atrofisinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (141, 142).

Fibrozis dokularda ilerleyici işlev bozukluğuna sebep olan önemli bir fizyopatolojik olaydır (143). Kavernoza dokuda hücre proliferasyonu ve ESM birikimi ile karakterize fibrozis oluşumu prelinik ve klinik çalışmalarda iyi tanımlanmış bir komplikasyondur (79, 128). Sağlıklı bir kavernoza dokuda ESM proteinlerinin sentezi ve yıkılması denge halindedir. KS hasarı sonrası gelişen fizyopatolojik süreçte proliferasyona uğrayan fibroblastlar, miyofibroblast adı verilen kontraktıl yeteneğe sahip hücrelere dönüşmektedir. Başta TGF- $\beta$ 1 olmak üzere ET<sub>1</sub> ve A-II gibi mediyatörlerin aracılığıyla aktive olan fibroblast/miyofibroblastlar profibrotik ESM'lerin fibrotik ESM proteinlerine dönüşümünü hızlandırarak fibrozis oluşumuna katkıda bulunmaktadır (8, 33). TGF- $\beta$ 1'in E-cadherin gibi epitelyal belirteçlerin down-regülasyonu; vimentin ve  $\alpha$ -SMA gibi mezenkimal belirteçlerin upregülasyonu ile karakterize olan epitelyal mezenkimal geçişte önemli rol oynadığı bilinmektedir (144). Sinir hasarını takiben dokuda TGF- $\beta$ 1 düzeyinin artması, dokuya makrofaj gibi inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu ve miyofibroblastlar tarafından indüklenen fibrotik süreçleri aktive ederek kavernoza dokunun histolojik yapısında irreversibl değişikliklere sebep olmaktadır (128).

Sağlıklı dokuda ereksiyon sırasında PGE1 düzeyinin artması fibrotik süreci inhibe ederek kavernozaal oksijen seviyelerindeki artışı desteklemektedir. Nöronal hasar sonrası kavernoza dokudaki hipoksik süreç; endotel kaynaklı PGE1 oluşumunu inhibe ederken, TGF- $\beta$ 1/Smad yolağı aktivasyonu ve TGF- $\beta$ 1 bağımlı endotelin-1 üretiminin artmasını indükleyerek tip I ve tip III kolajen birikimine sebep olmaktadır. Bu durum kavernozaal fibrozis ve düz kas atrofisi ile birlikte erektıl dokuların işlevselliğini azaltan endotelyal fonksiyon kaybına sebep olarak ED'ye yol açmaktadır (12, 127). KS hasarı sonrasında erektıl dokuda indüklenen hücresel, moleküler ve yapısal değişikliklerden bazıları Şekil 8'de gösterilmiştir (127).



**Şekil 8.** Kavernöz sinir hasarı ardından kavernozal dokuda indüklenen hücresel, moleküler ve yapısal değişiklikler (Leungwattanakij'den, 127)

Proteoglikanlar ve fibröz proteinler fibrozis oluşumundaki temel ESM bileşikleridir. Fibröz proteinler yapısal proteinler (kolajen ve elastin) ve adhezif proteinler (fibronectin, laminin, tenaskin, vitronektin, integrin) olmak üzere ikiye ayrılır. Kolajenler; fibroblast ve osteoblastlar gibi bağ dokusu hücreleri tarafından sentezlenen lifli proteinlerden oluşan ve ekzositoz yoluyla ESM'ye salgılanan proteinlerdir (145). Fibronectin ise endotel, düz kas ve fibroblastlarca üretilen yüksek moleküler ağırlıklı bir glikoprotein olup; plazmada ve diğer vücut sıvılarında çözünür bir formda bulunmaktadır. KS hasar modellerinden sonra erken dönemde TGFβ1 ekspresyonunun aktive olması sonucu düzeyi artan fibronectin; hücre yüzeyi integrinleri, fibrin ve kolajenlere bağlanarak çözünmeyen formda birikmekte ve fibrotik sürece katkı sağlamaktadır (146, 147).



### **2.4.3. TGF- $\beta$ 1/Smad Sinyal Yolağının Kavernöz Sinir Hasarı ile İndüklenen Kavernozal Fibrozis Gelişimindeki Rolü**

Kavernöz sinir hasarı ardından sinirlerin rejenerasyon süresi klinik anlamda 18-24 ay sürebileceğinden bu süre zarfında azalan nöronal uyarı, penil doku perfüzyonuna katkı sağlayan doğal ve nokturnal ereksiyon kaybına sebep olmaktadır (18). Bu süre zarfında azalan NO üretimi ve iskemik ortam ED'ye sebep olan kavernozal düz kas apoptozisi ve fibrozis gelişimini indüklemektedir. Sonuç olarak erektil kapasite kavernöz dokulardaki irreversibl yapısal bozukluklardan dolayı azalmaktadır (17, 148, 149).

Fizyolojik şartlarda yara iyileşmesi için gerekli ekstraselüler matriks (ESM) birikimi ile karakterize olan fibrotik süreçler, bazı durumlarda dokulardaki fibroblastların uzun süreli aktivasyonu sonucu aşırı fibröz ESM birikimine neden olan patolojik bir cevap haline gelmektedir (8). Fibroblast proliferasyonu, fibroblastların apoptoza dirençli olan miyofibroblastlara farklılaşması, aşırı kolajen ve diğer ekstraselüler matriks (ESM) proteinlerinin birikmesi ile karakterize edilen fibrozis, penil doku homeostazının bozulmasına neden olması sebebiyle RP ile ilişkili ED patafizyolojisinde etkin bir role sahiptir (128, 150). Iacono ve arkadaşlarınca yapılan klinik bir çalışmada; RP operasyonu geçirmiş bireylerden operasyondan sonraki 2. ve 12. ayda alınan korporal biyopsi örneklerinde, kavernozal düz kas ve trabeküler elastik lif miktarlarında azalma, artmış kolajen birikimi ile karakterize bozulmuş kavernozal doku mimarisi gösterilmiştir (151).

İnterlökinler, TGF- $\beta$  süper ailesinin üyelerinden olan TGF- $\beta$ 1, aktivin A ve B gibi sitokinler bu patolojik süreçte katkıda bulunan en önemli mediyatörlerdir (152). TGF- $\beta$ 'nın memelilerde tanımlanmış üç izoformundan (TGF- $\beta$ 1, 2 ve 3) biri olan TGF- $\beta$ 1 hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ESM üretiminin düzenlenmesinde rol oynayan çok işlevli bir sitokindir (153). Artmış TGF- $\beta$ 1 ekspresyonu ve/veya aktivasyonu ESM üretimindeki artışı ve yıkımındaki azalmayı indükleyerek özellikle akciğer, karaciğer, böbrek, deri ve penis gibi organlarda fibrozis oluşumunda önemli rol oynar (128, 152). TGF- $\beta$ 1 ligandları fibriline bağlandıktan sonra matriks içinde konsantre hale gelerek profibrotik yanıtı hızlandırmaktadır (152). Yapılan bir araştırmada ekzojen TGF- $\beta$ 1 (80 pM) ile inkübe edilen insan korpus kavernozal primer düz kas hücre kültüründe kolajen-I ve kolajen-III sentezinin kontrol grubuna göre 2.5-4.5 kat artış gösterdiği raporlanmıştır (154). Benzer bir çalışmada TGF- $\beta$ 1'in intrakavernozal enjeksiyonunun bağ doku sentezini artırdığı ve kavernozal düz

kas miktarında azalmaya yol açarak korpus kavernozumların yapısal bütünlüğünü değiştirdiği gösterilmiştir (13).

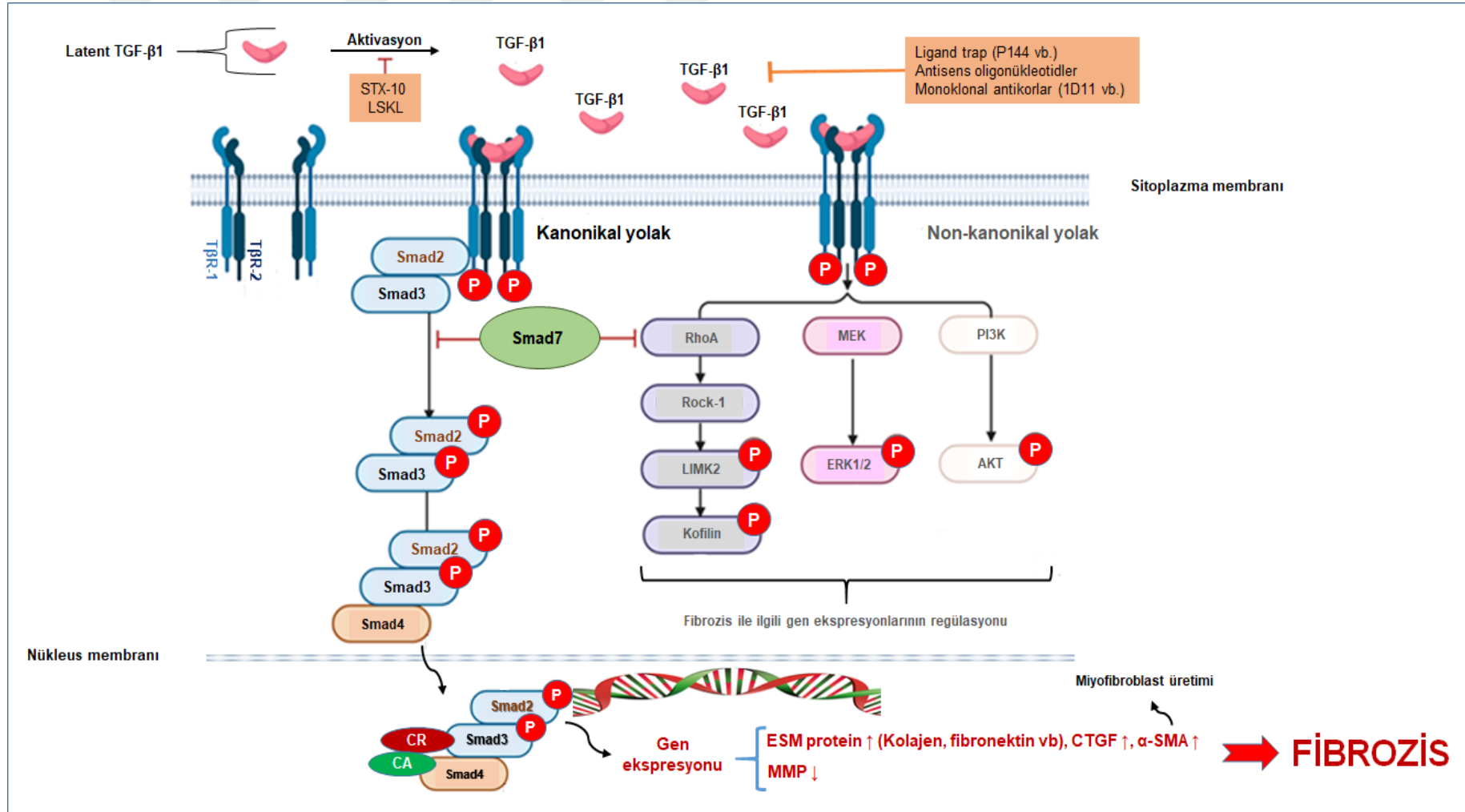
TGF- $\beta$  süper ailesinin; TGF- $\beta$  izoformları, aktivinler, inhibitörler, GDNF'ler, kemik morfogenetik protein (BMP)'ler ve anti-müllerian hormon gibi yapısal olarak birbirine benzeyen fakat fonksiyonel anlamda farklı özellikteki 40'tan fazla üyesi bulunmaktadır. Mevcut üyeler hücre farklılaşması, ESM üretimi, angiogenezis, apoptozisin düzenlenmesi gibi biyolojik etkilerini 7 farklı tip-1 (aktivin reseptör benzeri kinaz/ALK) ve 5 farklı tip-2 TGF- $\beta$  reseptörleri (T $\beta$ R) aracılığıyla gerçekleştirir (20, 21, 152). TGF- $\beta$ 1 aktivasyonu patolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve fiziksel faktörler tarafından tetiklenen farklı etiyolojilere sahip fibrotik süreçlerde kritik öneme sahiptir (143).

Smad proteinleri yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre; reseptör ile regüle edilen Smad'lar [(R-Smad'lar (BMP Smad'lar ve TGF- $\beta$ /aktivin Smad'lar)], common-partner Smad'lar (Co-Smad'lar) ve inhibitör Smad'lar (I-Smad'lar) olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar (152). TGF $\beta$ 1/Smad sinyal iletiminin negatif regülasyonu I-Smad'lar (Smad6, Smad7) tarafından gerçekleşebilir. I-Smad'lar, R-Smad'ların (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 ve Smad8) aktivasyonunu veya Co-Smad'lar (Smad4) ile oluşturacakları heteromerik kompleks oluşumunu engelleyerek etkilerini gösterirler (152, 155).

Kanonikal sinyalizasyonda TGF- $\beta$ 1, ALK5 olarak bilinen tip-1 (T $\beta$ R-1) ve tip-2 (T $\beta$ R-2) transmembranal reseptörler olan serin/treonin protein kinazları bir araya getirerek ilgili genetik ekspresyonu düzenler. TGF- $\beta$ 1 kendi akseptörü olan LAP ve latent TGF- $\beta$ 1 bağlayıcı protein (LTBP) ile kompleks halinde inaktif durumdadır. Ligand yokluğunda T $\beta$ R-1 ve T $\beta$ R-2 reseptörleri sitoplazma membranında homodimer halindedir (21). Bazı proteazlar (plazmin, katepsin), trombospondin-1 ve integrinler gibi latent TGF- $\beta$ 1 aktivatörlerinin etkisiyle serbestleşen TGF- $\beta$ 1, T $\beta$ R-2'ye bağlanarak reseptörün fosforilasyonunu indükler. T $\beta$ R-2'nin fosforilasyonu ardından T $\beta$ R-1'de serin/treonin rezidüellerinden (GS domain) fosforillenir. Böylece TGF- $\beta$ 1 uyarısı T $\beta$ R-2 ve T $\beta$ R-1 reseptör çiftlerinin birleşmesini ve reseptör aktivasyonundaki en önemli basamak olan tetramerik reseptör kompleksinin fosforilasyonunu sağlar (21, 152, 155). Aktive olan T $\beta$ R-1, TGF- $\beta$  protein ailesinin hücre içi sinyal aracıları ve modülatörleri olarak işlev gören Co-Smad grubuna ait sitoplazmik proteinlerden Smad2(Ser<sup>465/467</sup>) ve Smad3(Ser<sup>423/425</sup>) proteinlerinin fosforilasyonuna (aktivasyonuna) aracılık eder (156-158). Smad proteinlerinin aktive olmuş reseptör kompleksi tarafından fosforilasyonunu kolaylaştıran SARA proteinini

aynı zamanda inaktif formlarının nükleusa geçişlerini de engeller. Fosforile Smad kompleksi (pSmad2/3), MH2 (C-terminal) domainleri vasıtasıyla Smad4 ile heteromerik kompleks halinde diğer transkripsiyon faktörleri, transkripsiyonel ko-aktivatör [CBP, p300]] ve ko-represörler ile etkileşime girerek nükleoproteinler aracılığıyla nükleusa geçer (21, 152, 155). Ardından MH1 (N-terminal) domainleri vasıtasıyla promotor bölgedeki Smad bağlayan molekülere (SBE, AGAC ve GTCT) bağlanır (8, 155). Bu süreçte TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağının genetik ekspresyon üzerindeki etkisi, genin promotor bölgesinde bir veya daha fazla SBE veya alternatif olarak TGF- $\beta$  inhibitör element (TIE) olarak bilinen bir dizi ile düzenlenir (159). Smad7 ise 1-) T $\beta$ R-1'in fosforilasyonunu engelleyerek, 2-) protein fosfataz (PP1) yoluyla reseptör kompleksinin defosforilasyonunu sağlayarak, 3-) aktive olmuş T $\beta$ R-1 için R-Smad'lar ile yarışarak oluşacak heterodimerik kompleksin oluşumunu engelleyerek, 4-) E3-ubikitin ligaz ve Smad ubikitinasyon regülatör faktör-2 (Smurf-2) T $\beta$ R-1 etkileşimi ile reseptör degradasyonunu sağlayarak gelişebilecek fibrotik süreçleri engellemektedir (21). TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı, interstisyel bir kolajenaz olan matriks metaloproteinaz-1 (MMP-1) genetik aktivasyonu üzerinde inhibisyona sebep olur. Ayrıca doku proteaz inhibitörü olan TIMP-1 ve PAI-1 aktivasyonu aracılı etkisi ile çeşitli dokularda ESM birikimini destekleyerek fibrozis gelişimine dolaylı yoldan katkı sağlamaktadır (152).

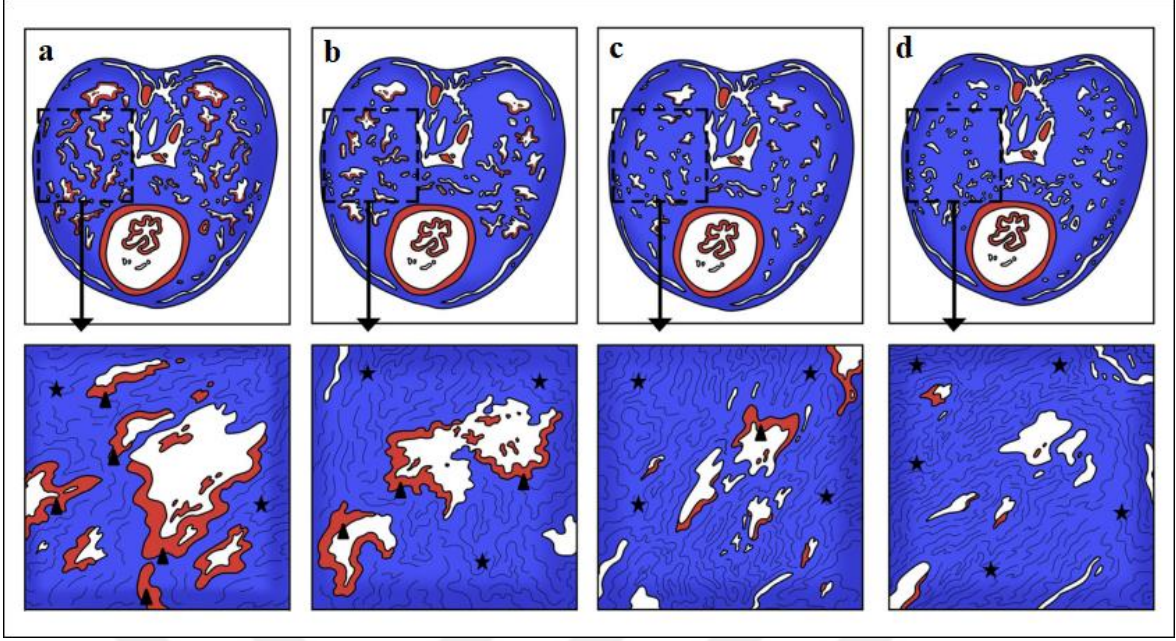
TGF- $\beta$ 1'in fibrotik süreçler üzerindeki etkisi ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu kanonik yolak üzerinde yoğunlaşmış gibi gözükse de TGF- $\beta$ 1/ALK1/Smad1/5, TGF- $\beta$ 1/ERK, TGF- $\beta$ 1/JNK/p38, TGF- $\beta$ 1/PI3K/Akt, TGF- $\beta$ 1/JAK2/STAT3, TGF- $\beta$ 1/ROCK gibi nonkanonik sinyal yolaklarının da ilgili süreçte rol oynadığı bilinmektedir (21). TGF- $\beta$ 1/Smad yolağına benzer şekilde aktivin/Smad2/3 sinyalizasyonu da fibrozisi tetiklerken; BMP/Smad1/5/8 yolağının aktivasyonu ise antifibrotik süreçleri indükleyici özellik göstermektedir (152). Şekil 9'da fibroblast hücre aktivasyonu sonrasında TGF- $\beta$ 1/Smad (kanonik) ve TGF- $\beta$ 1/non-Smad (non-kanonik) sinyal yolağının fibrotik süreçler üzerindeki etkisi gösterilmiştir (22).



**Şekil 9.** TGF-β1/Smad (kanonikal) ve TGF-β1/non-Smad (non-kanonikal) aracılı fibroblast aktivasyonu sonucu indüklenen fibrotik süreçler (Shi'den, 22).

Literatürde hipertansiyon, diyabet, spinal kord hasarı ve KS hasarı ile ilişkili olarak aktive olan TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağının farklı rodent türlerinde indüklenen ED patogeneğinde korpus kavernoza dokularında gelişen profibrotik süreçlerdeki rolü ile ilgili birçok veri bulunmaktadır (79, 108, 160). TGF- $\beta$ 1 yaşla indüklenen kavernoza fibrozis gelişiminde de önemli bir role sahiptir (161, 162). Cui ve arkadaşları tarafından yapılan deneysel bir çalışmada TGF- $\beta$ 1/RhoA/ROCK1/LIMK2/Kofilin sinyal yolağının yaşla indüklenen korporal fibroziste etkili olduğu gösterilmiştir (162).

BKSH ile ilişkili ED’de artmış TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı aktivasyonu, fibroblast/miyofibroblast dönüşümüyle indüklenen ekstrasellüler matriks (ESM) proteinlerinin birikimi sonucu gelişen fibromuskular anomaliler, kavernoza düz kas apoptozisi ve endotelial hücre proliferasyonu ile NO düzeyinin azalması önemli rol oynamaktadır (11, 12, 14, 127, 163). Jin ve arkadaşları fare korpus kavernozaunda TGF- $\beta$ 1/Smad yolağının upregölasyonu ile birlikte kavernoza düz kas ve endotel hücre apoptozunun BKSH'dan 3 gün sonra başladığını; 7. ve 14. günler arasında maksimum seviyeye ulaştığını göstermişlerdir (13). Benzer bir çalışmada sıçan BKSH modelinde kavernoza düz kas apoptozisinin hasardan sonraki 24 saat içinde ortaya çıktığını gösteren veriler mevcuttur (65). Başka bir çalışmada fibrotik hastalıklarla ilişkilendirilen histon deasetilazın (HDAC) BKSH modelinde penil dokudaki genetik ekspresyonunun arttığı gösterilerek HDAC/TGF- $\beta$ 1/Smad yolağının kavernoza fibrozis gelişiminde etkin rol oynadığı vurgulanmıştır (163). Song ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, BKSH sonrası farelerin korpus kavernozauna Smad7 genini kodlayan tek doz adenovirüs enjeksiyonunu takiben 2. hafta sonunda PAI-1, fibronektin, kolajen-I ve kolajen-IV gibi ESM proteinlerinin üretiminin azalmasının yanında; endotel hücre apoptozisinin önemli ölçüde azaldığı ve eNOS fosforilasyonunun indüklendiği gösterilmiştir (164). Sıçan korpus kavernozaumlarında (enine) gelişen ilerleyici fibrozis sürecine ait morfolojik değışikliklerin temsili görüntüsü Şekil 10’da gösterilmiştir (79).



**Şekil 10.** Fibrozisin ilerlemesi sırasında sıçan korpus kavernozumundaki a) normal görünüm, b) hafif derecede fibrozis, c) orta derecede fibrozis ve d) ileri derecede fibrozisi temsil eden morfolojik görüntüler. Yıldız işareti ESM olan interstisyumu, ok uçları ise kavernoza düz kas trabeküllerini göstermektedir (Cho'dan, 79).

#### 2.4.4. Radikal Prostatektomi Sonrası Gelişen Eretil Disfonksiyon Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar

Nörodejenerasyon ve sonrasında kavernoza dokuda meydana gelen morfolojik değişikliklerin RP ile ilişkili ED gelişimine aracılık ettiği bilinmektedir. Bu sebeple nöronal rejenerasyonun sağlanması, kontraktıl ve gevşetici faktörler arasındaki dengenin bozulmasına neden olan penil düz kas apoptozisinin ve fibrozis oluşumunun önlenmesi, birçok araştırmacı tarafından önemli hedefler olarak görülmektedir. Bu sebeple literatürde alternatif moleküler yolları hedef alan yeni terapötikler stratejiler üzerine yoğunlaşan birçok çalışma bulunmaktadır (108).

RP ile ilişkili ED modellenen prelinik çalışmalarda lokal veya sistemik olarak birçok nöromodulator ajan araştırılmaya devam edilmektedir. Bu temele dayandırılan birçok araştırma nörotrofik faktörler ve immünofilin liganlar ile hasarlanmış sinir rejenerasyonuna odaklanmış fakat başarılı bir nöronal rejenerasyon elde edilse bile EF'nin tam olarak geriye döndürülemediği bildirilmiştir (23, 128). Son dönemlerde immünofilin liganlar, beyin kökenli sinir büyüme faktörü (BDNF), glial hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF),

nörotrofin-3 (NT-3) ve büyüme farklılaşma faktörü-5 (GDF-5) gibi nörotrofinler, sonik hedhehog protein (SHH), glial büyüme faktörü (GGF-2); Ninjurin-1 proteini veya nörotrofik tirozin kinaz reseptörü tip 1'e (TrkA) karşı bazı monoklonal antikor tedavi yöntemleri prelinik çalışmalarda araştırılmaktadır (23, 128, 165).

İmmünofilin ligandlarının prelinik düzeyde sinir koruyucu ve rejenerasyonu indükleyici etkileri aracılığıyla EF'yi iyileştirdiği gösterilmiş olmasına rağmen klinik bir çalışmada takrolimus (FK506)'nın immünosupresif olmayan bir analogu olan GPI 1485, sinir koruyucu RP geçiren erkeklerde EF üzerine etkili bulunmamıştır (166-168).

Periferel sinir hasarı sonrasında MPG ve *Schwan* hücrelerinde düzeyi artan adhezyon proteini Ninjurin-1'in monoklonal antikor ile etkisizleştirilmesi nNOS pozitif sinirlerin rejenerasyonunu, EF'yi ve kavernöz endotelyumun hem yapısal hem de işlevsel olarak restore edilmesini başarılı bir şekilde desteklerken uygulanan tedavinin nörotrofik ve anjiyojenik etkileriyle RP ile ilişkili ED tedavisi için iyi bir alternatif olabileceği vurgulanmıştır (135).

Birçok çalışmada deneysel KS hasar modellerinde alternatif tedavi yaklaşımı olan testosteron uygulamasının tek başına veya PDE5 inhibitörleri ile kombine kullanımının olumlu sonuçları gösterilmiştir (18). Vignozzi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sıçan bilateral sinir rezeksiyonu sonrası tadalafilin testosteron ile kombinasyonunun penil dokunun perfüzyonunu sağladığı ve fibrozisi önlediği belirtilmiştir (169). Fakat penil rehabilitasyonda testosteron tedavisinin erektile fonksiyon üzerindeki etkinlik ve güvenilirliğini göstermek amacıyla daha fazla prelinik ve özellikle klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (149).

Yapılan klinik bir çalışmada penil kavernozal dokuda mineralokortikoid reseptör ve 11-beta-hidroksisteroid dehidrogenaz tip-2 mRNA ekspresyonları gösterilmiş; insan penil dokusunun aldosterona olan yanıtı ile ED arasında bir ilişki olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca aşırı mineralokortikoid reseptör ekspresyonu veya aktivasyonun inhibe edilmesinin ED tedavisi için terapötik strateji olabileceği vurgulanmıştır (170).

Son dönemlerde yeni tedavi alternatifleri olarak triiyodotironin, Rho kinaz inhibitörleri ve kök hücre tedavisi ile ilgili çalışmalar dikkat çekmektedir (137, 148, 171). Bu bağlamda, kök hücre temelli terapötik yaklaşımlar KS hasarından sonra korpus kavernozum mikro yapısını koruyarak ve KS rejenerasyonuna katkı sağlayarak ED'nin iyileştirilmesinde umut verici sonuçlar sunmuştur (23, 172). Benzer çalışmalarda

intrakavernöz olarak enjekte edilen insan adipoz kaynaklı kök hücrelerin (h-ADSCs) terapötik etkinliğinin kavernoza dokusu üzerinden ziyade MPG'ye yönelen kök hücrelerden kaynaklandığını kanıtlamıştır (173).

Araştırmacılar kök hücre tedavisinin yanı sıra, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (BFGF) gibi anjiyojenik büyüme faktörlerinin ED tedavisi üzerinde terapötik etkinliğini göstermiştir. Bae ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada güçlü bir anjiyojenik büyüme faktörü olan BFGF'nin deneysel BKSH modelinde farelerin penil subkutan dokusuna hidrojel aracılı enjeksiyonunun kavernoza endotelial ve düz kas morfolojisini düzelterek erektil işlevde kısmen de olsa iyileşme sağladığı gösterilmiştir (165). Sinir büyüme faktörü (NGF) ve reseptörü TrkA'nın, geç embriyonik ve postnatal dönemlerde sempatik nöronların gelişimi için gerekli olduğu bilinmektedir (108). KS hasarı sonrası sempatik sinirlerin parasempatik sinirlere göre daha hızlı yenilendiği ve penil ereksiyonu antagonize ettiği göz önünde bulundurulduğunda spesifik TrkA monoklonal antikor (TrkA-mAb) uygulamasının periferik sempatik nöronların rejenerasyonunu bloke ederek nöronal hasar sonrası gelişen ED tedavisinde etkili olabileceği düşünülmüştür. KS hasarı ardından TrkA-mAb'nin sıçanların majör pelvik ganglion veya korpus kavernoza dokusuna lokal olarak uygulanmasının korpus kavernoza dokusundaki tirozin hidroksilazı eksprese eden sempatik sinir liflerini önemli ölçüde azalttığı ve dorsal sinirdeki nNOS pozitif lifleri artırarak erektil fonksiyonun iyileşmesine katkı sağladığı gösterilmiştir (174).

Deneysel periferik nöropati modellerinde nörogulin büyüme faktörleri ailesinin bir üyesi olan GGF-2'nin sinir koruyucu ve iyileştirici etkileri gösterilmiştir. Sıçanlarda indüklenen BKSH modelinde GGF-2'nin aksonal bütünlüğü koruduğu ve aksonal fonksiyonları iyileştirdiği raporlanmıştır (10).

Çalışmalarda direkt sGC'yi aktive eden BAY 41-8543, BAY 60-4552 ve BAY 60-2730 gibi ajanların intakt endotelial ve/veya KS stimülasyonundan bağımsız olarak hücre içi cGMP konsantrasyonunu artırarak RP ile ilişkili ED tedavisinde etkili olabilecekleri konusunda umut verici sonuçlar elde edilmiştir (23, 175).

BKSH sonrası kavernoza dokuda RhoA/ROCK yolağının aktivasyonunun artması nedeniyle, bu sinyal yolağının Y-27632 ile inhibisyonu BKSH sonrası azalan NO biyoyararlanımını artırıp, kavernoza apoptozisi azaltarak RP ile ilişkili ED için uygun bir terapötik yaklaşım olabileceği ileri sürülmüştür (107). Yapılan farklı çalışmalarda



RhoA/ROCK yolağının inhibisyonunun aksonal rejenerasyon, kavernoza düz kas hücre apoptozisi ve doku fibrozisini azaltarak RP ile ilişkili ED tedavisinde etkili bir terapötik hedef olabileceği gösterilmiştir (138-140).

A-II, vazokonstriksiyon ve TGF- $\beta$ 1/Smad aracılı fibrozisi indükleyen önemli bir endojen mediyatördür. A-II reseptör blokörlerinin RP ile ilişkili ED üzerindeki olası terapötik etkisini değerlendirmek amacıyla yürütülen prelinik çalışmalarda önemli sonuçlar elde edilmiştir (133, 146). Sinir koruyucu radikal retropubik prostatektomi sonrasında hastalarda irbesartan uygulamasının EF üzerine etkisini retrospektif olarak değerlendirmek amacıyla yürütülen klinik bir çalışmada, preoperatif erektil işlevi normal olan hastalarda operasyondan sonra düzenli irbesartan kullanımının ameliyat sonrası azalan erektil kapasiteyi potansiyalize edebileceği belirtilmiştir (106).

BKSH modellerinde fibrotik hastalıklarla ilişkili histon deasetilaz (HDAC)'ın penil dokudaki genetik ekspresyonu değişmektedir. HDAC inhibisyonunun artan kavernoza fibrozis ve azalan erektil cevap üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada; HDAC inhibitörü olan valproik asitin hasardan sonraki 14. günde artan HDAC4 ve fibronektin ekspresyon seviyelerini azalttığı, gelişen kavernoza fibrozis ve erektil cevaplarda anlamlı bir iyileşme sağladığı gösterilmiştir. HDAC/TGF- $\beta$ 1/Smad yolağının fibrotik ve nörodejeneratif süreçler üzerindeki muhtemel etkisi sebebiyle HDAC inhibisyonunun RP ile ilişkili ED tedavisinde önemli bir stratejik hedef olabileceği belirtilmiştir (163). Lin ve arkadaşları tarafından COX-2 ve prostasiklin sentaz aktivatörü olarak tasarlanmış bir protein olan COX2-10aa-PGIS'in 28 günlük sıçan BKSH modeli sonrası TGF- $\beta$ 1 ekspresyonunu azaltırken eNOS ekspresyonunu artırdığı; antifibrotik ve antiapoptotik süreçleri etkileyerek erektil fonksiyonu iyileştirdiği gösterilmiştir (176).

Etkinlik ve güvenilirliklerine ilişkin yeterli bilimsel kanıt olmamasına rağmen son yıllarda ED tedavisinde geleneksel bitkisel ürünlerin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Bu sebeple bu konu ile ilgili farklı ED modellerinin kullanıldığı çalışmalar önem kazanmıştır (23, 177). Wu ve arkadaşları, *Ginkgo biloba* total ekstresinin (farklı dozlarda) sıçanlarda indüklenen BKSH modelinde ED üzerindeki etkisini incelemek için yaptıkları çalışmada; EF'nin anlamlı derecede iyileştiği fonksiyonel, histolojik ve moleküler verilerle desteklenerek gösterilmiş; bu durum total ekstrenin nörorejeneratif etkisiyle ilişkilendirilmiştir (178). Başka bir çalışmada *Epimedium* yaprak ekstresinden elde edilen İkariin adlı bileşiğin KSH modeliyle indüklenen ED üzerindeki etkisini incelemek için in-

vivo ve in-vitro çalışmalar yapmışlar ve gösterilen olumlu etkiden ikariin'in bilinen PDE5 inhibitörü etkisine ek olarak nörotrofik özellikleri sorumlu tutulmuştur (179). Benzer şekilde *Panax ginseng*, *Tribulus terrestris* ve *Lepimedium meyenii* gibi geleneksel tıpta afrodisyak etkileri sebebiyle kullanılan bitkilerin çeşitli sebeplerle gelişen ED'nin tedavisi amacıyla prelinik ve/veya klinik çalışmalara konu olduğu bilinmektedir (180-182).

Tüm bu yolak ve mediatörlerin RP ile ilişkili ED gelişimindeki etkinlik derecesi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, etkin ve tolere edilebilir bir tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple konuyla ilgili birçok prelinik ve klinik çalışma yapılmakta; hastalığın patofizyolojisi hakkında daha kesin bilgiler ve rasyonel tedavi stratejileri elde edilmeye çalışılmaktadır (18).

## **2.5. DeneySEL Erektıl Disfonksiyon Modelleri**

Etiyolojik anlamda ED gelişimine neden olan risk faktörlerinin çokluğu ve sebep oldukları patofizyolojik süreçlerin karmaşıklığı, deneySEL çalışmalarda kullanılmak üzere seçilecek olan ED modellerinin tasarlanması, optimizasyonu ve uygulanabilirliği açısından oldukça önemlidir (6, 183). Yapılan ilk deneySEL ED çalışmalarında bazı primat türleri, köpek, kedi ve tavşan gibi deney hayvanları kullanılmış ve konuyla ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir (184, 185). Rodentlerin insan genomu ile benzer homolojiye sahip olması, seksüel özelliklerinin fonksiyonel ve morfolojik anlamda insanlarla benzerlik göstermesi, deney manipülasyonuna uygunlukları, kolay temin edilebilirlikleri, ekonomik olmaları, kısa yaşam süreleri, iyi yapılandırılmış modelleme protokolleri ve deney sonuçlarının tekrar edilebilirliği; sıçan ve farelerin kullanıldığı modelleri son dönemlerde ED çalışmalarında daha popüler hale getirmiştir (184-186). Çok sayıda avantajı olmasına rağmen, cinsel davranışları daha çok koku uyaranlarına bağlı olan rodentlerin, görsel ve işitsel uyaranlarca indüklenen insan cinsel davranışları ve ED'nin karmaşık yapısını tam olarak temsil edemeyeceği de bir gerçektir (187).

Bu kapsamda kullanılan deneySEL ED modellerinin bazıları; başta DM ve KS hasarı ile indüklenen modeller olmak üzere, yaşlanma modelleri, dislipidemi modelleri, HT modelleri, kastrasyon modelleri, sigara kullanım modelleri, kronik renal yetmezlik modelleri, spinal kord hasarı gibi organik modeller, stresle indüklenen organik olmayan modeller, bilateral internal iliak arter ligasyon modeli, korporal VOD modeli, radyasyon ile indüklenen modeller ve priapizm modelleri olarak sıralanabilir (183-185). Bunlardan diyabetik ED ile ilgili yapılan çalışmalarda; streptozotosin başta olmak üzere çeşitli kimyasal

ajanların (alloksan vb.) pankreas  $\beta$  hücrelerini tahrip etmesiyle oluşturulan DM modelleri, cerrahi yöntemlerle (total pankreatektomi) oluşturulan DM modelleri, diyet ile oluşturulan DM modelleri, spontan DM modelleri ve genetiği değiştirilmiş hayvan DM modelleri gibi farklı tip-1 ve tip-2 DM modellemeleri kullanılabilmektedir (183).

Mevcut deneysel modeller ereksiyonun nörofizyolojisi ve ED'nin patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına; bu alandaki yeni terapötik ajanların ve cerrahi prosedürlerin keşfedilmesine olanak sağlamışsa da klinik durumu daha iyi yansıtan deneysel modellere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple ED'yi en iyi şekilde taklit eden farklı hayvan modellerinin geliştirilmesi amacıyla yürütülen modifikasyon çalışmaları tüm hızıyla devam etmektedir (183, 184).

### **2.5.1. Kavernöz Sinir Hasar Modelleri**

Bu alandaki ilk bilimsel çalışmalar 19. yüzyılın ikinci yarısında köpeklerde pelvik sinirin ereksiyonda etkin rol oynadığının gösterilmesiyle başlamıştır (188). Langworthy ve arkadaşları 1965 yılında sıçanlarda pelvik sinirleri ilk kez tanımlayarak korpus kavernozum invazyonu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir (183). Lewis ve arkadaşları 1968 yılında boğalarda İKB ölçümünü gerçekleştirmişlerdir (189). 1983 yılında ise Walsh ve arkadaşları pelvik invazyonu sağlayan nöronal demetlerin RP cerrahisi sırasında hasarlanmasının RP ile ilişkili ED gelişiminde etkili olduğunu doğrulamışlardır (190). Tüm bu gelişmeler ardından RP ile ilişkili ED'nin prelinik yansıması olan deneysel KS ablasyon modeli (sıçanlarda) ilk kez 1989 yılında Quinalan ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (191).

Prelinik çalışmalarda RP ile ilişkili ED'nin taklit edilmesi amacıyla kullanılan KS hasar modelleri; MPG'den köken alan ve prostatın dorsolateralinde bilateral seyrederek EF'nin düzenlenmesinde rol alan KS'lerin çeşitli yöntemlerle hasarlanması sonucu oluşturulmaktadır. Tasarlanan modeller, MPG'nin 2-3 mm distalinden forseps veya klemp kullanılarak oluşturulan basınç uygulanmasıyla indüklenen sıkıştırma (*crush*) hasarı başta olmak üzere; KS'lerin dondurulması, gerilmesi, transeksiyonu ve eksizyonu gibi yöntemlerle oluşturulabilmektedir (183, 185, 186). KS dondurulması metodu sıkıştırma metoduna benzer şekilde sinir kılıfını bozmayan ve rejenerasyon çalışmalarında kullanılan bir yöntemdir. Transeksiyon ve eksizyon yöntemleri ise sinir koruyucu olmayan RP sırasında uyarının unilateral ve/veya bilateral olarak ortadan kalktığı daha ciddi yaralanmaları temsil etmektedir. Buna göre bilateral KS eksizyonu, reinervasyona izin vermediği için penil denervasyonun uzun vadeli morfolojik çalışmalarının değerlendirilmesi

amacıyla tercih edilmektedir. Tek taraflı KS hasarının gerçekleştiği pelvik operasyonları temsil eden unilateral hasar modelleri ise araştırmacıların aynı hayvanda hem hasar hem de kontrol ölçüm sonuçlarını karşılaştırmasına olanak sağlaması sebebiyle tercih edilmektedir (185).

Preklinik çalışmalarda çift taraflı sinir koruyucu RP sırasında meydana gelen kısmi sinir hasarını taklit etmek amacıyla çoğunlukla BKSH modelleri tercih edilmektedir (13, 15). Bu model daha çok penil ereksiyonunun fonksiyonel iyileşmesini kolaylaştırabilecek nörorejeneratif ve nöroprotektif ajanlarla ilgili çalışmalarda kullanılırken; kavernoza dokü bütünlüğünün bozulmasını önleyebilecek antifibrotik stratejilerin değerlendirilmesi amacıyla da kullanılabilir (15, 183). Modeller bir klemp veya forseps ile KS'lerin mekanik olarak belirli bir süre sıkıştırılması esasına dayanmaktadır. Sıkıştırma süresi, şiddeti ve tekrar aralıkları çalışmanın amacına göre tasarlanmaktadır. Bu kapsamda forseps yardımıyla 15'er sn'lik üç set veya hemostatik klemp ile yapılan ikişer veya üçer dk'lık sürekli sıkıştırma gibi farklı protokoller içeren KS hasar modelleri kullanılabilir (15, 166, 192).

### 2.5.2. Eretil Fonksiyonun *In vivo* Değerlendirilmesi

Eretil cevabın fonksiyonel anlamda oluşturulması ve incelenmesinde kullanılan en yaygın yöntem; karmaşık bir cerrahi operasyon sonrasında, submaksimal elektriksel KS stimülasyonu sonucu oluşan intrakavernöz basınç (İKB) ve ortalama arteriyel basınç (OAB)'nin eş zamanlı ölçülmesi ardından maksimum-İKB/OAB (m-İKB/OAB), total-İKB/OAB (t-İKB/OAB) ve delta-İKB/OAB ( $\Delta$ -İKB/OAB) oranlarının değerlendirilmesidir (184, 193). Bu şekilde hem arteriyel basınç hem de kavernoza dokudaki basınç değişiklikleri aynı anda yorumlanabilmektedir. Değerlendirme kapsamında sistemik kan basıncında artmaya veya azalmaya sebep olabilecek ajanların m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB üzerindeki etkileri analiz edilmektedir (184). KS nörotomisi gibi elektriksel sinir stimülasyonunun yapılamadığı durumlarda ise eretil cevabın elde edilebilmesi amacıyla papaverin gibi intrakavernöz enjeksiyon uygulamalarından faydalanılabilmektedir (127).

Hipotalamik PVA ve MPOA gibi santral merkezlerin stereotaktik kimyasal ajanlarla (oksitosin, NMDA, apomorfin, dopamin ve agonistleri) veya elektriksel stimülasyon ile uyarılması, ereksiyonun santral mekanizmalarının araştırılması amacıyla kullanılabilen diğer yöntemlerdir (52, 194). İKB ve OAB ölçümleri sırasında sonucu etkileyebileceği düşünülen medikal uygulamaların önüne geçebilmek adına geliştirilen telemetrik sistemler

aracılığıyla ölçülen basınç değişikliklerinin kaydedildiği çalışmalar anestezi uygulamalara ihtiyaç duyulmadığından son derece kullanışlıdır (195). Ayrıca literatürde bazı çalışmalarda bazal İKB değeri, tūmesans zamanı ve elektriksel stimölasyonun sonlandırılmasından sabit bazal İKB'ye kadar geçen süre olan detūmesans zamanı gibi parametreler EF değeriendirilmesinde kullanılmaktadır (183, 196).

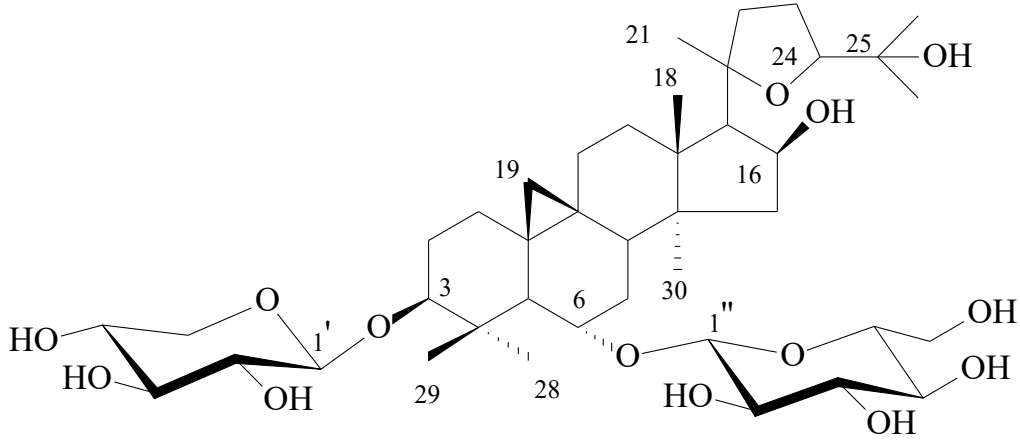
Deney hayvanlarının cinsel davranışlarının değeriendirilmesinde çiftleşme testi, temassız ereksiyon testi ve refleksif ereksiyon testleri gibi davranış modelleri de kullanılabilir (185). Bazı çalışmalarda ise apomorfın gibi ajanların enjeksiyonundan sonraki ilk 30 dk boyunca os penisinin görünür hale gelmesi ile karakterize olan ereksiyon sayısının kaydedilmesiyle EF değeriendirilmektedir (84).

## **2.6. Astragalozit IV**

### **2.6.1. Astragalozit IV'ün Kökeni ve Kimyasal Yapısı**

*Astragalus membranaceus*, kökleri (radix Astragali) Geleneksel Çin Tıbbı'nda yaygın olarak kullanılan ve halk arasında "huang qi" olarak bilinen, Çin Farmakopesi'ne kayıtlı (ISBN 978-7-5067-8929-5-2015) terapötik değere sahip bir tıbbi bitkidir. Yapılan deneysel çalışmalarda radix Astragali'nin kardiyoprotektif, renoprotektif, hepatoprotektif, immünoregölator, antioksidan, antiinflamatuvar, antifibrotik vb. özelliklere sahip olduğu raporlanmıştır (26, 197). *Astragalus membranaceus* köklerinin bu geniş terapötik kullanımı başta astragalozitler olmak üzere çeşitli sekonder metabolitlerinin sorumlu olduğu bilinmekte olup yapılan izolasyon ve yapı aktivite çalışmaları neticesinde bu sekonder metabolitlerin birçoğu aydınlatılmıştır (26, 198).

Astragalozit IV (AS-IV) Çin Farmakopesine kayıtlı radix Astragali içeren preparatların kalite kontrolünde kullanılan major biyoaktif komponent olarak kabul edilmektedir (198). Birçok *Astragalus* türünden izole edilebilen sikloartan-tip triterpenik saponin olan AS-IV'ün (3-O- $\beta$ -D-ksilopiranozil, 6-O- $\beta$ -D-glukopiranozil-20(R), 24(S)-epoksi-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,25-tetrahidroksisikloartan) hidrofobik bir aglikona bağı hidrofilik gruplardan oluşan moleköler yapısı Şekil 11 'da gösterilmiştir (199).



**Şekil 11.** Astragalozit IV'ün kimyasal yapısı ( $C_{41}H_{68}O_{14}$ )

### 2.6.2. Astragalozit IV'ün Farmakokinetik Özellikleri ve Güvenilirliği

Bileşiklerin farmakokinetik profili farmakolojik ve toksikolojik özelliklerinin karakterizasyonunda önemli rol oynar (200). Son yıllarda konuyla ilgili birçok çalışma yapılmış olsa da AS-IV'ün farmakokinetik özellikleri ile ilgili veriler sınırlıdır. Planlanacak yeni çalışmaların ise özellikle AS-IV'ün biyotransformasyonuna ait aydınlatılmayı bekleyen süreçlerin ve farmakolojik etki profilininin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir (199, 200).

Yapılan ilk prelinik çalışmalarda, AS-IV'ün görece lipofilik özelliklerde olmasına rağmen yüksek molekül ağırlığı (784 g/mol) ve sudaki zayıf çözünürlüğü sebebiyle oldukça zayıf bir membran permeabilitesi ve dolayısıyla absorpsiyon oranına sahip olduğu gösterilmiştir (201-203). Gu Y ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada AS-IV'ün sıçanlara tek doz (20 mg/kg) oral solusyon şeklinde uygulandığında biyoyararlanımının %2.2, yarılanma ömrünün ise 4.65 saat ve sanal dağılım hacminin 0.56 L/kg; intravenöz tek doz uygulama (2.5 mg/kg) sonrasında ise yarılanma ömrünün 3.37 saat ve sanal dağılım hacminin 0.77 L/kg olduğu saptanmıştır. Ayrıca AS-IV'ün düşük oral biyoyararlanımında bir dışa-atım proteini olan p-glikoproteininin etkisinin olmadığı ve Çin Farmakopesi'ndeki kullanımına uygun şekilde ham kök ekstresi içinde uygulandığında biyoyararlanımının artış gösterebileceği in-vitro deneysel modelleme çalışmalarında gösterilmiştir (201). Benzer çalışmalarda sıçan ve köpeklerde oral AS-IV uygulaması sonrasında gastrointestinal sistemden emiliminin ve biyoyararlanımın düşük olduğu (sırasıyla 20 mg/kg dozda %2.2-3.66 ve 10 mg/kg dozda %7.4), enterohepatik sıklusa girdiği ve plazma proteinlerine

bağlanma oranının yüksek olduğu (%83-90) bildirilmiştir (204, 205). Sıçanlarda parenteral (1.5 mg/kg i.v.) uygulama sonrasında karaciğer, akciğer ve böbreklerde daha yüksek konsantrasyonda olmak üzere geniş bir doku dağılımı gösterdiği saptanmıştır (204, 206). Biyoyararlanımının düşük olması, çözünürlük ve stabilite problemi olan AS-IV'ün bu özellikleri sistemik etkilerinin değerlendirileceği prelinik ve klinik çalışmalarda kullanımını kısıtlamaktadır (199, 203).

Cheng ve arkadaşları sıçanlarda AS-IV'ün başta hidroliz, dehidrojenasyon, glukuronizasyon ve sülfatasyon olmak üzere biyotransformasyon reaksiyonları sonucunda 22 farklı metabolitin oluştuğunu göstermişlerdir (200). Farklı bir çalışmada AS-IV'ün ana metaboliti olan sikloastragenolun in vivo uygulamada UDP glukuronil transferaz 1A8 ve 2B7 enzim aktivitelerini inhibe ettiği bildirilmiştir (207). AS-IV'ün bağırsak mikrobiyotası tarafından ilk geçiş etkisine uğratarak farklı farmakolojik aktivitelere sahip metabolitlerinin oluştuğu ve bunların AS-IV ile birlikte sistemik dolaşıma katıldığı da bilinmektedir (198, 208).

AS-IV'ün in vivo ve in vitro toksisitesi ve potansiyel advers etkileri hakkında çalışmalar sınırlıdır. Bazı prelinik araştırmalarda AS-IV'ün peripartum dönemde dikkatli kullanılması gerektiği raporlanmıştır (209, 210). Xu M ve arkadaşlarınca yürütülen klinik bir araştırmada (faz-1), AS-IV'ün tek veya çoklu doz intravenöz uygulanması sonrasında birinci derece farmakokinetik özelliklere sahip, yarılanma ömrü yaklaşık 2.5 saat olan güvenli ve tolere edilebilir bir bileşik olduğu bildirilmiştir (211).

### **2.6.3. Astragalozit IV'ün Farmakolojik Profili**

Literatürde AS-IV'ün antikanser, immünoregulator, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, renoprotektif, yara iyileştirici, antidiyabetik, antiastmatik, antiinflamatuvar, antioksidan, nöroprotektif, nörorejeneratif, antiapoptotik ve antifibrotik etkinliğini gösteren birçok deneysel çalışma bulunmaktadır (24-26). Son yıllarda AS-IV'ün RP ile ilişkili ED patofizyolojisi ile de yakından ilişkili olan nörodejeneratif, inflamatuvar, oksidatif, apoptotik ve fibrotik süreçler üzerindeki etkilerinin raporlandığı çok sayıda in vitro ve in vivo çalışma bulunmaktadır (24-30).

AS-IV'ün, bilişsel bozukluğun eşlik ettiği nörodejeneratif bozuklukların önlenmesi ve tedavisinde etkili olabileceğini gösteren çalışmalarda; AS-IV'ün serebral iskemi/reperfüzyon hasarı sonrası sinir rejenerasyonuna katkıda bulunduğu, fare

hipokampusunda aksonal büyüme hızlandırdığı, nöronal atrofi ve hafıza kaybını önlediği, hipokampal nöronlarda spontan sinaptik ileti ve senkronik  $Ca^{+2}$  hareketliliğini (salınımı) baskılayabileceği gösterilmiştir (212-220). Yue ve arkadaşları AS-IV'ün PC12 primer hücre kültüründe glutamatla indüklenen nörotoksisite modelindeki sinir koruyucu etkisinden Raf/MEK/ERK yoluyla inhibisyonunun sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir (221).

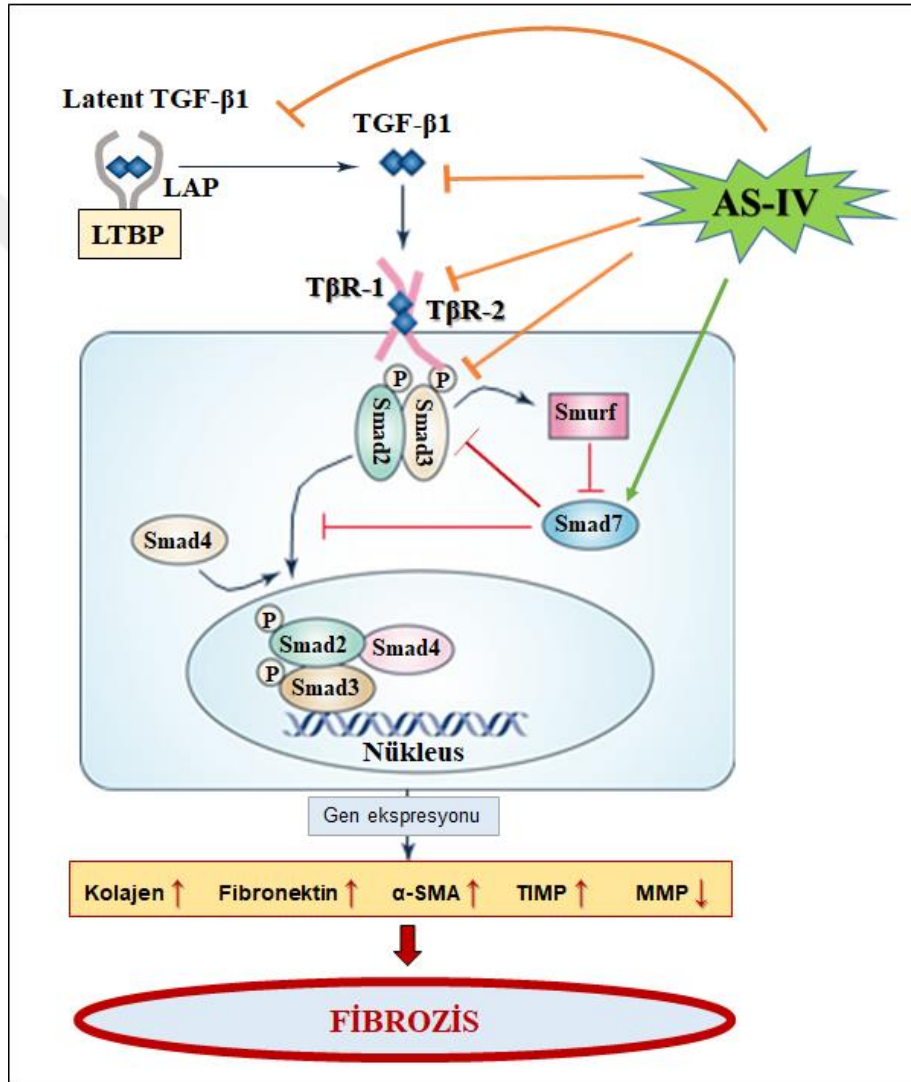
Wang X ve arkadaşları tarafından yürütülen in-vivo ve in-vitro çalışmada; AS-IV alzheimer hastalığı patofizyolojisinde etkili olan BACE1 aktivitesini baskılayan ve  $\beta$ -amiloid plak oluşumunu önleyen antifibrotik etkilere aracılık eden nükleer hormon reseptörü PPAR $\gamma$ 'nın agonisti olarak tanımlanmıştır (212). TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağında rol oynayan mediyatörler ile PPAR $\gamma$  birbirlerinin ekspresyon ve aktivasyonlarını negatif yönde regüle etmektedir (159). PPAR $\gamma$  agonistlerinin nöroprotektif ve nörorejeneratif özellikleri yanında antifibrotik, antioksidan ve antiapoptotik özellikleri göz önünde bulundurulduğunda kavernozal dokudaki yapısal değişiklikleri önleyerek RP ile ilişkili ED tedavisinde terapötik potansiyele sahip olabilecekleri düşünülmektedir (222-224). PPAR $\gamma$  agonistlerinin birçok kanser türünün patogeneğinde rol oynayan TGF- $\beta$ 1/Smad yolağının farklı basamakları üzerinden antitümörojenik aktivite gösterdiği bilinmektedir (153). Zhao ve arkadaşlarınca yapılan bir çalışmada AS-IV'ün TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağının regülasyonu (T $\beta$ -RII ve Smad4 seviyelerini artırarak) ile SW962 vulvar skuamöz hücreli karsinom hücre hattı proliferasyonunu engellediği; ayrıca hücrelerin apoptozis ve otofajisini de indüklediği gösterilmiştir (225).

Kesin etki mekanizması bilinmemekle birlikte, AS-IV'ün antifibrotik etkisi TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağının inhibisyonu başta olmak üzere, TGF- $\beta$ 1/non-Smad, MAPK (ERK1/2, P38, JNK), NF- $\kappa$ B ve Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı gibi farklı hücre içi sinyal yolaklarının regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (24, 226, 227) AS-IV'ün fibrotik süreçlerin ana düzenleyicisi olarak kabul edilen TGF- $\beta$ 1/Smad sinyalizasyonunun farklı basamaklarındaki olası hedefleri Şekil 12'de gösterilmiştir (20).

Yu ve arkadaşları AS-IV'ün sıçanlarda bleomisin ile indüklenen pulmoner fibrozis üzerine etkilerini inceledikleri bir çalışmada, antifibrotik etkinin AS-IV'ün antioksidan ve antiinflamatuvar etkileriyle ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir (228). Başka bir çalışmada ise AS-IV'nin umbilikal ven endotel hücre hattında  $H_2O_2$  ile indüklenen vasküler endotelial hücre apoptozisine karşı koruyucu etkisi gösterilmiş; mevcut etki çeşitli hücre tiplerindeki apoptotik süreçlerde oldukça etkin rol oynayan TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağının



inaktivasyonu sonucu azalan Nox4 ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (229). Yapılan farklı çalışmalarda AS-IV'ün JNK ve/veya p38 MAPK aktivasyonunu inhibe ederek renal ve hepatik fibrozisi engelleyebileceği belirtilmiştir (19, 230). Yuan ve arkadaşları ise AS-IV'ün karaciğer stellat hücre hattında (HSC-T6) TGF- $\beta$ 1 ile indüklenen kolajen-I, kolajen-III ve  $\alpha$ -SMA ekspresyon artışını engellemekle birlikte MMP-2/TIM-2 oranını konsantrasyon bağımlı şekilde artırdığını göstermişlerdir (30).



**Şekil 12.** AS-IV'ün TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağının farklı basamaklarındaki hedefleri (Tang'dan, 20)

AS-IV'ün domuz serumu ile indüklenen hepatik fibrozis üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla yürütülen in-vivo ve vitro çalışmalarda; TGF- $\beta$ 1 seviyesi, kolajen sentezi ve karaciğer uydu hücre proliferasyonunun AS-IV tedavisi sonrası anlamlı derecede

azaldığı ve fibrozis gelişiminin engellendiği gösterilmiştir (231). Zhang ve arkadaşları peritoneal fibrozis gelişiminde önemli bir rolü olan peritoneal mezotelyal hücrelerin epitelyal mezenkimal hücrelere dönüşüm sürecinde, AS-IV'ün HMrSV5 hücre serisinde TGF- $\beta$ 1 (2ng/ml) ile indüklenen epitelyal mezenkimal dönüşümü T $\beta$ -R1 ve T $\beta$ -R2 seviyelerini değiştirmeden Smad7 ekspresyonunu artırarak doğrudan Smad7 aracılı Smad2/3 aktivasyonunu azaltmak suretiyle engellediğini raporlamışlardır (232). Yapılan bir çalışmada AS-IV'ün koksakivirüs B3 ile indüklenen miyokardial fibrozisi TGF- $\beta$ 1/Smad yolağı inaktivasyonunu aracılı kolajen-I ekspresyonunu azaltarak engelleyebileceği gösterilmiştir (233). Benzer bir çalışmada Yanchun ve arkadaşları AS-IV'ün izoproterenol ile indüklenen kardiyak fibrozis üzerindeki antifibrotik etkisini miR-135a-TRPM7-TGF- $\beta$ 1/Smad yolağı üzerindeki inhibitör etkisi ile ilişkilendirmiştir (27). AS-IV'ün renoprotektif etkisinin altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmak amacıyla tasarlanan bir in-vivo araştırmada SD sıçan unilateral üreteral obstrüksiyon (UUO) modeli sonrasında AS-IV tedavisinin Smad7 upregülasyonu ve TGF- $\beta$ 1, CTGF, pSmad2/3 down regülasyonu ile renal tübülo-interstisyel fibrozisi azalttığı gösterilmiştir. Yapılan in-vitro çalışmalardan elde edilen ek verilerde, mevcut etkiden Smad7 aracılı TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı inaktivasyonunun sorumlu olabileceği vurgulanmıştır (29). Qing ve arkadaşları bleomisin ile indüklenen in vivo ve in vitro sistemik skleroz modelinde AS-IV'ün doz veya zaman bağımlı antifibrotik etkisi, mRNA ve protein seviyesinde azalan kolajen-I ve fibronektin ekspresyonları ile gösterilmiştir. AS-IV'ün bu etkisi TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı aktivasyonunun TGF- $\beta$ 1 ve pSmad3 düzeyinde inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (234).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışma, KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Protokol No: 2019/34, Ek-1). Çalışmada, KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezi Laboratuvarı'ndan temin edilen (10-12 haftalık) 72 adet Sprague-Dawley erkek sıçan (308-385 g) kullanıldı. Sıçanlar KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezi'nde, pleksiglas kafes içerisinde 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda ve uygun sıcaklık ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) ve nem (%60) koşullarında barındırıldı. Sıçanlara yem ve su *ad libitum* sağlandı.

Sıçanların vücut ağırlıkları deney protokolünün ilk ve son gününde genel sağlık durumlarının değerlendirilmesi amacıyla kaydedildi. Kafeslere, sorumlu araştırmacı tarafından deney protokolü ve deney hayvana ait kimlik bilgilerini içeren deney hayvanı kafes kartı etiketi yapıştırıldı (Resim 2).

| <b><u>DENEY HAYVANI KAFES KARTI</u></b>        |                             |                                                     |             |
|------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------|-------------|
| <b>KTÜ Eczacılık Fakültesi/Farmakoloji AbD</b> |                             | <b>Arş. Gör. Serhat SEVGİ / Tel:</b> 0344 222 06 06 |             |
| <b>Deney Hayvan Grup/No</b>                    | ...                         | <b>Deney Başlangıç ve Bitiş tarihi (Gün/ay/yıl)</b> | ... / ...   |
| <b>Tür/İrk</b>                                 | <b>Sprague-Dawley Sıçan</b> | <b>Vücut Ağırlığı (g)</b>                           | ...         |
| <b>Cinsiyet</b>                                | Erkek                       | <b>Yaş</b>                                          | 10-12 hafta |
| <b>Proje No</b>                                | BAP-TDK-2020-8749           | <b>Etik Kurul Protokol No</b>                       | 2019/34     |
| <b>NOT:</b>                                    |                             |                                                     |             |

**Resim 2.** Çalışmalarda kullanılan deney hayvanı kafes kartı örneği

##### 3.1.2. Alet ve Cihazlar

Çalışmamızdaki fonksiyonel, histopatolojik ve moleküler incelemeler kapsamında kullanılan alet ve cihazlar Tablo 1'de sunulmuştur.

**Tablo 1.** Kullanılan alet ve cihazlar

| <b>Adı</b>                          | <b>Marka ve üretim yeri</b>             |
|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| Buzdolabı                           | Arçelik, Türkiye                        |
| Buz makinesi                        | Uğur UMB30, Türkiye                     |
| Cerrahi ipek iplik (3/0)            | Medipac, Greece                         |
| Cerrahi ipek iplik (4/0)            | Medipac, Greece                         |
| Cryo tüp                            | Isolab-091.11.102, Türkiye              |
| Cryo tüp kutusu                     | Isolab-093.02.001, Türkiye              |
| Doku takip kaseti kapaklı (plastik) | Isolab-07403001, Türkiye                |
| Derin dondurucu (-20 °C)            | Arçelik, Türkiye                        |
| Derin dondurucu (-80 °C)            | Thermo Scientific, ABD                  |
| Deiyonize su cihazı                 | Sartorius, Almanya                      |
| Elektriksel alan stimülatörü        | MAY, Türkiye                            |
| Etüv                                | Magatarm, Türkiye                       |
| Görüntüleme cihazı                  | ChemiDoc-It2-UVP Ltd, England           |
| Hassas Terazi                       | Ohaus, Türkiye                          |
| Hemostat klemp (curved smooth)      | FST-13021-12, Almanya                   |
| Homojenizatör                       | Qiagen, ABD                             |
| Işık mikroskobu                     | Olympus BX51; Olympus Co., Tokyo, Japan |
| İnhaler anestezi cihazı             | E-Z Systems Inc., ABD                   |
| Jel kaset ve tarakları              | Invitrogen, ABD                         |
| Kaba terazi                         | Premier, Türkiye                        |
| Lam (Rodajlı)                       | Isolab-075.05.004, Türkiye              |
| Lamel (24/60 mm)                    | Isolab-075.01.007, Türkiye              |
| Membran çalkalayıcı                 | Thermo Scientific, ABD                  |
| Mikroskoba entegre kamera           | Olympus DP 71 Olympus Co., Japan        |
| Mikro-santrifüj tüpleri             | Isolab-078.03.001, Türkiye              |
| Mikrotom                            | RM 2255; Leica Inst., Nussloch, Almanya |

**Tablo 1. (Devam)**

|                                |                                            |
|--------------------------------|--------------------------------------------|
| Mikrotom bıçağı                | Feather, FE 2007500011                     |
| Otomatik pipetler              | Eppendorf Research, ABD                    |
| PCR tüp                        | Isolab-123.01.005, Türkiye                 |
| Platin elektrod                | Grass Technologies, ABD                    |
| Santrifüj cihazı (soğutmalı)   | Sigma, ABD                                 |
| Tank (sıvı azot)               | Isotherm, Türkiye                          |
| Qubit® 3.0 Fluorometer cihazı  | Thermo Fisher Scientific, Cat No: Q33216   |
| Dikey jel elektroforez sistemi | Invitrogen (XCell SureLock Mini-Cell), ABD |
| Veri kayıt sistemi             | BIOPAC M35, ABD                            |
| Vorteks                        | Isolab, Türkiye                            |

### 3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal ajanlara ait bilgiler Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 2. Kullanılan kimyasallar**

| Adı                      | Marka ve Kodu              |
|--------------------------|----------------------------|
| Astragalozit IV          | abcr, AB 479150            |
| Dimetil sülfoksit (DMSO) | Sigma, 276855              |
| Entellan                 | Merck, 107961              |
| Etanol (absolü)          | Isolab, 920.026, 64-17-5   |
| Etanol (%96)             | Isolab, 920.052, 67-56-1   |
| Formaldehit %37          | Tekkim, TK-911012          |
| Heparin                  | Nevparin®, Mustafa Nevzat  |
| İzofluran                | Forane ®, Abbott           |
| Ketamin HCl              | Ketalar®, Pfizer           |
| Ksilazin (%2)            | Rompun®, Bayer             |
| Ksilen                   | Isolab, 990.019, 1330-20-7 |

**Tablo 2. (Devam)**

|                                      |                              |
|--------------------------------------|------------------------------|
| Metanol                              | Isolab, 947.046, 67-56-1     |
| Parafin (granül)                     | Tekkim, 200661.00502         |
| Parasetamol                          | Partemol®, Vem İlaç          |
| Proteaz inhibitör karışımı           | Sigma, P8340                 |
| Povidon iyot (%10)                   | Batiodin®, Angelini İlaç     |
| Sığır serum albümin (BSA)            | Capricorn Scientific, BSA-1U |
| Tween 20                             | Sigma, P1379                 |
| Tris tamponlu salin (TBS-10X)        | Cell Signaling Tech.,#12498  |
| %0.9'luk izotonik sodyum klorür (SF) | Medifleks, Koçak Farma       |

### 3.1.4. Antikorlar

Moleküler analizlerde kullanılan altı adet primer ve bir adet sekonder antikora (anti-goat IgG HRP-linked antibody) ait bilgiler Tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo 3. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar**

| Adı                                            | Marka, Kod ve Seyreltme oranı           |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Anti- $\beta$ aktin antikoru                   | St. John's Laboratory, STJ91464, 1:1000 |
| Anti-Fibronectin antikoru                      | FineTest, FNab03122, 1:1000             |
| Anti-pSmad2 (Ser <sup>465/467</sup> ) antikoru | Cell Signaling Tech., 3108, 1:1000      |
| Anti-Smad2/3 antikoru                          | Cell Signaling Tech., 3102, 1:1000      |
| Anti-Smad7 antikoru                            | Abcam, ab216428, 1:1000                 |
| Anti-TGF- $\beta$ 1 antikoru                   | FineTest, FNab09851, 1:1000             |
| Anti-rabbit IgG HRP-linked antikoru            | Advansta, R05072-500, 1:10000           |

### 3.1.5. Kitler

Çalışma kapsamında histopatolojik ve moleküler incelemelerde kullanılan kitlere ait bilgiler Tablo 4'te yer almaktadır.

**Tablo 4.** Kullanılan kitler

| Adı                            | Marka ve Kodu                     |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| GBL Masson Trikrom Boyama Kiti | GBL San. Tic. Lim. Şti., 5022-100 |
| Qubit® Protein Assay Kits      | Thermo Fisher Scientific, Q33211  |
| İblot transfer kiti            | Invitrogen, IB301001              |

### 3.1.6. Çözelti ve Tamponlar

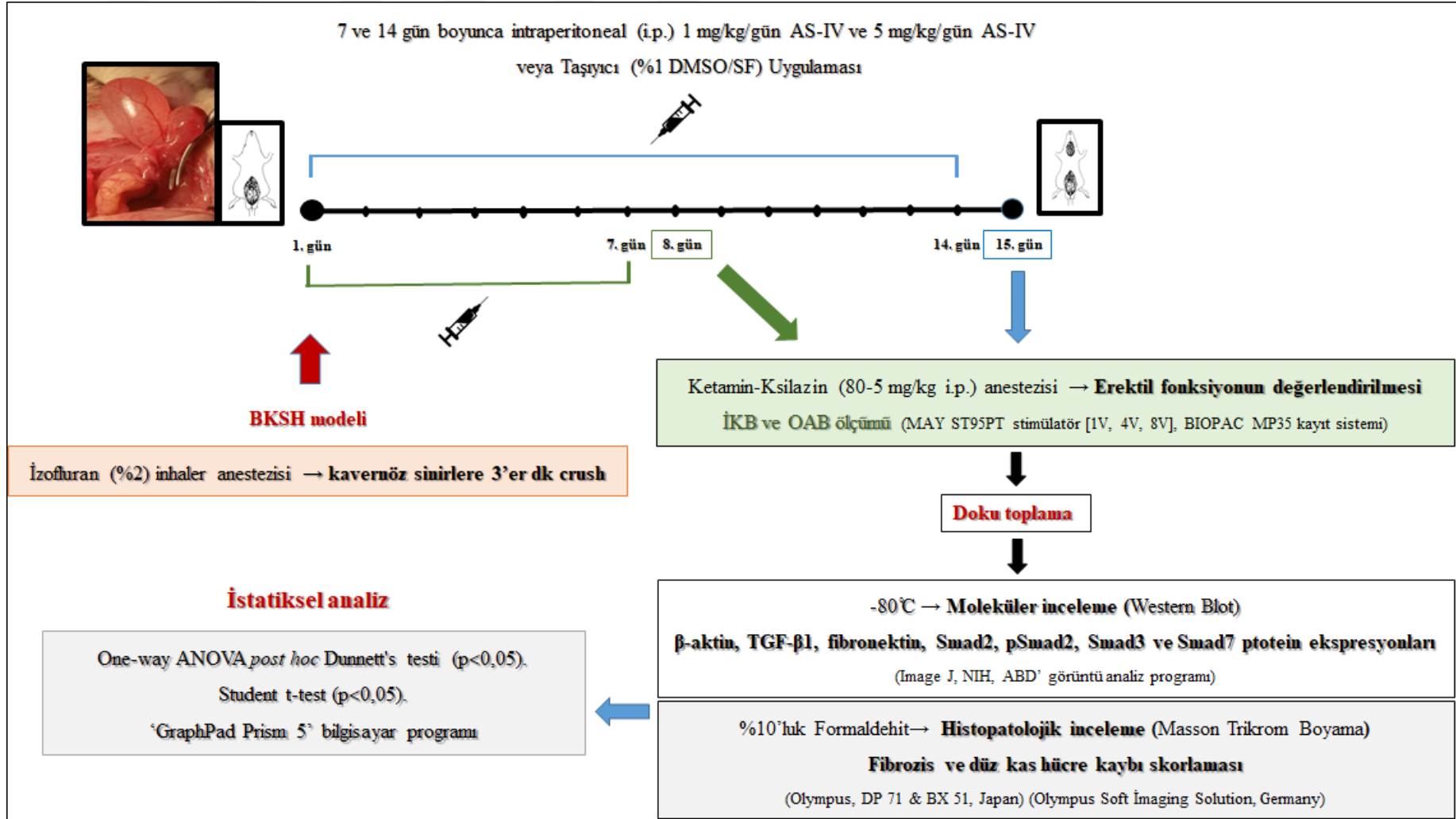
Çalışmada kullanılan çözelti ve tamponlar Tablo 5’te yer almaktadır.

**Tablo 5.** Kullanılan çözelti ve tamponlar

| Adı                                   | Marka ve Kodu                    |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| ECL Solüsyonu                         | Nzytech, Mb19301                 |
| MES yürütme tamponu                   | ThermoFisher Scientific, B0002   |
| NuPAGE™ Antioxidant                   | Invitrogen, NP0005               |
| NuPAGE Bis-Tris gradient jeli (%4-12) | Invitrogen NP0322BOX             |
| NuPAGE LDS Sample Buffer              | Thermo Fisher Scientific, NP0007 |
| NuPAGE Sample Reducing Agent          | Thermo Fisher Scientific, NP0004 |
| Prime-Step™ P.B.R Protein Ladder      | Biolegend, Cat No: 773301        |

### 3.2. Yöntem

Sıçan korpus kavernozumlarında BKSH modeli sonucu gelişen yapısal ve moleküler değişikliklerce indüklenen EF kaybı üzerine AS-IV’ün olası terapötik etkinliğinin araştırıldığı çalışmamızda kullanılan deneysel yöntemler ve iş akış şeması şekil 13’te gösterilmiştir.



Şekil 13. Çalışma metodolojisi, kullanılan yöntemler ve iş akış şeması



### 3.2.1. BKSH ile İndüklenen Deneysel ED modelleri

Sıçanlar, vücut ağırlıkları ve yaşlarına göre deney gruplarına ayrıldı. Ardından, sıçanlara BKSH ile indüklenen deneysel ED modeli uygulandı. Bu amaçla;

#### 3.2.1.1. Deney Grupları ve Protokolleri

Sham ve BKSH modeli oluşturulacak olan tüm sıçanlara cerrahi prosedürün uygulandığı gün 1. gün olarak kabul edildi. Cerrahi girişimlerin hemen ardından 7 ve 14 günlük protokoller boyunca her gün 5 ml/kg/gün taşıyıcı veya 1 mg/kg/gün AS-IV veya 5 mg/kg/gün AS-IV tedavisi i.p. olarak uygulandı. Enjeksiyonlar 45 derecelik açıyla çift günlerde sağ ve tek günlerde sol alt abdominal kadrana yapıldı. Tüm cerrahi uygulamalar, ilaç tedavileri ve diğer işlemler günün belli saatlerinde aynı araştırmacılar tarafından yapıldı. Çalışma kapsamında planlanan deney grupları ve tedavi protokolleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

**Tablo 6.** Deney grupları ve tedavi protokolleri

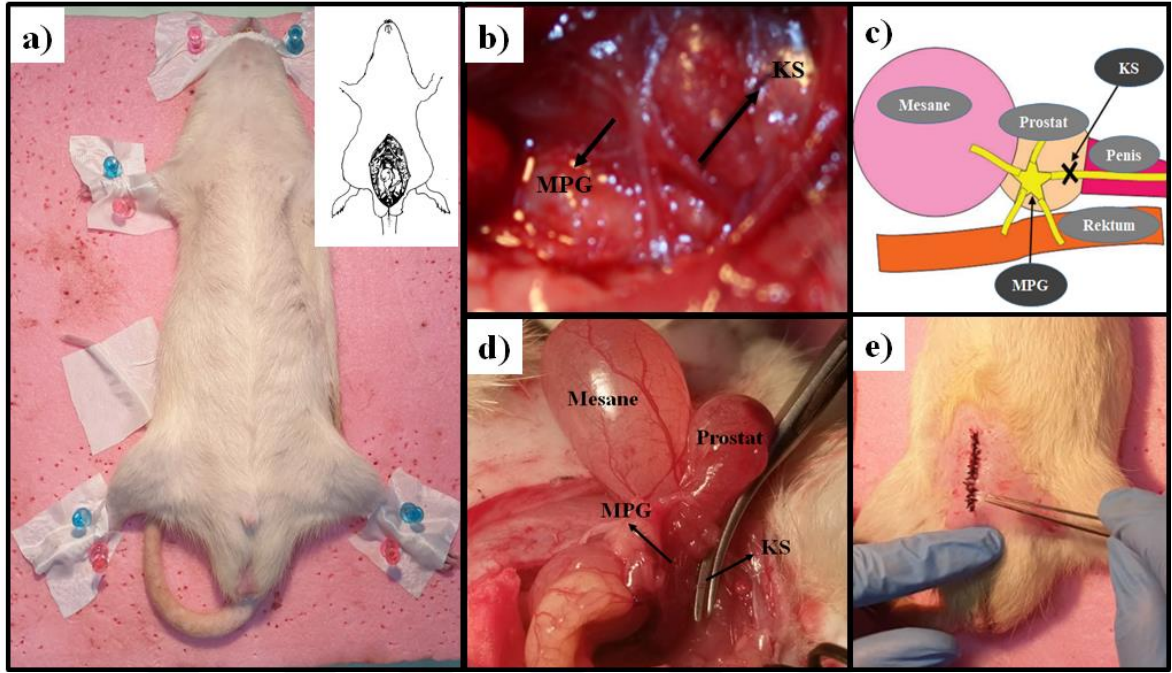
| <b>7 günlük (7G) protokole ait gruplar</b>   | <b>n</b> |
|----------------------------------------------|----------|
| 7G Sham + Taşıyıcı (%1 DMSO) (i.p.)          | 6        |
| 7G Sham + Tedavi (1 mg/kg/gün AS-IV) (i.p.)  | 6        |
| 7G Sham + Tedavi (5 mg/kg/gün AS-IV) (i.p.)  | 6        |
| 7G BKSH + Taşıyıcı (%1 DMSO) (i.p.)          | 6        |
| 7G BKSH + Tedavi (1 mg/kg/gün AS-IV) (i.p.)  | 6        |
| 7G BKSH + Tedavi (5 mg/kg/gün AS-IV) (i.p.)  | 6        |
| <b>14 günlük (14G) protokole ait gruplar</b> |          |
| 14G Sham + Taşıyıcı (%1 DMSO) (i.p.)         | 6        |
| 14G Sham + Tedavi (1 mg/kg/gün AS-IV) (i.p.) | 6        |
| 14G Sham + Tedavi (5 mg/kg/gün AS-IV) (i.p.) | 6        |
| 14G BKSH + Taşıyıcı (%1 DMSO) (i.p.)         | 6        |
| 14G BKSH + Tedavi (1 mg/kg/gün AS-IV) (i.p.) | 6        |
| 14G BKSH + Tedavi (5 mg/kg/gün AS-IV) (i.p.) | 6        |
| Toplam sıçan sayısı:                         | 72       |

### 3.2.1.2. Bilateral Kavernöz Sinir Hasar Modelinin Oluşturulması

Cerrahi işlemlerden bir gün önce operasyon odası ve ekipmanlar hazırlandı; operasyon odasına alınan sıçanların tartımları yapıldıktan sonra ortama adaptasyonları sağlandı. Operasyon günü sıçanlara izofluran (%2) inhalasyonu ile anestezi uygulandı. Anestezi derinliğinin parmak kısırtma yanıtı ile değerlendirilerek onaylanmasının ardından sıçanlar işlemin yapılacağı diseksiyon tablasına supin pozisyonu verilerek Resim 3a'daki gibi sabitlendi. Kasık bölgesindeki kıllar kesildikten sonra insizyon bölgesi %10'luk povidon iyot çözeltisi ile temizlendi. Steril cerrahi aletler kullanılarak ventral kısımda abdominal orta hat hizasında yaklaşık 3 cm'lik bir insizyon yapıldı; mevcut hat üzerindeki subkütanöz dokuların ve linea alba hizasındaki kasların diseksiyonu ardından abdomen açıldı. Subkutan ve muskular dokuların sabitlenmesi sonrasında mesane tespit edildi. Operasyon bölgesinin genişletilmesi amacıyla mesane bir klemp yardımıyla lateral pozisyonda sabitlendi. Prostatın dorsolateral tarafında seyreden MPG ve KS'lerin tespitini kolaylaştırmak amacıyla testislerin skrotumla olan bağlantısı kesildi ve çevre dokular ile birlikte küçük bir steril gazlı bezle tamponlanarak üst abdomene geçici olarak sabitlendi. Prostat, MPG ve KS'lerin tespit edilmesinin ardından uygun bir forceps yardımıyla çevre dokulara hasar verilmeden KS'ler izole edildi (Resim 3b). MPG'nin 2-3 mm distalinden KS'lere hemostat klemp yardımıyla üçer dk sıkıştırma işlemi uygulandı (Resim 3c ve 3d). Hasarın oluşturulması ardından abdominal kavite hafifçe SF ile ıslatıldı ve geçici olarak abdomende sabitlenen testisler tekrar skrotuma alındı. Mesanenin de serbestleştirilmesinin ardından insizyon bölgesi Resim 3e'de görüldüğü gibi cerrahi sütur ile (kas dokusu 4.0, deri 3.0 nolu cerrahi iplikle) kapatıldı. Sham gruplarına ise herhangi bir sıkıştırma işlemi yapılmadan sadece sol KS tespiti yapıldı ve insizyon alanı kapatıldı (146). Sıçanlar cerrahi işlemlerin ardından bireysel kafeslere alındı ve bakım odalarına götürüldü.

### 3.2.2. Astragalozit IV Çözeltisinin Hazırlanması

Kuru toz halindeki AS-IV deney gününe kadar -20°C'de muhafaza edildi. Sulu tamponlardaki çözünürlük problemi sebebiyle 1 mg/kg ve 5 mg/kg AS-IV uygulaması için taşıyıcı olarak %1'lik DMSO/SF çözeltisi kullanıldı. AS-IV çözeltisi, uygulama günleri taze olarak hazırlandı. İntraperitoneal enjeksiyon volümlerinin standardizasyonu sıçanların vücut ağırlığına göre her 100 g için 0.5 ml olacak şekilde belirlendi.



**Resim 3.** BKSH modelinin oluşturulması. a) Diseksiyon tablasındaki supin pozisyonu, b) MPG ve KS'in tespiti, c) Operasyon bölgesinin şematik gösterimi, d) Sol KS'nin *crush* işlemi öncesi hemostat klemp ile sabitlenmesi, e) Abdominal insizyon bölgesinin cerrahi suture ile kapatılması.

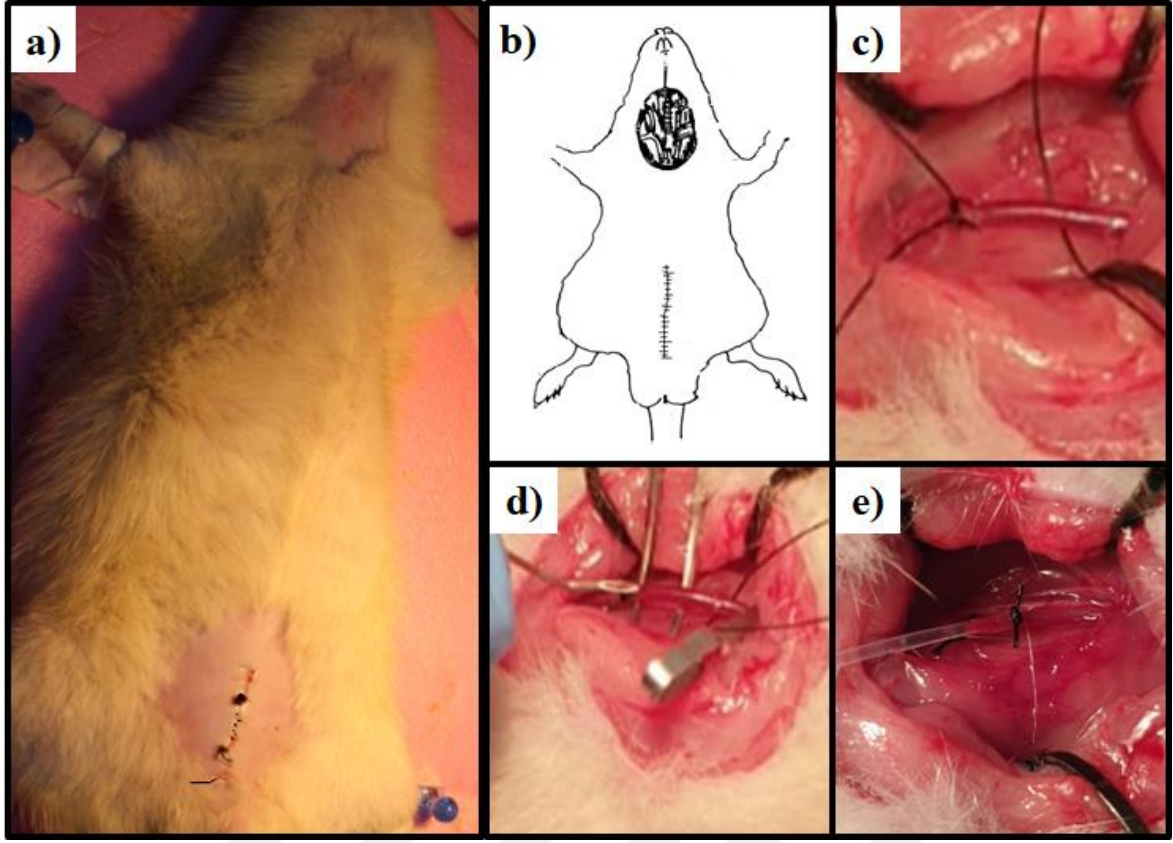
### 3.2.3. Cerrahi Sonrası Uygulamalar

Bakım odalarına alınan sıçanlar cerrahi işlemden sonraki 24 saat boyunca 2 mg/ml konsantrasyonda parasetamol içeren içme suyu ve normal diyetle ad libitum beslendi. Cerrahi işlemlerin hemen ardından gruplara 7 veya 14 günlük protokoller boyunca her gün taze olarak hazırlanan taşıyıcı veya ilaç uygulaması i.p. olarak yapıldı. Cerrahi işlemler sırasında kan basıncı düşüşü gibi herhangi bir beklenmedik problem ve sonrasındaki dönemde sıçanların hayatını tehdit edici bir unsur ile karşılaşılmadı.

### 3.2.4. Eş zamanlı OAB ve İKB Ölçümü

EF'nin değerlendirilmesi için operasyon odası ve cihazlar hazırlandı. İşlem günü sıçanlar operasyon odasına alındı ve tartıldı. Cerrahi işlem için gerekli sterilizasyon şartları sağlandıktan sonra sıçanlara ketamin (80 mg/kg i.p.)/ksilazin (5 mg/kg i.p.) anestezisi uygulandı. Sonrasında sıçanlar diseksiyon tablasına baş kısmı aşağıda olacak şekilde supin pozisyonunda sabitlendi (Resim 4a).

Anestezi derinliği onaylandıktan sonra, sabitlenen boyun kısmındaki kıllar dikkatlice kesildi ve bölge antiseptik povidon iyot çözeltisi ile temizlendi. Yaklaşık 3 cm'lik bir boyun derisi insizyonu sonrasında (Resim 4b) lenf nodlları ve tükürük bezleri ekarte edilerek sternoid kas tespit edildi. Sternoid kas dokusu dikkatlice ayrıldıktan sonra bir pens yardımıyla başta internal juguler ven ve vagus sinir olmak üzere diğler sinir demetlerine zarar vermeden sol ana karotid arter dikkatlice izole edildi. Operasyon bölgesi için yeterli alanın oluşturulması ardından kraniyal kan akımının kesilmesi amacıyla karotid arterin kraniyal ucunun ligasyonu Resim 4c'de görüldüğü gibi 4.0 nolu cerrahi iplik yardımıyla yapıldı. Ardından bir pens yardımıyla hafifçe gerdirilen arter, ligasyon bölgesinin 1-1.5 cm aşağısından ince bir damar klemp'i yardımıyla sıkıştırıldı ve ilgili bölgedeki kan akımı tamamen durduruldu. Daha önceden hazırlanan 22-G nolu enjektör ucu kullanılarak, bir pens ile gerdirilen karotid arterin ligasyon bölgesine yakın olan ucundan kan akımına karşı olacak şekilde 15-30 derecelik bir açıyla hafifçe girildi (Resim 4d). Ardından, damar lümenine zarar vermeyecek şekilde enjektör ucu dikkatlice çıkarıldı ve böylece 250 ünite/mlt heparinli SF içeren polietilen (PE-50) kanülün artere yerleştirilmesi için yeterli büyüklükte bir alan açılmış oldu. Bir basınç transdüserine bağı olan ve boştaki ucu uygun bir açıyla kesilmiş olan kanül pens yardımıyla gerdirilen artere yerleştirildi. Kanülün yerleştirilmesi sonrasında karotid arterin kanüle edilen kısmı 4.0 nolu cerrahi iplikle sıkı bir şekilde bağlandı (Resim 4e). Kan akımının yeniden sağlanması ve OAB ölçümünün alınabilmesi amacıyla yerleştirilen klemp dikkatlice çıkarıldı. İlgili bölge SF ile ıslatılmış steril gazlı bez ile örtüldükten sonra sıçana İKB ölçüm cerrahisi için uygun pozisyon verildi.

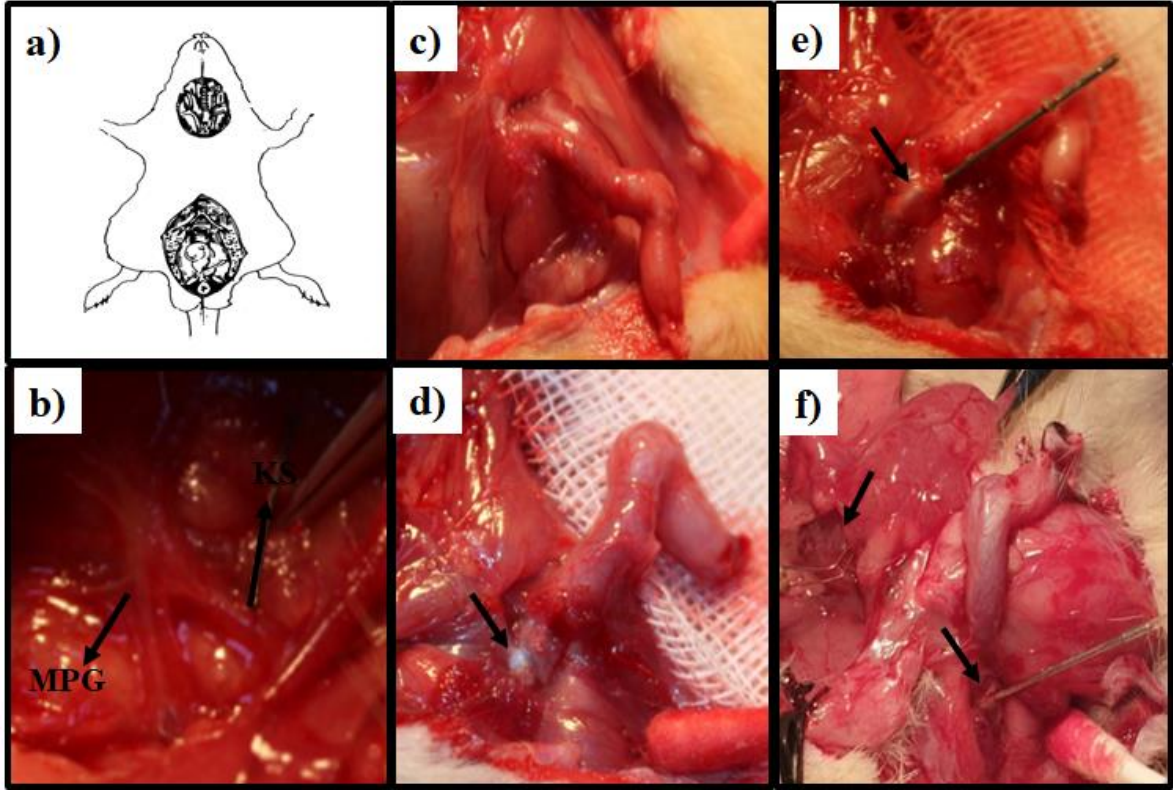


**Resim 4.** Sol karotid arterden *in vivo* OAB ölçülmesi a) Supin pozisyonu, b) Boyun derisi ve kaslarının insizyonunun şematik gösterimi, c) Sol karotid arterin tespiti ve kraniyal ucunun ligasyonu, d) 22-G enjektör ucu ile karotid artere girilmesi, e) PE-50 kanülün karotid artere yerleştirildikten sonra sabitlenmesi.

İKB ölçümü için diseksiyon tablasındaki sıçanın cerrahi sütur ile kapatılan abdominal bölgesine 3-4 cm'lik bir insizyon yapıldı (Resim 5a). Subkütanöz dokular ve kas dokuları sabitlendi. Mesanenin tespit edilip, lateral kısımda sabitlenmesi ardından testisler ve çevre dokular üst abdomene alındı. Prostatın dorsa lateralinde seyreden sağ KS tespit edilmesi ardından, dikkatlice izole edildi (Resim 5b). Erektile dokuda hasar oluşturmamaya özen göstererek alt abdomen kesi ile açıldı ve penis çevre dokulardan temizlenerek izole edildi (Resim 5c). İnce bir cerrahi makas kullanarak iskiokavernöz kasın hemen altında bulunan sağ korpus kavernozum tespit edildi (Resim 5d). Serbest haldeki penis, pens yardımıyla yatay duruma getirildikten sonra bir ucu basınç transduserine bağlı 27-G enjektör ucu bulunan polivinil kanül sağ korpus kavernozuma yerleştirildi (Resim 5e ve 5f). Doğru bölgeye giriş yapıldığının ve sızdırma olmadığının doğrulanması amacıyla kanülden çok az miktarda 250 U/ml heparinli SF dokuya gönderildi. Ardından sağ KS küçük bir pens yardımıyla stimülatöre bağlı olan platin bipolar elektrodlar üzerine yerleştirildi. Elektriksel



stimülasyon parametreleri 1-4-8 volt (V), frekans 16-Hz, birim uyarı süresi 1 milisaniye (msn) ve uyarı süresi 60 saniye (sn) olarak belirlendi. Elektriksel stimülasyonlar üç dk arayla ardışık uygulandı. Veriler deney süresince kaydedildi.



**Resim 5.** *In vivo* İKB ölçümü. a) Alt abdominal insizyonun temsili gösterimi, b) Sağ KS'nin tespiti, c) Serbestleştirilmiş penil doku, d) İskiokavernöz kasın eliminasyonu sonrası *tunica albuginea* ile sarılı olan sağ korpus kavernoza tespit, e) PE-50 kanülün korpus kavernoza yerleştirilmesi, f) Elektriksel stimülasyon sırasında İKB ölçümünün alınması.

### 3.2.5. Doku Örneklerinin İzolasyonu

EF değerlendirildikten sonra penis izole edildi. Os penis rezeksiyonu ardından çevre dokulardan temizlenen penil doku örneklerinin distal kısımdan 0.5 cm boyunda enine sirküler kesitler alındı. Hazırlanan doku kesitleri, içerisinde yeteri miktarda %10'luk nötral tamponlu formaldehit solüsyonu bulunan etiketli kaplara fiksasyon amacıyla koyuldu. Penisin proksimal kısmı ise moleküler analizlerde kullanılmak üzere sıvı azotta hızlı bir şekilde dondurulduktan sonra deney gününe kadar derin dondurucuda (-80°C'de) saklandı. Sıçanların sakrifikasyonları eksanguinasyon (kansızlaştırma) yöntemiyle gerçekleştirildi.

### **3.2.6. Western Blot ile Moleküler Analizler**

#### **3.2.6.1. Penil Doku Homojenizasyonu**

Penil doku örneklerinin her biri buzda bekletilen 1 ml TNTE liziz tampon [50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 150 mM sodyum klorür, %1 Triton X-100, 1 mM EDTA (pH 7.0), proteaz inhibitör karışımı ve fosfataz inhibitörleri (5 mM NaPPi, 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF) (toplam hacim 10 ml)] içeren tüpler içerisinde cerrahi makas yardımıyla mekanik olarak parçalandı. Ardından buz dolu kaplara yerleştirilen tüpler homojenizatör ile  $2 \times 10^4$  rpm devirde 5 kez 5'er sn aralıklarla 10'ar sn homojenize edildi. Ardından +4 °C'de 16000xg'de 10 dk'lık santrifüj işlemi uygulandı. Elde edilen süpernatant kısım ayrıldı ve buz üzerinde hızlıca alikotlanarak (küçük hacimlerde) ependorflar içerisinde -80 °C'de saklandı.

#### **3.2.6.2. Total Protein Miktar Tayini**

Dokulardan elde edilen homojenatlarda total protein konsantrasyonu bovin serum albümin (BSA) standartlarını (0, 200, 400 ng/mL) içeren Qubit® Protein Assay Kits ve Qubit® 3.0 florometre cihazı kullanılarak ürün kılavuzundaki yönergeye uygun şekilde saptandı. Bu kapsamda BSA standartları ile doku homojenatları (10 µl) 0.5 mL tüplere koyuldu. Seyreltme tamponu ile dilüe edilen test reaktifi (1:200) standart ve numunelerin üzerine eklenerek vortekslendikten sonra karanlıkta/oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Ardından numune odalarına yerleştirilen örneklerdeki renk değişim yoğunluğuna bağlı absorbans değerleri 485/590 nm dalga boyunda ölçüldü. BSA standartlarının ölçümlerinden faydalanılarak elde edilen konsantrasyon/absorbans grafiği oluşturuldu. Elde edilen grafik denklemi ardından örneklerin protein miktarları hesaplandı (mg/ml).

#### **3.2.6.3. Proteinlerin Denatürasyonu ve Örneklerin Hazırlanması**

Kavernöz doku homojenatları total protein miktarı 20 µg olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine alınarak üzerine 4X NuPAGE LDS Sample Buffer [lityum dodesil sülfat (LDS), pH 8.5, SERVA mavisi G250 ve fenol kırmızısı] (5 µL), 10X NuPAGE Sample Reducing Agent (500 mM ditiyotritol) (2 µL) ve distile su eklenerek toplam hacim 20 µL'ye tamamlandı. Elde edilen çözelti 70°C'de 10 dk boyunca inkübe edilerek denatüre edildi. İşlem sonunda vortekslenen örnekler kısa bir süre santrifüjlendikten (2-3 sn) sonra tatbik için hazır hale getirildi.

#### **3.2.6.4. Örneklerin Tatbiki ve SDS-PAGE Jel Elektroforezi**

XCell SureLock dikey jel aparatı elektroforez tankı içerisine yerleştirildi. NuPAGE %4-12'lik Bis-Tris poliakrilamid gradient jeli ambalajından çıkarıldıktan sonra jel kasetleri üzerindeki beyaz bant söküldü ve jel tarakları kuyucuklara zarar vermeden dikkatlice çıkarıldı. 200ml 1X MES yürütme tamponu içerisine 500 µL NuPAGE antioxidant eklenerek tankın iç kısmına koyuldu. Tankın geri kalan kısmına ise 600 ml 1X MES yürütme tamponu eklendi. Kuyucuklardan baştaki ve sondakine 5 µl marker diğer kuyucuklara ise örnekler 20 µl hacminde yüklendi. Yükleme işlemi ardından dikey elektroforez sistemi güç kaynağına bağlandı ve 200 volt, 135 amperlik elektroforez ortamında 35 dk boyunca yürütülerek proteinlerin molekül ağırlıklarına ( $M_A$ ) göre bantlar şeklinde ayrışması sağlandı.

#### **3.2.6.5. Proteinlerin Membrana Transfer edilmesi**

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra tankın kapağı açıldı. Jel sıkıştırma aparatının açılması ardından çıkarılan jel kasetlerinin kenar bağlantıları jel bıçağı yardımıyla çıkarıldı. Jelin tarak kısımları ve alt tarafı dikkatlice kesildikten sonra deiyonize su bulunan bir kap içerisinde dikkatlice yıkandı. Örneklerin jelden nitroselüloz membrana transferi için iblot jel transfer sistemi (yarı kuru blotting) kullanıldı. İblot transfer kitinde bulunan anot rafı kutudan çıkarılarak cihaza yerleştirildi. Jel anot rafı üzerindeki membran üzerine dikkatlice yerleştirildikten sonra kitte bulunan filtre kağıdı distile suyla ıslatıldı ve roller yardımıyla hava kabarcığı kalmayacak şekilde jelin üstüne yerleştirildi. Sonrasında kitteki katot rafı kullanıma hazır hale getirildikten sonra jelimsi yüzeyi ıslak filtre kağıdına, bakır yüzeyi ise üste bakacak şekilde filtre kağıdının üzerine dikkatlice yerleştirildi ve hava kabarcıkları benzer şekilde uzaklaştırıldı. Kitteki sünger üzerindeki metal, iblot jel transfer sisteminin kapağının sağ tarafında yer alan elektrota denk gelecek şekilde kapağa yerleştirildikten sonra cihazın kapağı kapatıldı. Uygun programının seçilmesini takiben 100 voltta 7 dk transfer işlemine bırakıldı. İşlemin gerçekleştiği, marker bantlarının membranda görünür hale gelmesiyle doğrulandı ve sonrasında membran dikkatli bir şekilde deiyonize su içeren bir kap içerisine alındı.

#### **3.2.6.6. Bloklama ve Yıkama**

Jelden nitroselüloz membrana aktarılan spesifik proteinler haricindeki bağlanma yüzeylerinin maskelenmesi amacıyla %0.1 Tween-20 içeren TBS [(20 mM Tris, %0.9 NaCl (pH 7.4)] solüsyonuyla hazırlanan %5'lik BSA (2.5 g BSA, 50 ml %0.1 Tween-20 içeren TBS) kullanıldı. Bu amaçla %5'lik BSA bloklama çözeltisi içerisine koyulan membran,



çalkalayıcı (60 rpm) üzerinde oda sıcaklığında 60 dk boyunca inkübe edildi. Membran, bloklama çözeltisinin uzaklaştırılması amacıyla çalkalayıcı üzerindeki %0.1 Tween-20 içeren TBS solüsyonu içerisinde 5 dk boyunca 3 kez hafifçe çalkalanarak yıkandı.

#### **3.2.6.7. Primer Antikor ile İnkübasyon ve Yıkama**

Primer antikorlar kullanım klavuzlarına uygun olarak; anti-beta aktin antikor (1:1000), anti-fibronektin antikor (1:1000), anti-pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) antikor (1:1000), anti-Smad2/3 antikor (1:1000), anti-SMAD7 antikor (1:1000) ve anti-TGF- $\beta$ 1 antikor (1:1000) belirtilen dilüsyon oranlarında hazırlandı. Dilüsyonlar, primer antikorların 10  $\mu$ l'sine 9990  $\mu$ l %5'lik BSA bloklama çözeltisi eklenmesiyle gerçekleştirildi. Yıkama solüsyonu olan %0.1 Tween-20 içeren TBS'nin uzaklaştırılmasının ardından 10 ml dilüe edilmiş primer antikor içerisinde, çalkalayıcı üzerinde (20 rpm) 12-16 saat +4 °C'de inkübasyona bırakılan membranlar, işlem bittikten sonra primer antikoru uzaklaştırılması amacıyla oda sıcaklığında %0.1 Tween-20 içeren TBS içerisinde 3 kez 5 dk boyunca çalkalayıcıda hafifçe çalkalanarak yıkandı.

#### **3.2.6.8. Sekonder Antikor ile İnkübasyon ve Yıkama**

Sekonder antikor olan goat anti-rabbit IgG HRP-linked antikor, %5'lik BSA bloklama solüsyonu ile kullanım klavuzu doğrultusunda belirtilen oranda (1:10000) dilüe edildi. Yıkamanın ardından membranlar 10 ml dilüe edilmiş sekonder antikor içerisinde oda sıcaklığında 60 dk boyunca çalkalayıcı üzerinde (20 rpm) inkübasyona bırakıldı. İşlem sonrasında membranların oda sıcaklığında 3 kez 5 dk boyunca %0.1 Tween-20 içeren TBS ile hafifçe çalkalanarak (60 rpm) yıkanmasıyla sekonder antikor uzaklaştırıldı.

#### **3.2.6.9. Görüntüleme**

Membranlar 6 ml ECL Solüsyonu (NZY Supreme ECL HRP Substrat) ile muamele edildi. Görüntüleme cihazı yardımıyla membranlardaki protein bantları görünür hale getirildi. Bantlardaki ışımaya CCD kamera ile kaydedildi. Ardından Image 3 yazılımı ile dansitometrik olarak relatif bant yoğunluğu aynı membrandaki standart protein ( $\beta$ -aktin) bant yoğunluğu ile oranlanarak sunuldu.

### 3.2.7. Histopatolojik İnceleme

Çalışmamızda, BKSH/Sham grubu sıçanlardan izole edilerek hazırlanan penil doku kesitlerindeki histopatolojik değişikliklerin zamana bağlı olarak incelenmesi ve uygulanan tedavi protokollerinin sürece olan etkisinin değerlendirilmesi amacıyla *Masson Trikrom Boyama* (MTB) testi kullanıldı.

#### 3.2.7.1. Fiksasyon ve Dehidratasyon

Penil doku kesitleri %10'luk formaldehit içerisinde yaklaşık 48 saat fikse edildikten sonra doku takip kasetlerine yerleştirildi. Ardından dokular formaldehitin uzaklaştırılması amacıyla musluk suyunda bir gece boyunca yıkandı. Dehidratasyon işlemi için ise yaklaşık 1'er saat süren artan dereceli alkol serilerinden (sırasıyla %70, %90, %96 ve absöü alkol) geçirildi. Böylece dokulardaki suyun alkol ile yer değıştirmesi sağlandı.

#### 3.2.7.2. Saydamlaştırma ve Parafinizasyon

Dokulardaki alkolün uzaklaştırılıp yerine ksilenin geçmesi prensibine dayanan saydamlaştırma işlemi sonrasında örnekler yaklaşık 60°C'lik etüvde eriyik halde bulunan parafinde yeteri miktar (2-4 saat) bekletildi. Ardından doku takip kasetlerindeki, eriyik parafine gömölerek oda sıcaklığında bir müddet daha bekletilen, doku örnekleri buzdolabında donmaya bırakıldı. Böylece ksilen ve parafinin yer değıştirilmesiyle dokular kolayca kesilebilir sertlik ve saydamlığa getirilmiş oldu.

#### 3.2.7.3. Blok Hazırlama ve Kesit Alma

Kesilecek yüzleri altta kalacak şekilde parafine gömölerek hazırlanan parafin bloklar yarı otomatik mikrotoma yerleştirildi. Tıraşlama işlemi ardından lam üzerine 5 mikrometre (µm) kalınlığında seri doku kesitleri alındı.

#### 3.2.7.4. Deparafinizasyon ve Boyama

Alınan kesitlerin parafini etüvde (60°C) eritildikten (fiziksel deparafinizasyon) sonra ksilenle deparafinize (kimyasal deparafinizasyon) hale getirildi. Ardından azalan dereceli alkol serilerine tabi tutularak ksilen uzaklaştırıldı. Bu işlemi takiben distile sudan geçirilerek hidrate edilen doku kesitleri boyamaya hazır hale getirildi. Dokulardaki bağ doku/kolajen miktarının ve düz kas miktarlarının semi-kantitatif değerdendirilebilmesi amacıyla GBL Masson Trikrom Boyama Seti (Ürün Kodu: 5022-100, GBL Gül Biyoloji Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi, Türkiye) kullanıldı. Doku kesitleri önerilen boyama

prosedürüne göre boyandı. Yinelenen dehidrasyon (artan dereceli alkol serileri) sonrasında tekrar ksilenle muamele edilen boyalı kesitlere entellan adı verilen kapatma medyumu damlatıldı. Son basamakta, içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamelle kapatılan boyalı kesitler kurumaya bırakılarak mikroskopik incelemeler için hazır hale getirildi. Boyalı kesitlerdeki düz kas yapılarının kırmızı, hücre çekirdeklerinin siyah ve kolajen/bağ dokunun maviye boyandığı görüldü.

### 3.2.7.5. Mikroskopik İnceleme

Elde edilen kesitlerin ışık mikroskopunda (Olympus BX51; Olympus Co., Tokyo, Japan) görüntülenmesi ardından mikroskoba entegre kamera (Olympus DP 71 Olympus Co., Japan) ile fotoğrafları çekildi. Kavernöz doku morfolojisi ve fibrozis gelişim sürecinin incelenmesi amacıyla penil doku kesitleri; bağ doku/kolajen (mavi renkli) miktarı, düz kas (kırmızı renkli) miktarı ve genel yapı bakımından histolojik olarak kör şekilde değerlendirildi. Değerlendirme 'Analysis 5 Research' (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak yapıldı. Bu kapsamda, bağ doku ve kolajen artışı; 0: Normal (fibrozis yok), 1: Hafif bağ doku/kolajen artışı (hafif derecede fibrozis gelişimi), 2: Orta derecede bağ doku/kolajen artışı (orta derecede fibrozis gelişimi) ve 3: şiddetli bağ doku/kolajen artışı (şiddetli fibrozis gelişimi) şeklinde semi-kantitatif olarak skorlandı. Kesitlerdeki düz kas miktarı da; 0: Normal (Azalma yok), 1: Hafif derecede azalma, 2: Orta derecede azalma, 3: İleri derecede azalma mevcut şeklinde semi-kantitatif olarak skorlandı (235).

### 3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında NC3Rs Arrive Guideline dikkate alınarak tasarlanan protokollerde grup başına düşen hayvan sayısı, çalışmanın istatistiksel anlamlılığının da güçlendirilmesi amacıyla (0.8-0.85 güç ve 0.05 oranında tip 1 hata olasılığına göre)  $n=6$  olarak belirlendi (236). Elde edilen veriler 'aritmetik ortalama değer  $\pm$  standart hata' olarak ifade edildi. Tüm verilerin Kolmogorov-Smirnov testi ile normal dağılıma uygunluğu değerlendirildi. Sıçanların vücut ağırlıkları (g), bazal İKB (mmHg) ve OAB değerleri (mmHg) tek yönlü ANOVA analizi ardından *post hoc* Tukey testi ile değerlendirildi. Fonksiyonel [m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB (mmHgxs)] verilerin değerlendirilmesi için tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Dunnett's testi kullanılırken, iki grup arasındaki farkın değerlendirilmesi için student t-testi kullanıldı. Histopatolojik [bağ doku kollajen artışı ve düz kas kaybı skoru (kontrol grubuna göre skorlanarak)] ve moleküler [protein ekspresyon

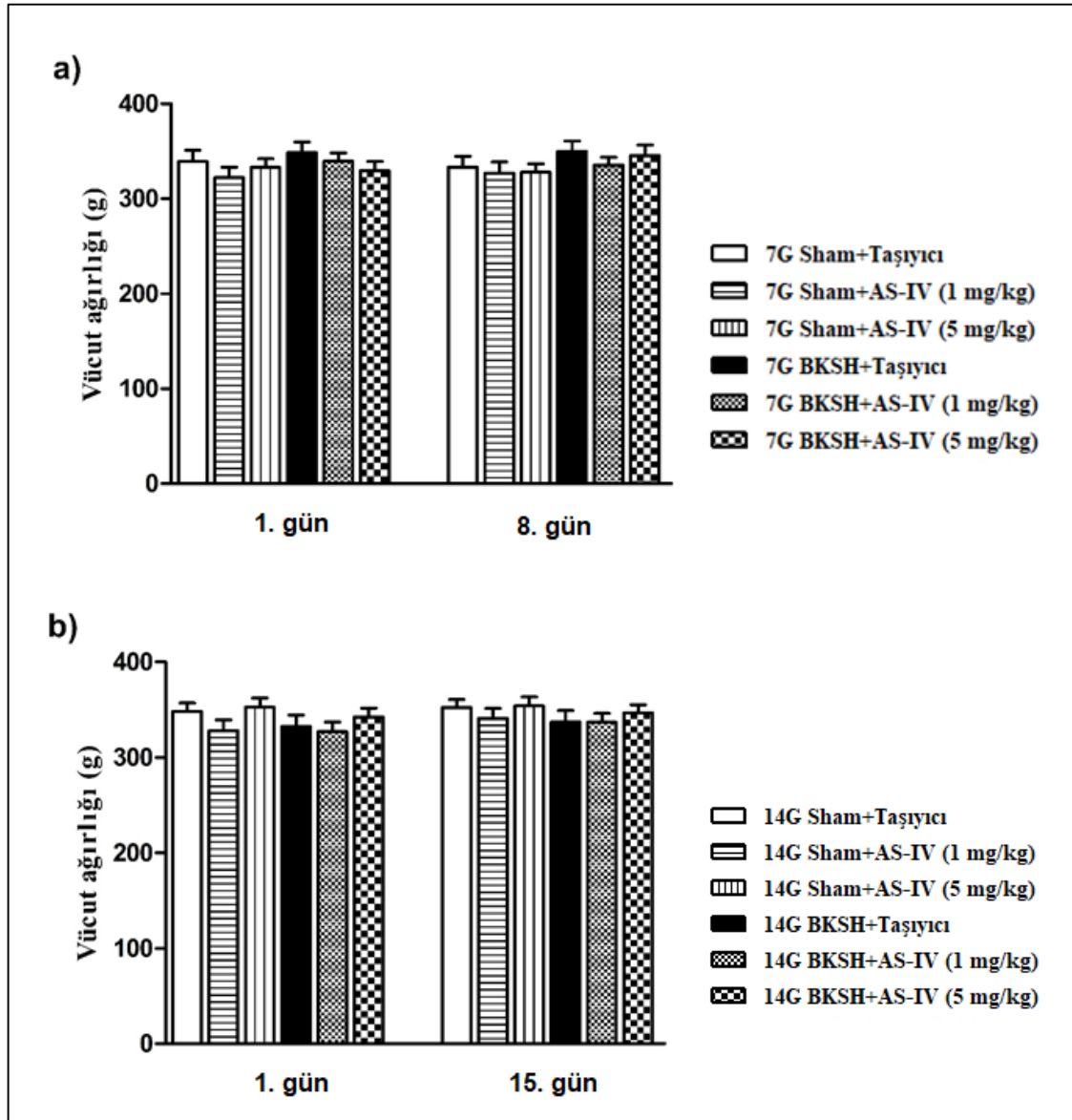
seviyesi ( $\beta$ -aktin bant yoğunluğu ile oranlanarak)] verilerin semikantitatif değerlendirilmesinde gruplar arasındaki karşılaştırmalar için student-t testi kullanıldı. Deneyler sonucu elde edilen tüm veriler ‘GraphPad Prism 5’ bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arası fark  $p < 0.05$  ise anlamlı kabul edildi.



#### 4. BULGULAR

##### 4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlıkları ve Genel Durumlarının Değerlendirilmesi

Sıçanlar, deney protokollerinin ilk (1. gün) ve son günü (8. gün veya 15. gün) tartılarak vücut ağırlıkları belirlendi. Genel sağlık durumlarının değerlendirilmesi amacıyla yapılan periyodik gözlemlerde, protokoller süresince grupların günlük su ve yem tüketim miktarı benzerdi. Sıçanların hiçbirinde davranış ve somatomotor aktivite anormallikleri, enfeksiyon bulgusu ve ölüm tespit edilmedi. Deneylerin ilk ve son günü sıçanların vücut ağırlıkları gruplar arasında anlamlı şekilde farklı bulunmadı (Şekil 14).



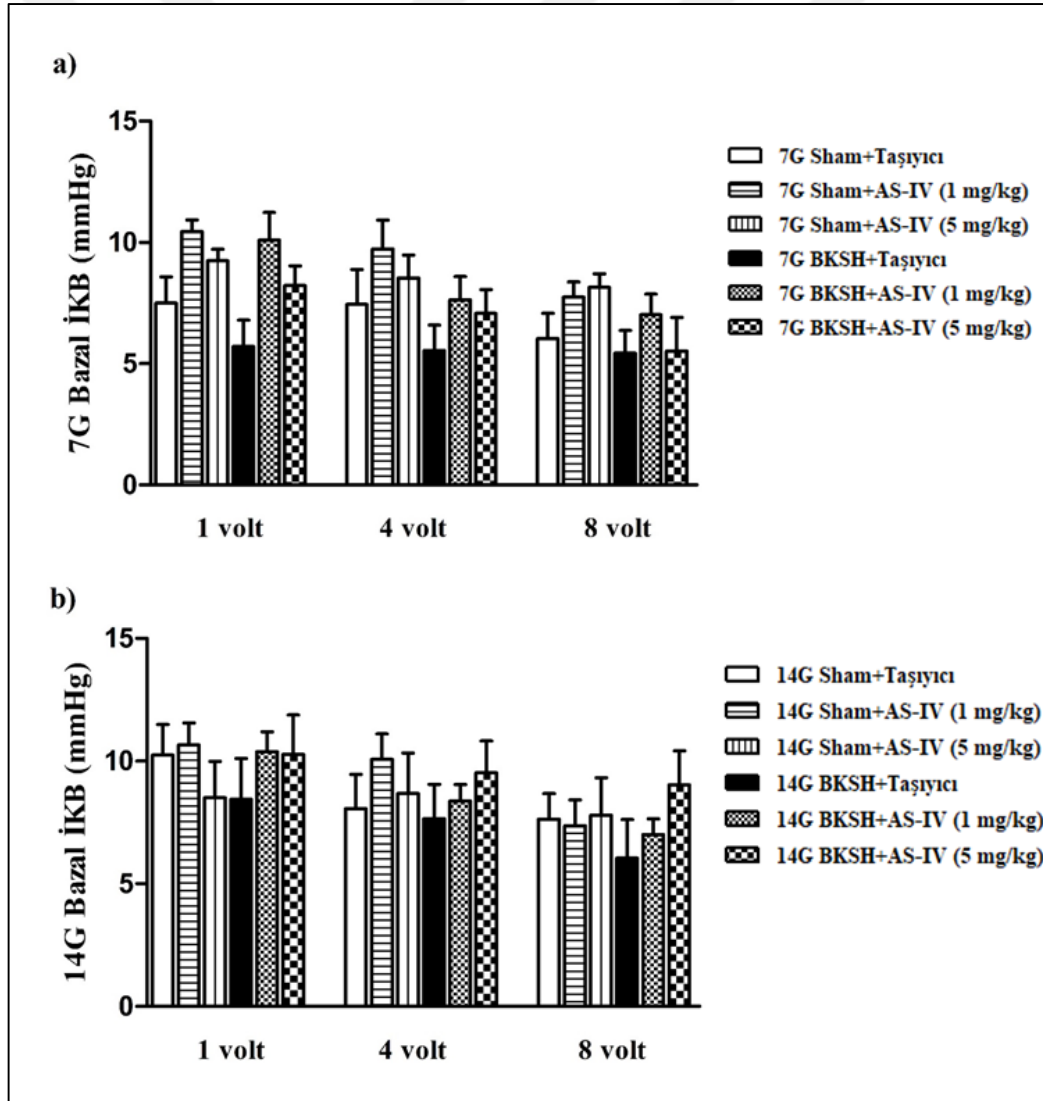
Şekil 14. Deney protokolleri kapsamındaki a) 7 ve b) 14 günlük gruplara ait vücut ağırlık değişimleri ( $p>0.05$ ).

## 4.2. Fonksiyonel Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi

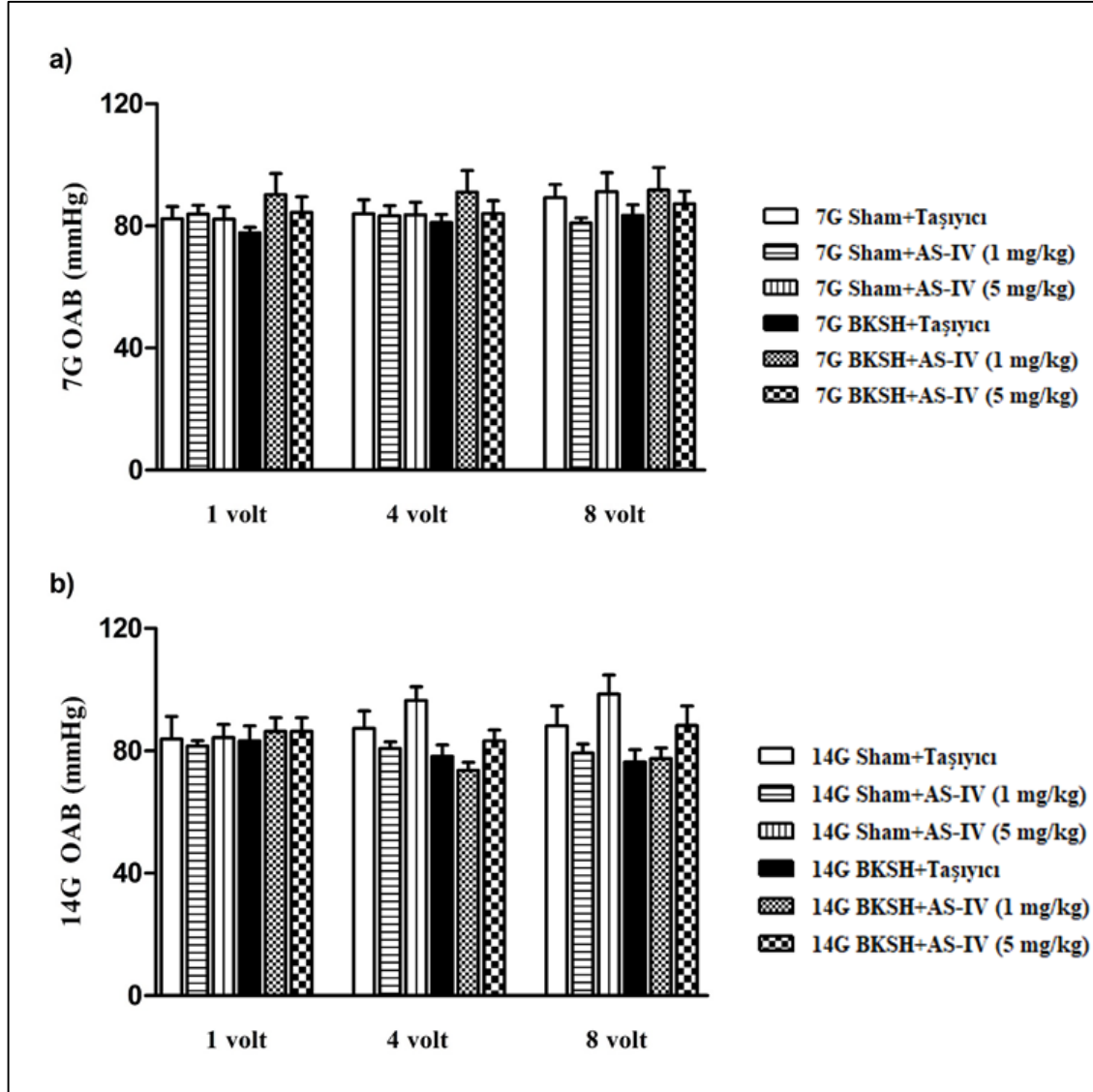
Sıçanlarla yürütülen in vivo çalışmalarda, erektil fonksiyon KS stimülasyonu sonucu meydana gelen İKB değişiklikleriyle ölçüldü. AS-IV tedavisinin BKSH ile indüklenen deneysel ED üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB oranları değerlendirildi.

### 4.2.1. Bazal İKB ve OAB Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi

BKSH ve Sham gruplarındaki sıçanların, elektriksel stimülasyonlar öncesindeki bazal İKB ve stimülasyonlar sırasındaki OAB değerleri gruplar arasında benzer bulundu (Şekil 15 ve 16).



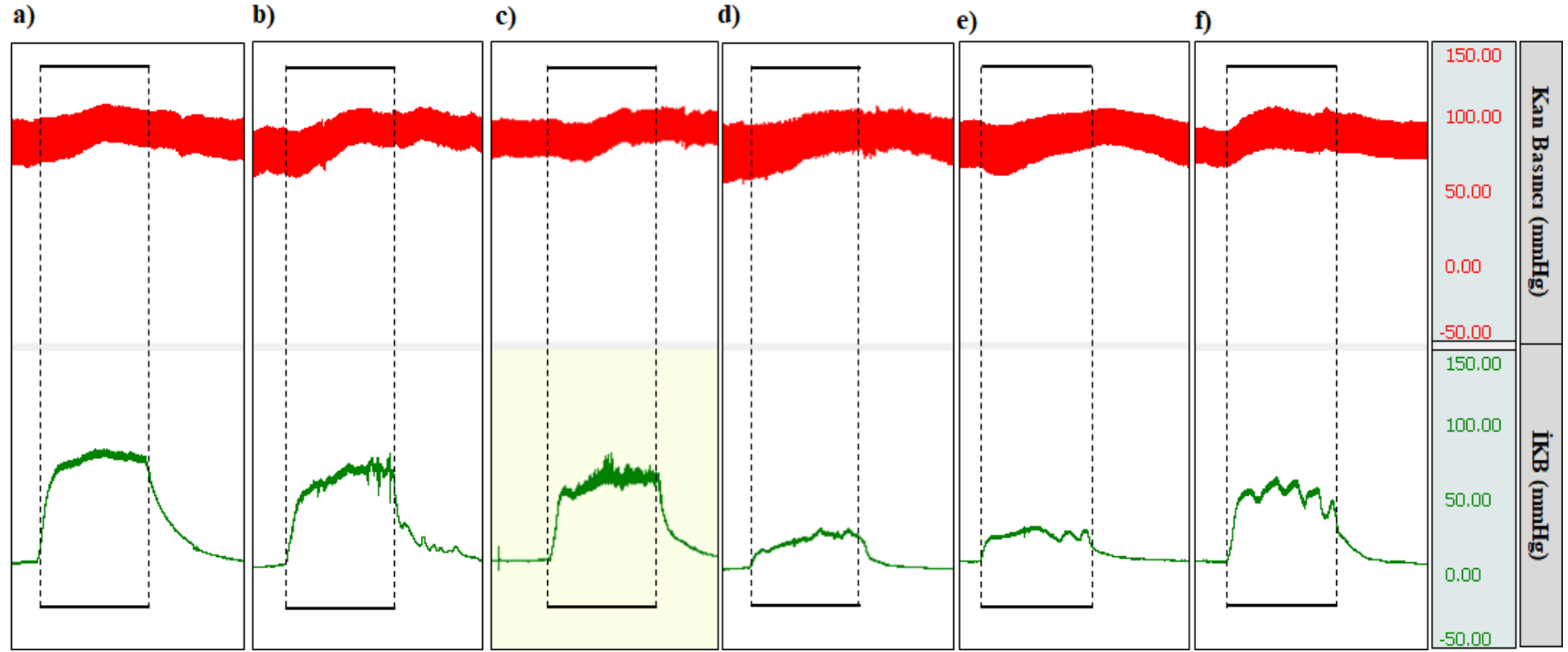
Şekil 15. Deney kapsamındaki a) 7 ve b) 14 günlük grupların 1, 4 ve 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar öncesi bazal İKB (mmHg) değerleri ( $p>0.05$ ).



**Şekil 16.** Deney kapsamındaki a) 7 ve b) 14 günlük grupların 1, 4 ve 8 voltluk elektriksel stimülasyonlar sırasındaki OAB (mmHg) değerleri ( $p>0.05$ ).

#### 4.2.2. 7 Günlük AS-IV Tedavisinin BKSH ile İndüklenen ED Üzerine Etkisi

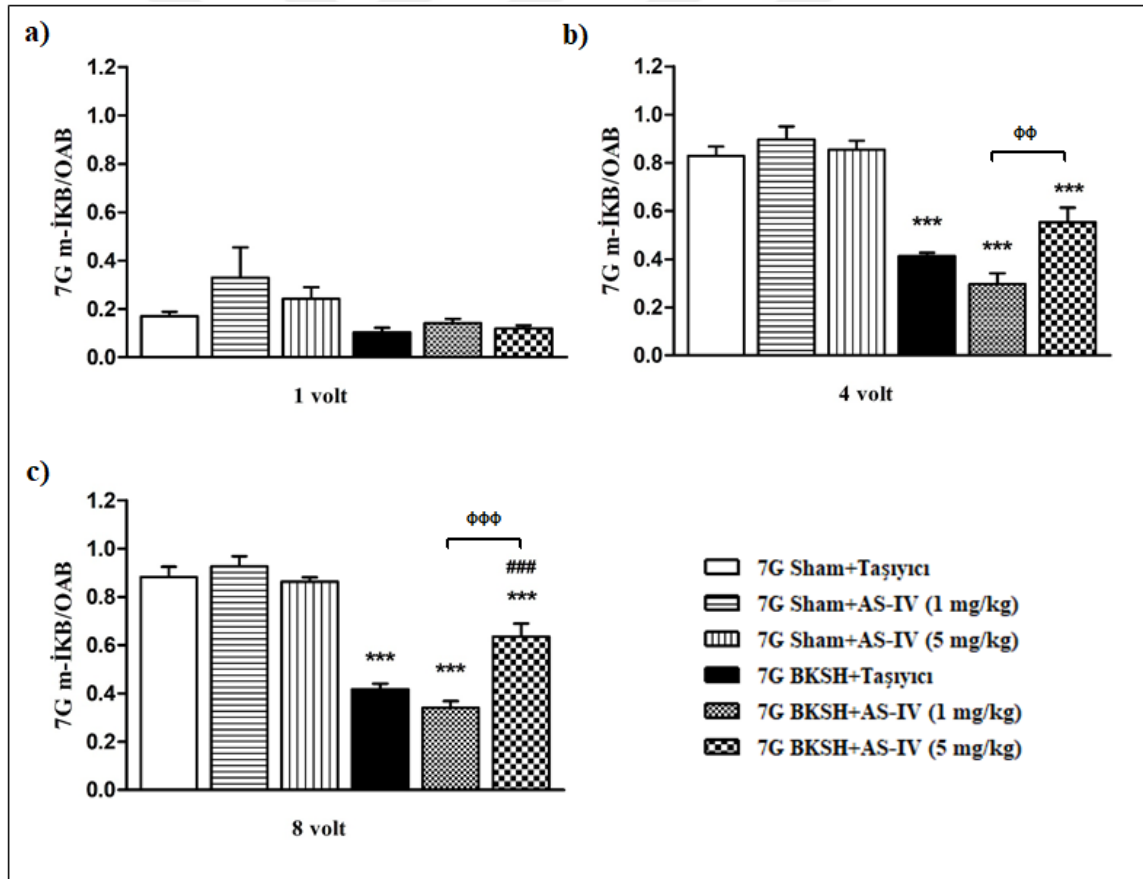
Sham ve BKSH modelini takiben uygulanan 7 günlük tedavi protokolü ardından gerçekleştirilen eş zamanlı kavernozaal basınç ve arteriyel basınç ölçümlerine ait temsili görüntü Şekil 17’de gösterilmiştir.



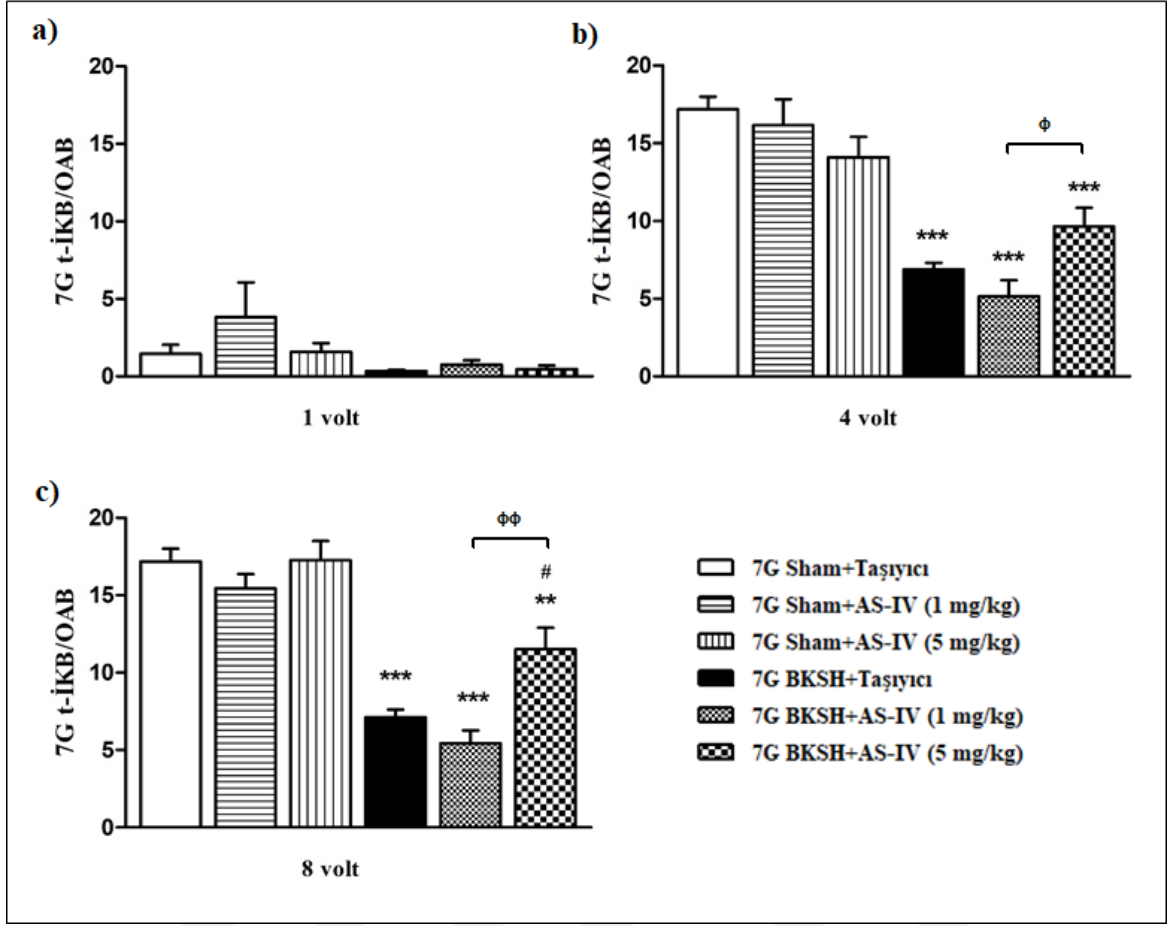
**Şekil 17.** 7 günlük protokol sonunda sıçanlarda KS'lerin 1 dk'lık 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonu sırasında kaydedilen İKB (yeşil) ve OAB (kırmızı) değerleri (ölçek çubuk 60 sn). a) Sham+Taşıyıcı, b) Sham+AS-IV (1 mg/kg), c) Sham+AS-IV (5 mg/kg), d) BKSH+Taşıyıcı, e) BKSH+AS-IV (1 mg/kg) ve f) BKSH+AS-IV (5 mg/kg).



BKSH veya Sham uygulamalarından sonraki 8. günde, 1 volt şiddetinde kavernöz sinir stimülasyonu sonucu elde edilen m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerlerinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. Ancak, 4 ve 8 volt şiddetinde KS stimülasyonu sonucu elde edilen m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerleri BKSH+Taşıyıcı grubunda Sham+Taşıyıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. AS-IV tedavisi 1 mg/kg dozunda BKSH grubunda m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerlerini değiştirmede. 5 mg/kg AS-IV tedavisinin uygulandığı BKSH gruplarında, sinir hasarı ile azalan m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerleri BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında sadece 8 voltta anlamlı arttı. Elde edilen m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerleri Sham+Taşıyıcı grubu ile anlamlı benzerlik göstermedi. AS-IV tedavisi alan Sham gruplarına ait m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerlerinin Sham+Taşıyıcı grubu ile istatistiksel olarak benzer olduğu görüldü (Şekil 18 ve 19).



**Şekil 18.** 7 günlük gruplarda KS'lerin 1, 4 ve 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar sonucu elde edilen m-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması (n=6). \*\*\*p<0.001 Sham+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, ###p<0.001 BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, ΦΦp<0.01 ve ΦΦΦp<0.001 BKSH+Tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.



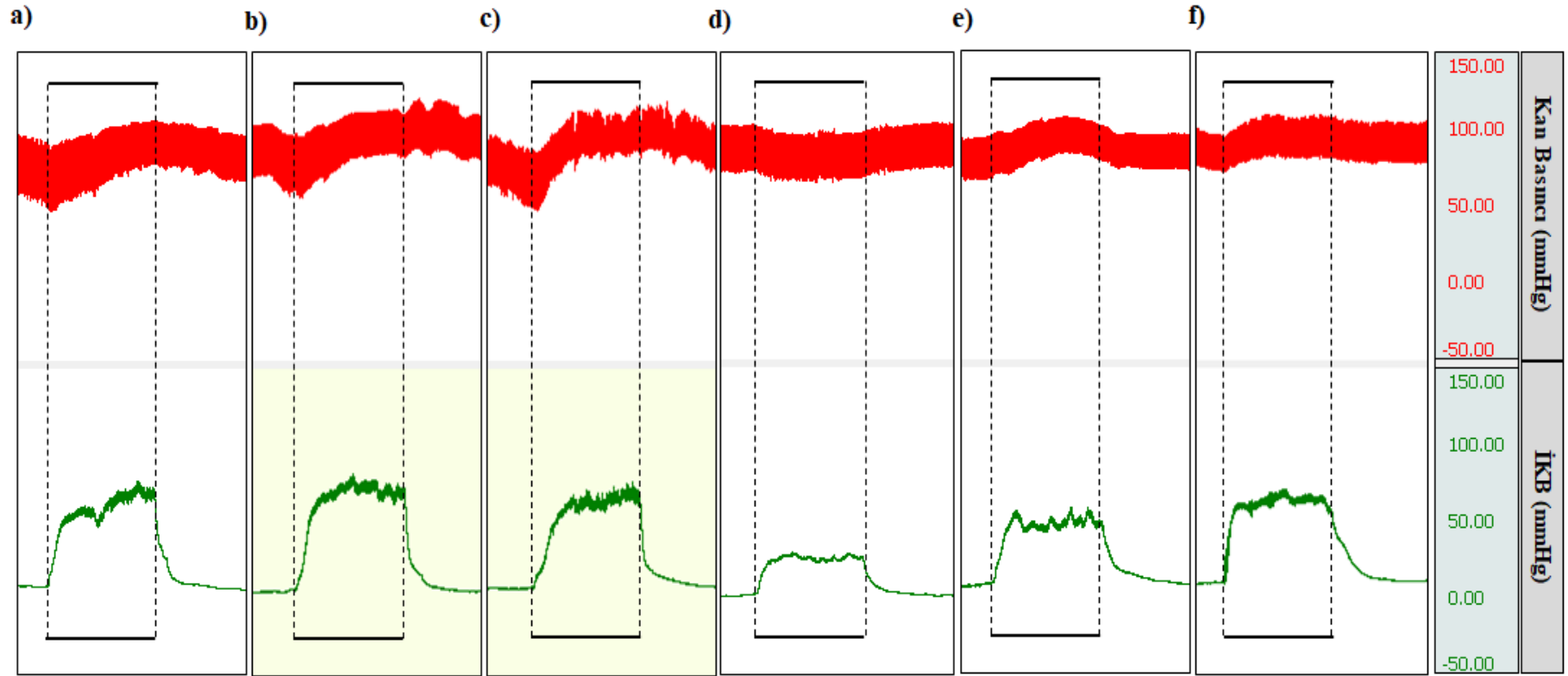
**Şekil 19.** 7 günlük protokol sonrası KS'lerin 1 volt, 4 volt ve 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar sonucu elde edilen t-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması (n=6). \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001 Sham+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, #p<0.05 BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, Φp<0.05 ve ΦΦp<0.01 BKSH+Tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

#### 4.2.3. 14 Günlük AS-IV Tedavisinin BKSH ile İndüklenen ED Üzerine Etkisi

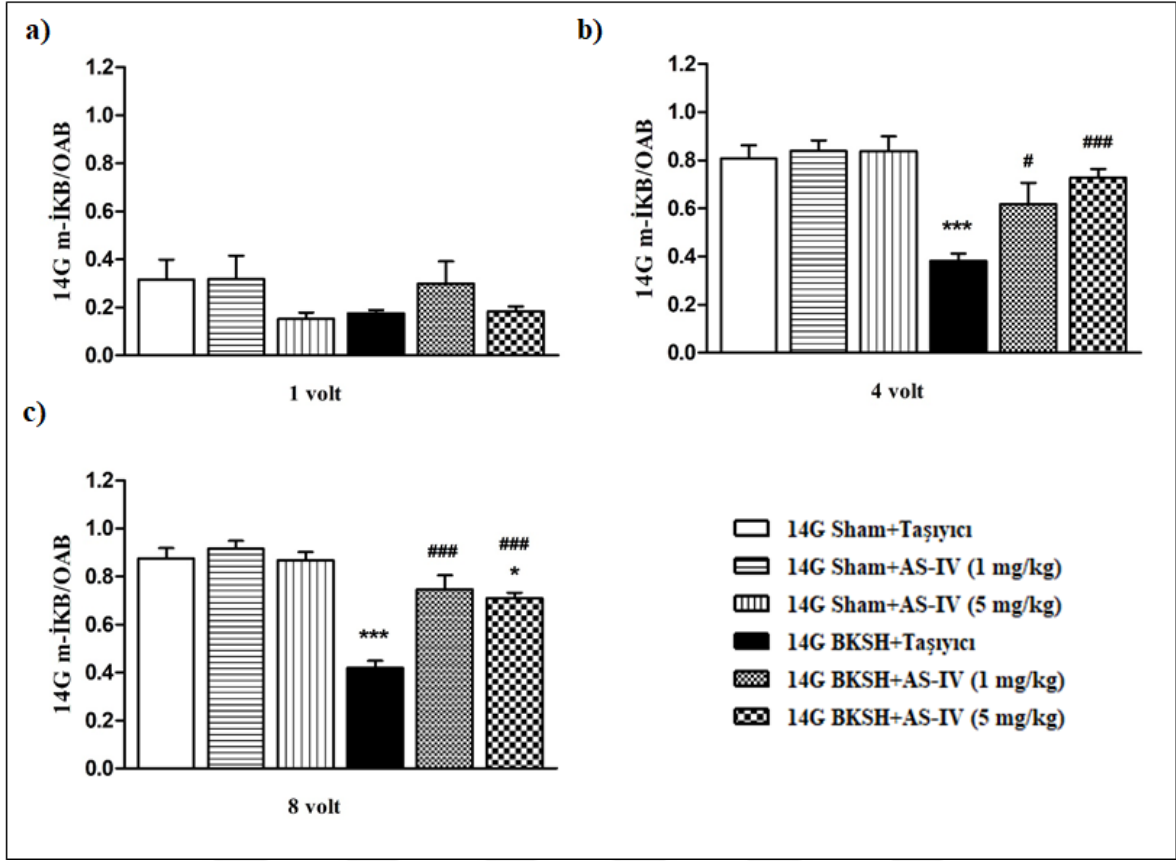
14 günlük tedavi protokolü sonunda Sham ve BKSH gruplarına ait eş zamanlı İKB ve OAB ölçümlerinin temsili görüntüleri Şekil 20'de gösterilmiştir. BKSH veya Sham uygulamalarından sonraki 15. günde, 1 voltluk stimülasyon sonrasında grupların m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB oranları arasında anlamlı bir fark bulunmazken; 4 ve 8 voltluk ölçümlerde BKSH+Taşıyıcı grubuna ait m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB oranları Sham+Taşıyıcı grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. 1 mg/kg AS-IV tedavisinin uygulandığı BKSH gruplarında sinir hasarı ile indüklenen m-İKB/OAB değerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı şekilde önlenirken; t-İKB/OAB değerlerindeki azalmanın sadece 8 voltta anlamlı önlendiği gösterildi. Elde edilen m-İKB/OAB (4 ve 8 voltta) ve t-İKB/OAB (8 voltta) değerleri Sham+Taşıyıcı grubu ile anlamlı

benzerlik gösterdi. 5 mg/kg AS-IV tedavisinin uygulandığı BKSH gruplarında, sinir hasarı ile indüklenen m-İKB/OAB değerindeki azalma BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında 4 ve 8 voltta anlamlı şekilde önlendi. Elde edilen m-İKB/OAB değeri sadece 4 voltta Sham+Taşıyıcı grubu ile anlamlı benzerlik gösterdi. 5 mg/kg AS-IV tedavisinin uygulandığı BKSH grupları ile Sham+Taşıyıcı grubu arasında t-İKB/OAB değerleri açısından anlamlı fark tespit edilmedi. AS-IV tedavisinin uygulandığı Sham gruplarına ait m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB oranları Sham+Taşıyıcı grubu ile benzerdi. (Şekil 21 ve 22).

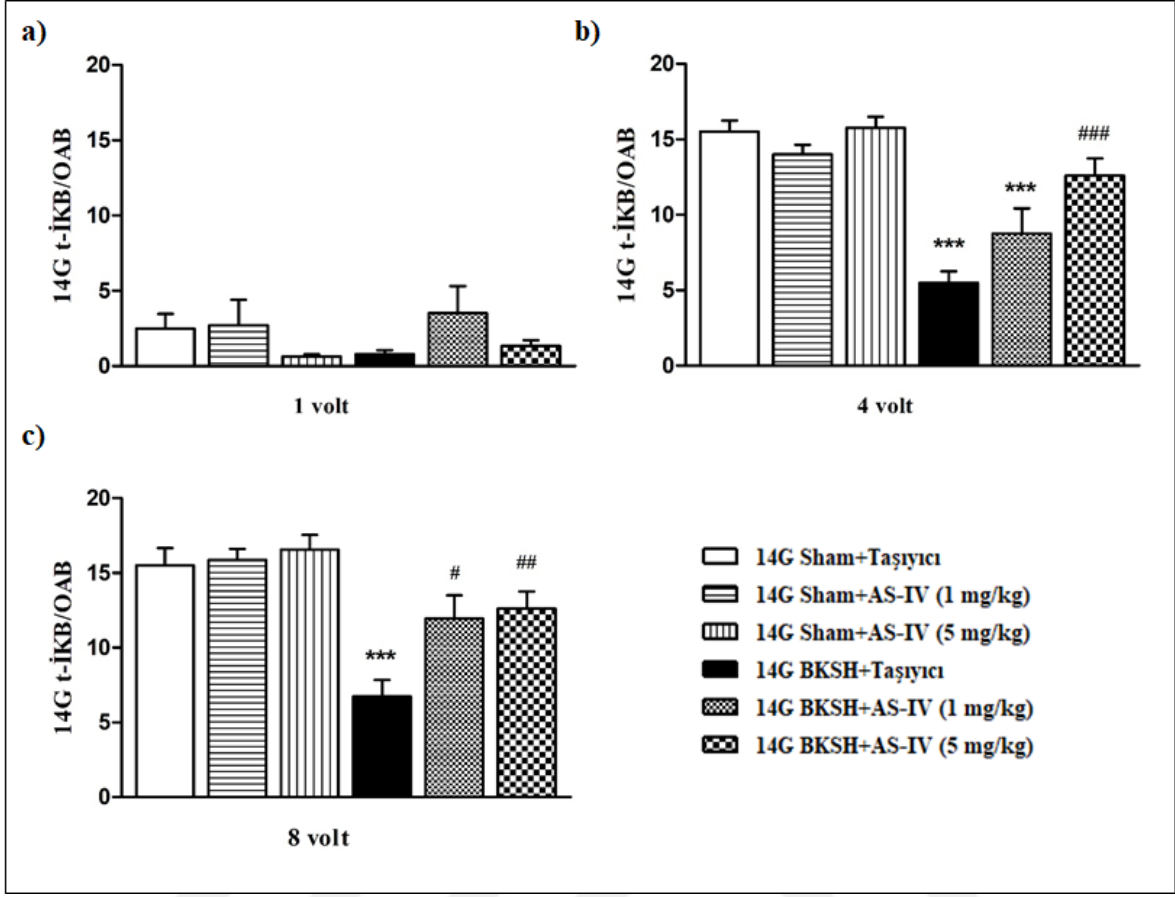




**Şekil 20.** 14 günlük protokol sonunda sıçanlarda KS'lerin 1 dk'lık 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonu sırasında kaydedilen İKB (yeşil) ve OAB (kırmızı) değerleri (ölçek çubuk 60 sn). a) Sham+Taşıyıcı, b) Sham+AS-IV (1 mg/kg), c) Sham+AS-IV (5 mg/kg), d) BKSH+Taşıyıcı, e) BKSH+AS-IV (1 mg/kg) ve f) BKSH+AS-IV (5 mg/kg).



**Şekil 21.** 14 günlük gruplarda KS'lerin 1, 4 ve 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar sonucu elde edilen m-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması (n=6). \*p<0.05 ve \*\*\*p<0.001 Sham+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, #p<0.05 ve ###p<0.001 BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı farkı ifade etmektedir



**Şekil 22.** 14 günlük gruplarda KS'lerin 1 volt, 4 volt ve 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar sonucu elde edilen t-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması (n=6). \*\*\*p<0.001 Sham+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, #p<0.05, ##p<0.01 ve ###p<0.001 BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

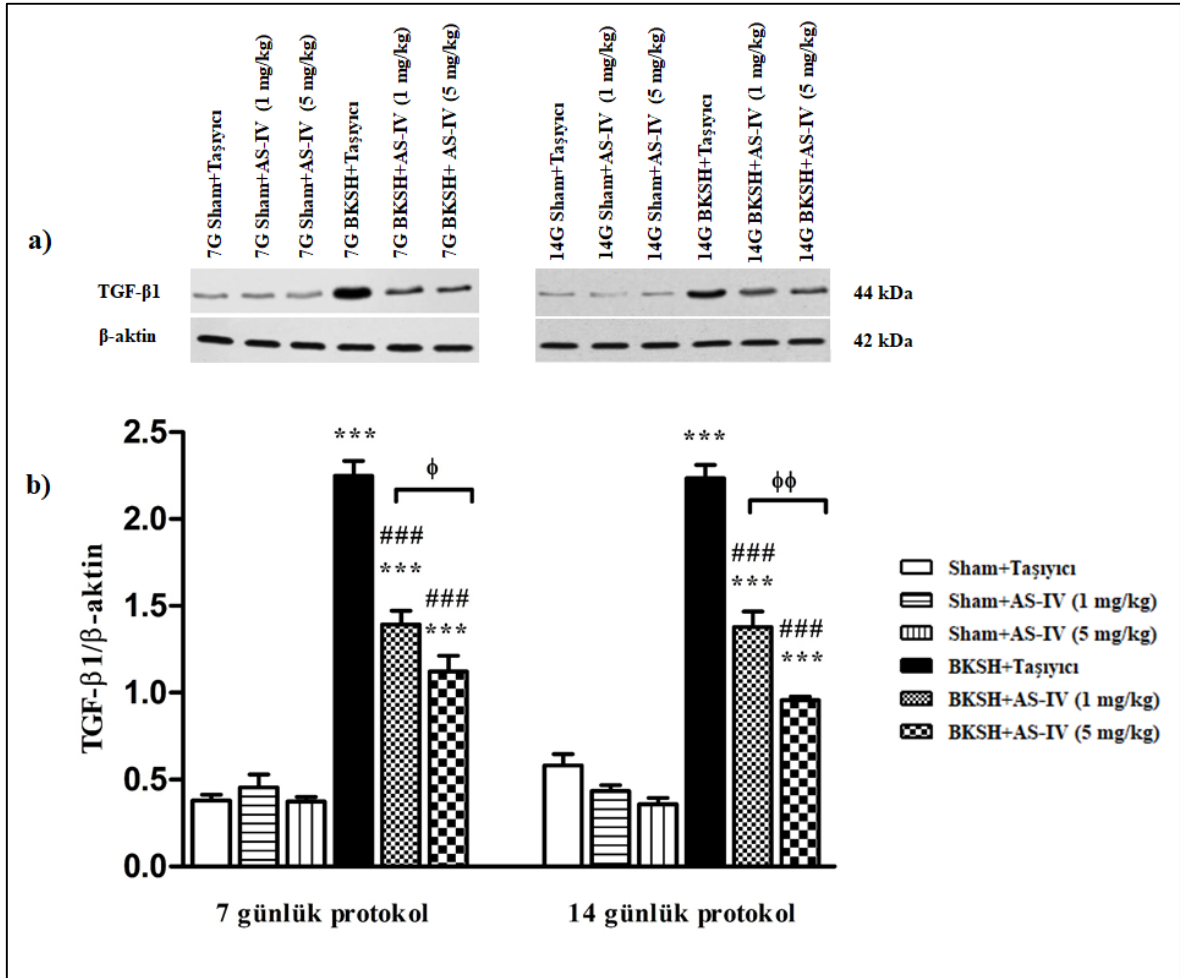
#### 4.3. Penil Doku Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Deney protokolleri boyunca BKSH ve Sham gruplarındaki sıçanlara uygulanan taşıyıcı ve AS-IV tedavileri ardından toplanan penil doku örneklerinde; TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3, pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>), Smad7 ve TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı aktivasyonu sonucu artış gösteren fibronektin düzeyleri semi-kantitatif olarak değerlendirildi.

##### 4.3.1. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisinin TGF- $\beta$ 1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Sonuçlarımız kavernoöz dokulardaki TGF- $\beta$ 1 seviyelerinin sinir hasarından sonraki 8. ve 15. günlerde BKSH+Taşıyıcı gruplarında Sham+Taşıyıcı gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığını gösterdi. 1 mg/kg ve 5 mg/kg AS-IV tedavisi alan Sham grupları ile Sham+Taşıyıcı grupları arasında TGF- $\beta$ 1 düzeyleri açısından her iki protokolde de istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. 7 ve 14 günlük BKSH+Taşıyıcı

gruplarında artış gösteren TGF- $\beta$ 1 düzeyleri, 1 mg/kg ve 5 mg/kg AS-IV tedavisi uygulanan BKSH gruplarında istatistiksel olarak doz bağımlı şekilde anlamlı azaldı. TGF- $\beta$ 1 düzeylerindeki azalma Sham+Taşıyıcı grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 23).

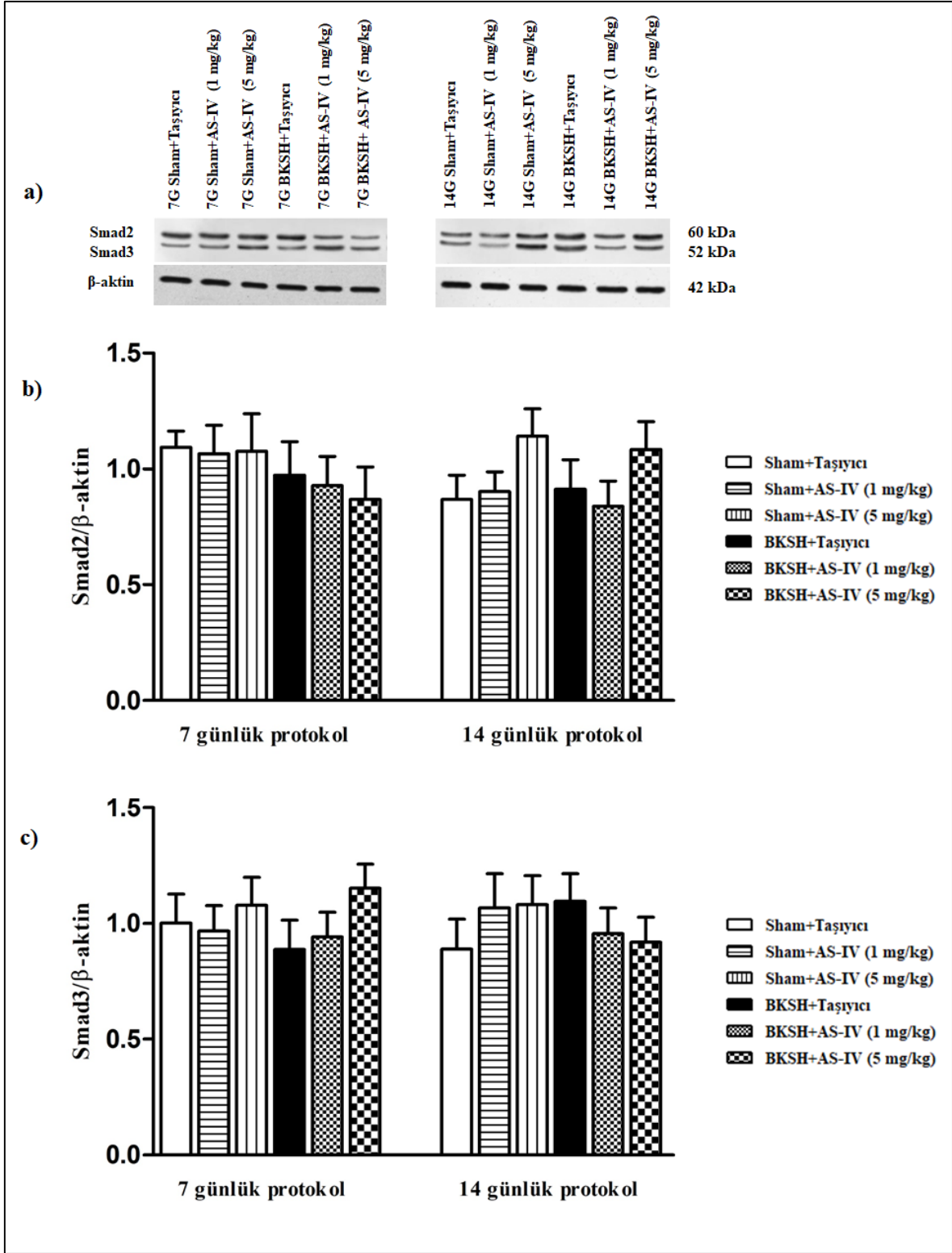


**Şekil 23.** Deney protokoller kapsamında AS-IV tedavisinin sıçan penil dokusundaki TGF- $\beta$ 1 ekspresyon seviyelerine etkisinin değerlendirilmesi. a) 7 ve 14 günlük deney gruplarında TGF $\beta$ 1 &  $\beta$ -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları, b) 7 ve 14 günlük deney gruplarında TGF- $\beta$ 1 ekspresyonu için yapılan dansitometrik analiz sonuçları (n=6). \*\*\*p<0.001 Sham+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, ###p<0.001 BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında,  $\phi$ p<0.05 ve  $\phi\phi$ p<0.01 BKSH+Tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir (n=6).

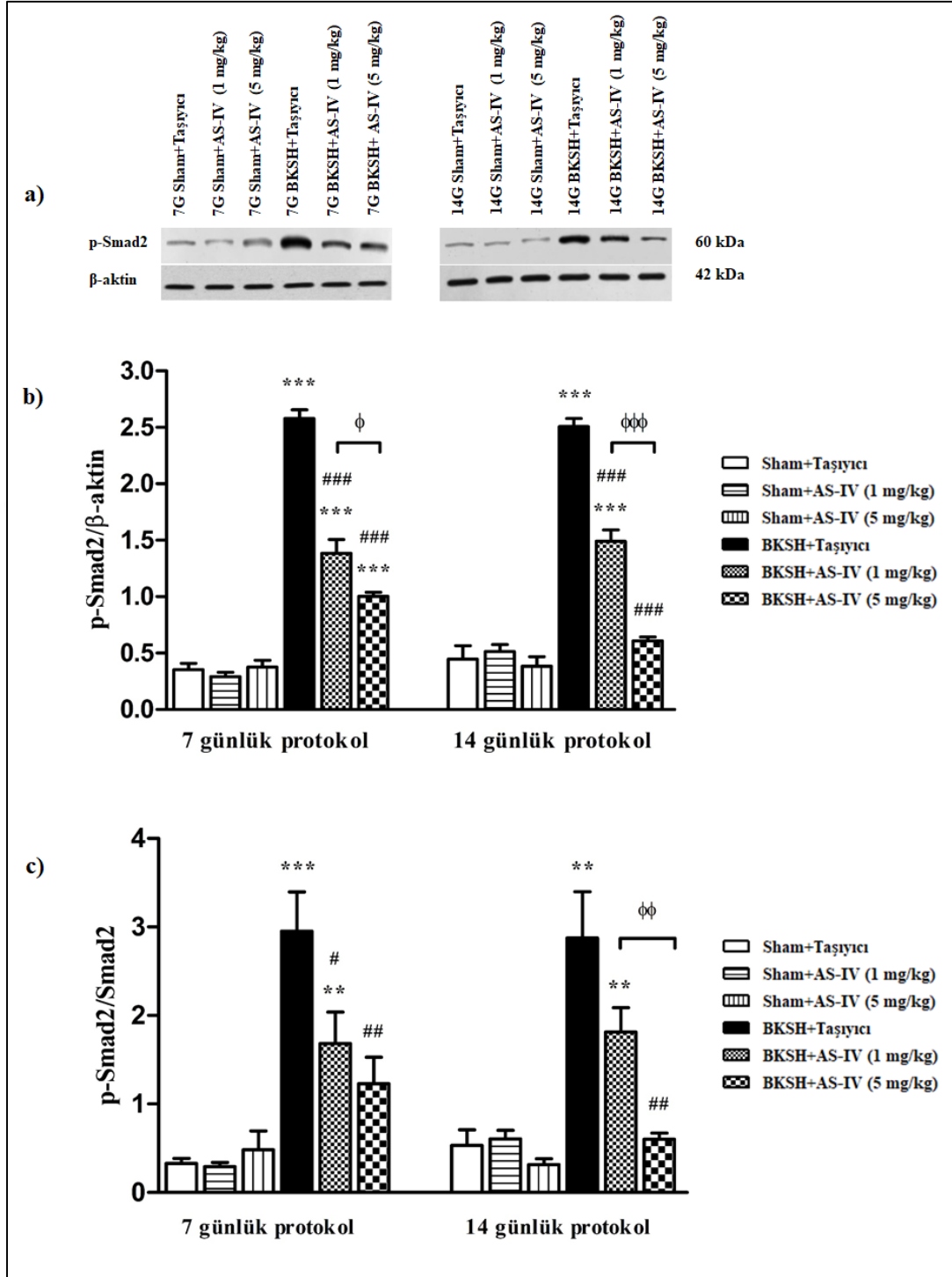
#### 4.3.2. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisinin pSmad2, Smad2 ve Smad3 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkisi

BKSH ve Sham uygulamalarından sonraki 8. ve 15. günlerde, her iki protokole ait deney grupları arasında Smad2 ve Smad3 protein seviyelerinde anlamlı fark bulunmadı (Şekil 24). Fibrotik süreçlerde rol oynayan ve Smad2 proteininin aktif formu olan pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) düzeyi hem 7 hem de 14 günlük BKSH+Taşıyıcı gruplarında Sham+Taşıyıcı gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı arttı. 7 ve 14 günlük AS-IV tedavisi uygulanan Sham gruplarına ait pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) düzeyleri Sham+Taşıyıcı gruplarına göre benzer bulundu. 1 mg/kg AS-IV tedavisi, 7 ve 14 günlük sinir hasarı ile indüklenen pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) seviyelerindeki artışı BKSH+Taşıyıcı gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı önledi. Ancak, pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) düzeylerindeki bu azalma Sham+Taşıyıcı grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. AS-IV tedavisi 5 mg/kg dozunda, 7 günlük sinir hasarı ile indüklenen pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) düzeyindeki artışı doz bağımlı şekilde anlamlı azaltırken, elde edilen pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) düzeyi Sham+Taşıyıcı grubuna kıyasla anlamlı fark gösterdi. 14 günlük protokolde ise 5 mg/kg AS-IV tedavisi sonucu elde edilen pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) düzeyi Sham+Taşıyıcı grubu ile anlamlı şekilde benzer bulundu (Şekil 25a). pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>)'nin fosforilasyon derecesini gösteren pSmad2/Smad2 oranı hem 7 hem de 14 günlük protokollerde BKSH+Taşıyıcı gruplarında Sham+Taşıyıcı grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı arttı. 1 mg AS-IV tedavisi uygulanan 7 günlük BKSH grubunda, sinir hasarı ile indüklenen pSmad2/Smad2 oranı BKSH+Taşıyıcı grubuna göre anlamlı düşük bulunurken, elde edilen pSmad2/Smad2 oranı Sham+Taşıyıcı grubu ile anlamlı benzerlik göstermedi. 1 mg/kg AS-IV tedavisi uygulanan 14 günlük BKSH grupları ise, sinir hasarı ile indüklenen pSmad2/Smad2 artışını anlamlı önleyemezken, 5 mg AS-IV tedavisi ise her iki protokolde de artan pSmad2/Smad2 oranını istatistiksel olarak anlamlı derecede kontrol düzeyine yakın geri çevirdi (Şekil 25b).





**Şekil 24.** Deney protokolleri kapsamında AS-IV tedavisinin sıçan penis dokusundaki Smad2 ve Smad3 protein ekspresyon seviyelerine etkisinin değerlendirilmesi (n=6). a) 7 ve 14 günlük deney gruplarında Smad2, Smad3 ve  $\beta$ -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; b) 7 ve 14 günlük deney gruplarında Smad2, c) 7 ve 14 günlük deney gruplarında Smad3 ekspresyonları için yapılan dansitometrik analiz sonuçları ( $p>0.05$ ).



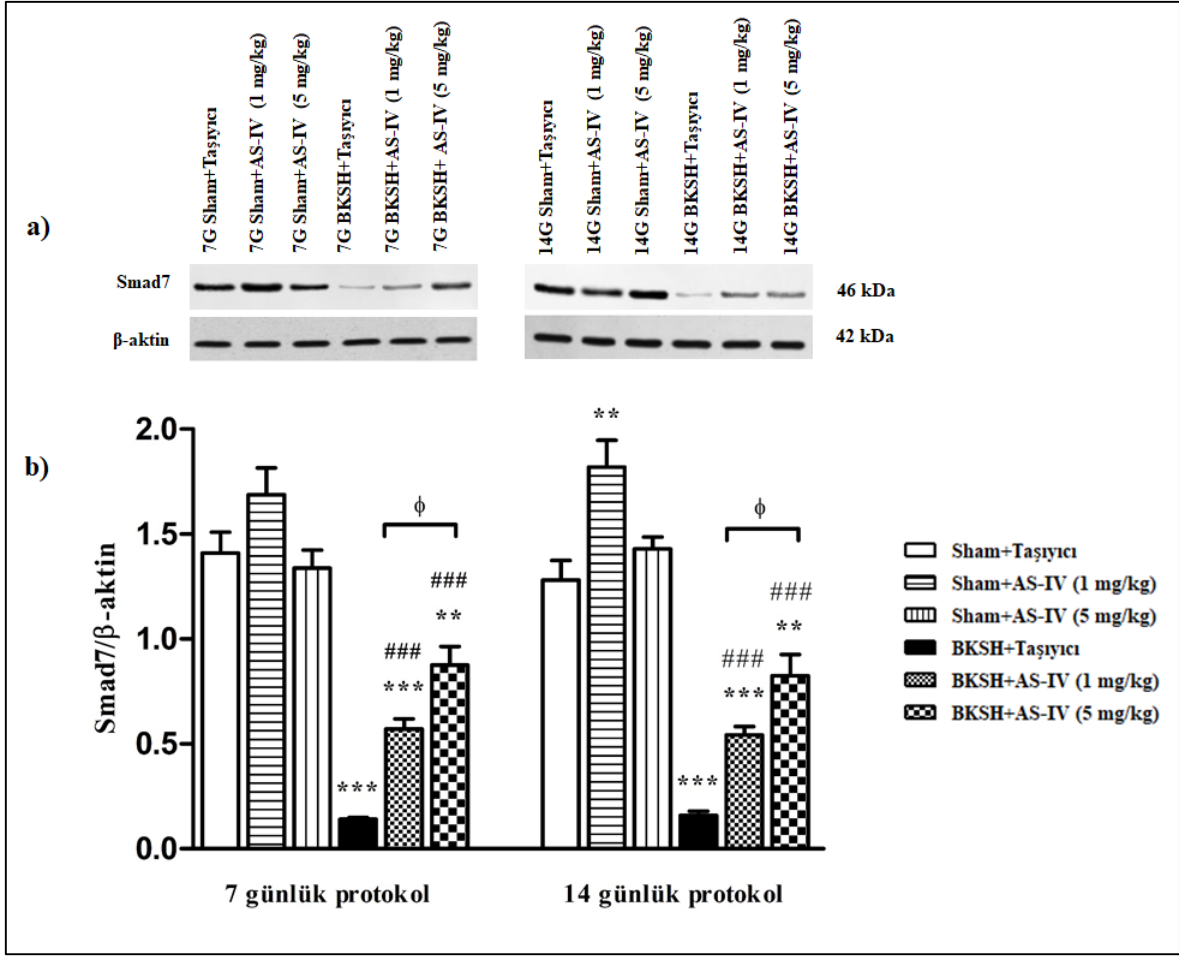
**Şekil 25.** Deney protokolleri kapsamında AS-IV tedavisinin sıçan penis dokusundaki pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) ekspresyon seviyelerine etkisinin değerlendirilmesi. a) 7 ve 14 günlük grupların pSmad2 ve β-aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları, b) 7 ve 14 günlük grupların pSmad2 ekspresyon seviyeleri ve c) 7 ve 14 günlük grupların pSmad2/Smad2 oranları. \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001 Sham+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında; #p<0.05, ##p<0.01 ve ###p<0.001 BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında; ϕp<0.05, ϕϕp<0.01 ve ϕϕϕp<0.001 BKSH+Tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir (n=6).

#### **4.3.3. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisinin Smad7 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi**

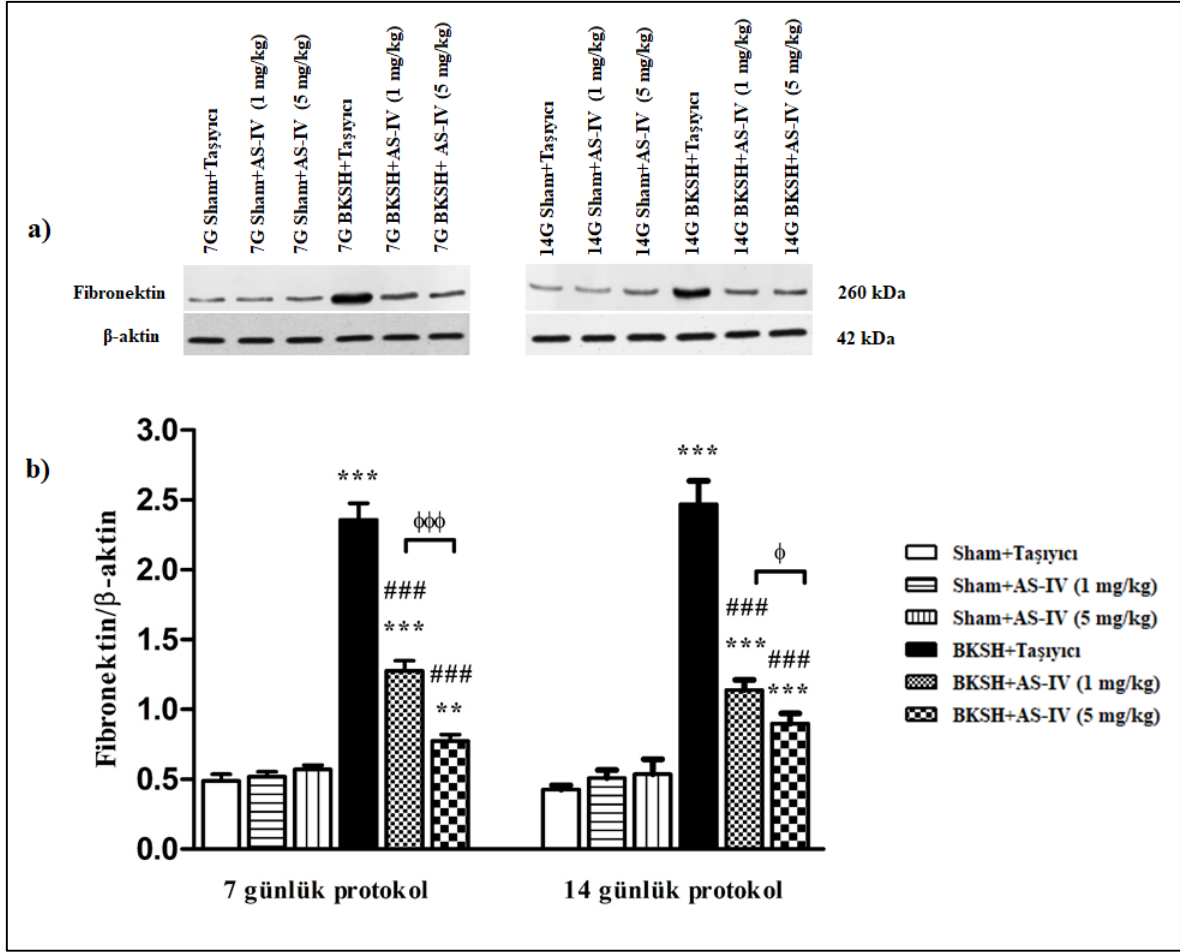
TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağının endojen inhibitörü olan Smad7 seviyeleri her iki protokole ait BKSH+Taşıyıcı gruplarında Sham+Taşıyıcı gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı azaldı. AS-IV tedavisinin Smad7 protein seviyeleri üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, 1 mg/kg AS-IV tedavisi alan 7 günlük Sham grubu ve Sham+Taşıyıcı grubu arasında Smad7 seviyeleri açısından anlamlı bir fark gözlenmezken, 14 günlük protokolde anlamlı artış görüldü. 8. ve 15. günlerde sinir hasarı ile indüklenen Smad7 düzeylerindeki azalma, 1 mg/kg ve 5 mg/kg AS-IV tedavisi uygulanan BKSH gruplarında BKSH+Taşıyıcı gruplarıyla karşılaştırıldığında doz bağımlı şekilde anlamlı önlenirken; elde edilen Smad7 düzeyleri Sham+Taşıyıcı gruplarına göre anlamlı düşük bulundu (Şekil 26).

#### **4.3.4. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisinin Fibronektin Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi**

Sonuçlarımız fibronektin düzeylerinin her iki protokole ait BKSH+Taşıyıcı gruplarında Sham+Taşıyıcı gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığını gösterdi. 7 ve 14 günlük BKSH+Taşıyıcı gruplarının fibronektin seviyelerindeki anlamlı artış, 1 mg/kg ve 5 mg/kg AS-IV tedavisi uygulanan BKSH gruplarında BKSH+Taşıyıcı gruplarına göre doz bağımlı şekilde anlamlı önlenirken; elde edilen fibronektin seviyeleri Sham+Taşıyıcı grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı fark gösterdi. AS-IV tedavisi uygulanan Sham grupları ile Sham+Taşıyıcı gruplarına ait fibronektin düzeyleri ise hem 7 hem de 14 günlük protokollerde benzer bulundu. (Şekil 27).



**Şekil 26.** Deney protokolleri kapsamında AS-IV tedavisinin sıçan penis dokusunda Smad7 protein ekspresyon seviyelerine etkisinin değerlendirilmesi. a) 7 ve 14 günlük deney gruplarında Smad7 & β-aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları, b) 7 ve 14 günlük deney gruplarında Smad7 ekspresyonu için yapılan dansitometrik analiz sonuçları (n=6). \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001 Sham+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, ###p<0.001 BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, φp<0.05 BKSH+Tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir (n=6).



**Şekil 27.** Deney protokolleri kapsamında AS-IV tedavisinin sıçan penis dokusundaki fibronektin ekspresyon seviyelerine etkisinin değerlendirilmesi. a) 7 ve 14 günlük deney gruplarında fibronektin &  $\beta$ -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları, b) 7 ve 14 günlük deney gruplarında fibronektin ekspresyonu için yapılan densitometrik analiz sonuçları (n=6). \*\* $p < 0.01$  ve \*\*\* $p < 0.001$  Sham+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, ### $p < 0.01$  BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında,  $\phi p < 0.05$  ve  $\phi\phi\phi p < 0.001$  BKSH+Tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir (n=6).

#### **4.4. Histopatolojik Değerlendirme**

Çalışmada transvers kavernoöz doku kesitleri MTB kiti ile muamele edildikten sonra histopatolojik değişimler endotel doku bütünlüğü, düz kas ve bağ doku/kolajen içeriği yönünden mikroskopik olarak incelendi. Ardından boyalı kesitlerdeki bağ doku/kolajen artışı ve düz kas kaybı skorlanarak, kavernoöz doku fibrozis açısından semi-kantitatif olarak değerlendirildi.

##### **4.4.1. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisi Ardından Histopatolojik Bulguların Mikroskopik İncelenmesi**

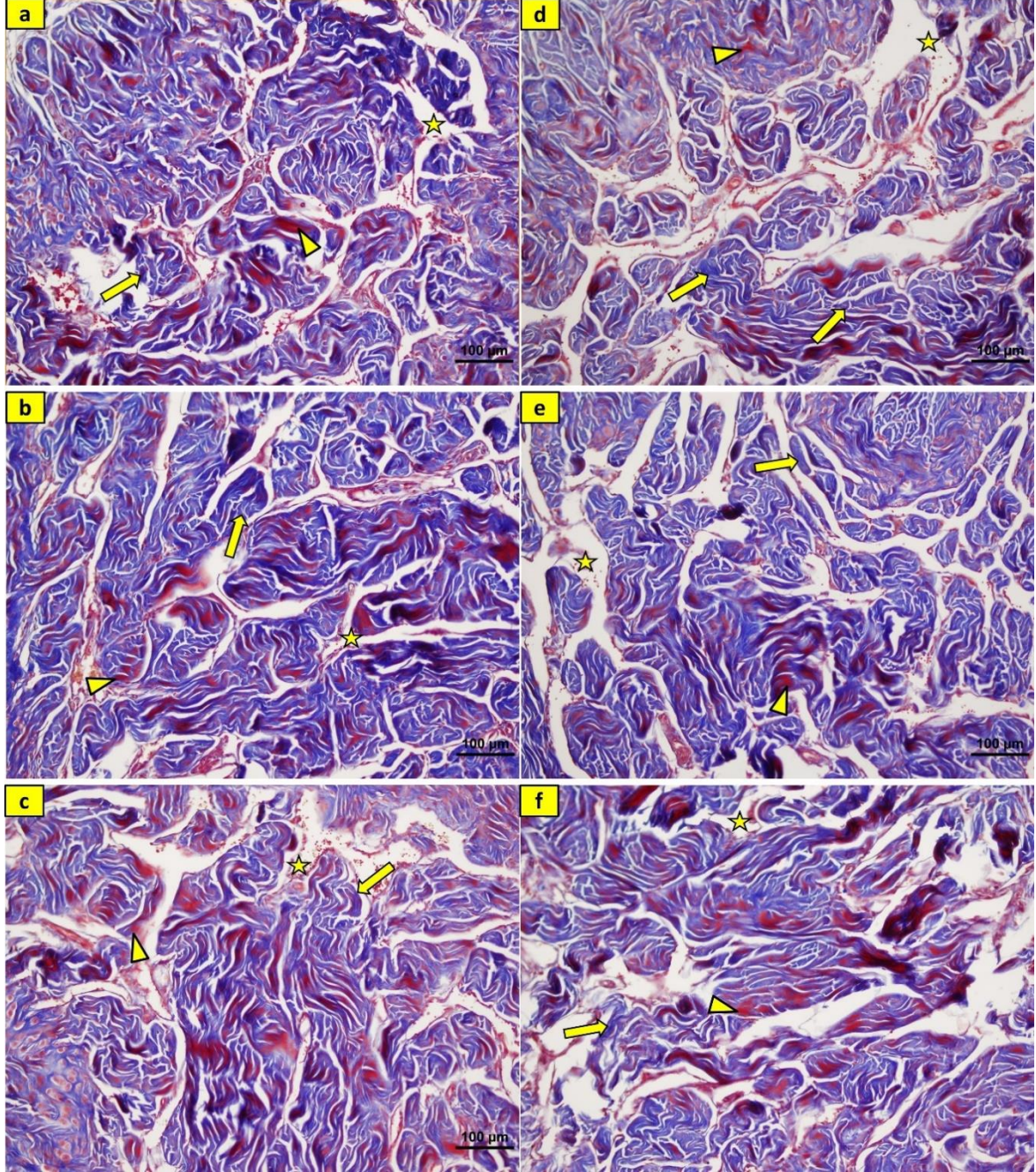
7 ve 14 günlük Sham+Taşıyıcı gruplarında, korpus kavernozumların endotelle döşeli geniş sinüzoidal ağı, normal görünümde kırmızı renkte düz kas yapısı ve mavi renkte bağ doku/kolajen içeriği mikroskopik olarak gösterildi. 1 mg/kg ve 5 mg/kg AS-IV tedavisi uygulanan Sham grupları Sham+Taşıyıcı grupları ile benzer morfolojik yapı gösterdi. Her iki protokole ait BKSH+Taşıyıcı grupları Sham+Taşıyıcı gruplarıyla kıyaslandığında doku morfolojisinin bozulduğu, korpus kavernozumlardaki düz kas içeriğinin azaldığı; bağ doku ve kolajen lif yoğunluğunun ise arttığı gözlemlendi. 1 mg/kg AS-IV tedavisi uygulanan her iki protokoldeki BKSH gruplarında ve 5 mg/kg AS-IV tedavisi uygulanan 7 günlük BKSH gruplarında kavernozaal düz kas ve bağ doku/kolajen içeriği BKSH+Taşıyıcı gruplarıyla benzerdi. 5 mg/kg AS-IV tedavisi alan 14 günlük BKSH gruplarında ise Sham+Taşıyıcı grubundaki görünüme ulaşılmasa da BKSH+Taşıyıcı grubuna göre kavernozaal düz kas içeriğinde artış ve bağ doku/kolajen içeriğinde düşüş olduğu gözlemlendi (Resim 6 ve 7).

##### **4.4.2. 7 ve 14 Günlük AS-IV Tedavisinin BKSH ile İndüklenen Histopatolojik Değişiklikler Üzerine Etkisi**

Sonuçlarımız, sinir hasarı ile indüklenen kavernozaal doku fibrozis şiddetinin karakterize edilmesi amacıyla kullanılan bağ doku/kolajen artış skoru ve düz kas kaybı skorunun her iki protokole ait BKSH+Taşıyıcı gruplarında Sham+Taşıyıcı gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını gösterdi. Gelişen fibrozis şiddeti 14 günlük BKSH+Taşıyıcı grubunda 7 günlük protokole göre anlamlı yüksek bulundu. 1 mg/kg AS-IV tedavisi, 7 ve 14 günlük BKSH gruplarında sinir hasarı ile indüklenen fibrozis gelişimini önleyemedi. 5 mg/kg AS-IV tedavisi de 7 günlük BKSH grubunda sinir hasarı ile indüklenen fibrozis gelişimini önleyemezken; 14 günlük protokolde BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında fibrozis şiddetindeki artışı anlamlı önledi. Sonuçlar Sham grubu ile

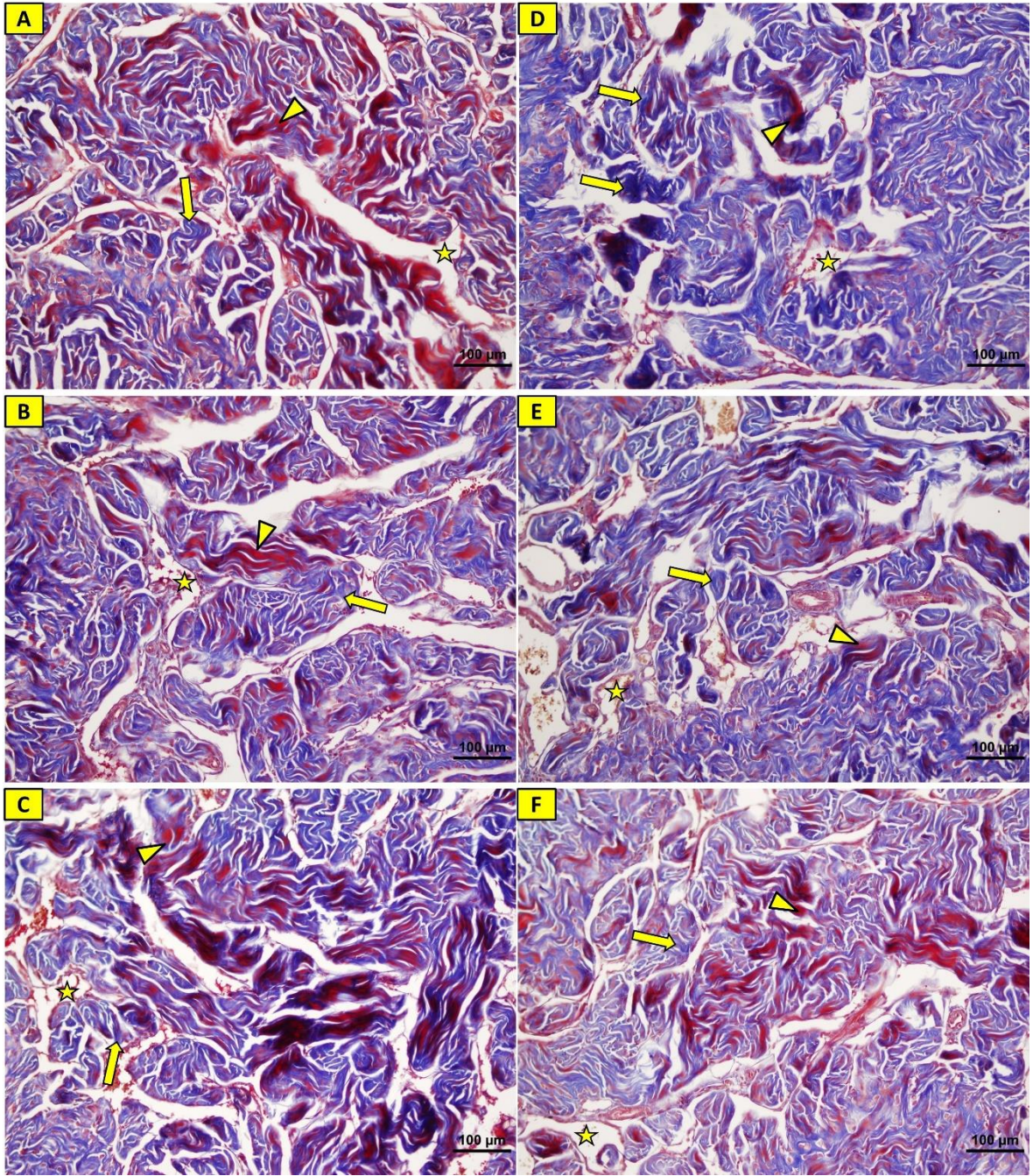


anlamlı benzerlik göstermedi (Şekil 28). Tüm gruplardaki sıçanların kavernozaal doku fibrozis dereceleri (skorları) Tablo 7’de ayrıca sunulmuştur.



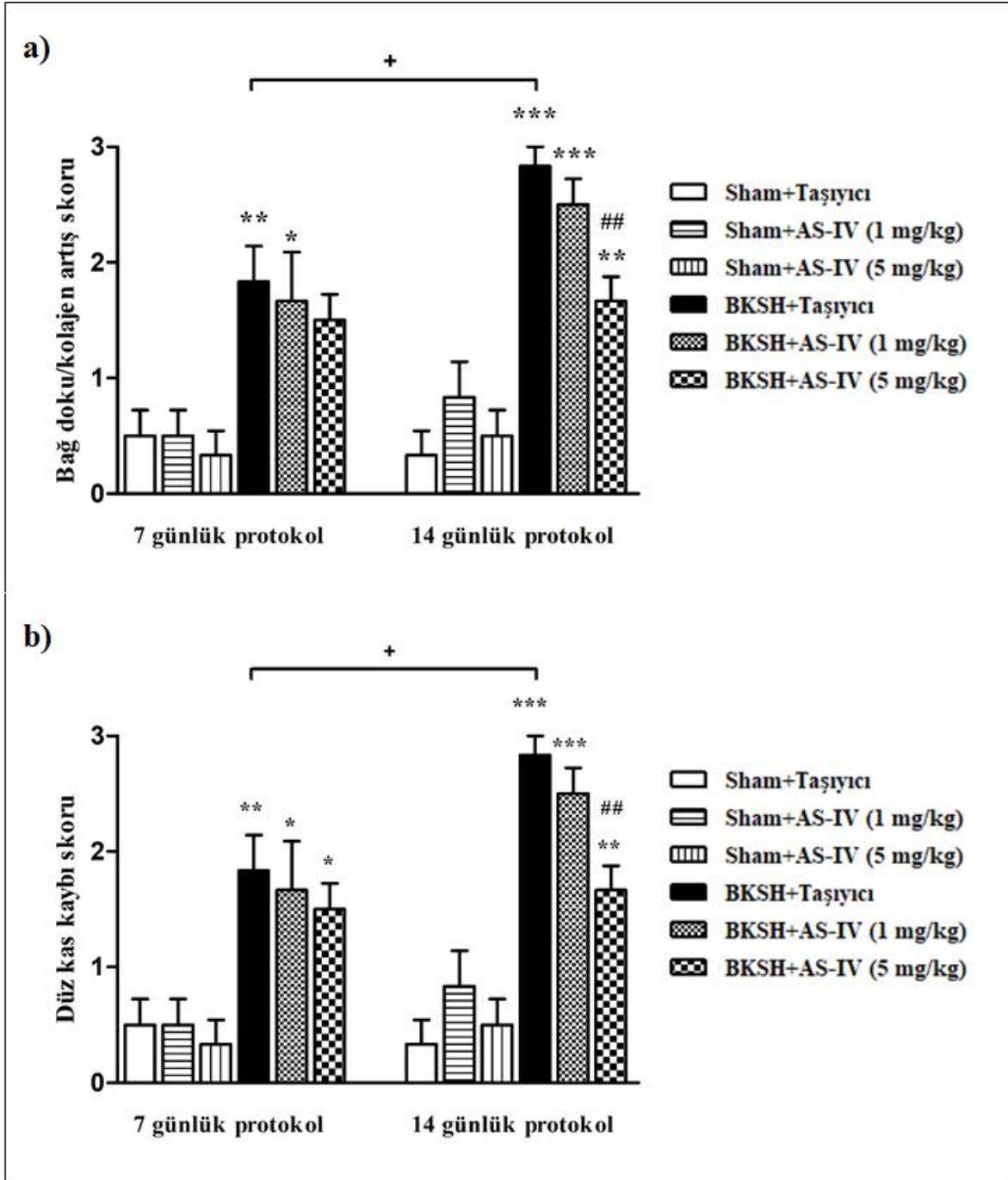
**Resim 6.** 7 günlük protokole ait sıçan penis kesitlerinin histopatolojik görünümü. a) Sham+Taşıyıcı, b) Sham+AS-IV (1 mg/kg), c) Sham+AS-IV (5 mg/kg), d) BKSH+Taşıyıcı, e) BKSH+AS-IV (1 mg/kg) ve f) BKSH+AS-IV (5 mg/kg). Düz kas (kırımtı renk/sarı ok başı ile), kolajen lifler ve bağ doku (mavi renk/sarı ok ile), sinüzoid (sarı yıldız ile) (Masson Trikrom; X200; ölçek çubuk 100 µm).





**Resim 7.** 14 günlük protokole ait sıçan penis kesitlerinin histopatolojik görünümü. A) Sham+Taşıyıcı, B) Sham+AS-IV (1 mg/kg), C) Sham+AS-IV (5 mg/kg), D) BKSH+Taşıyıcı, E) BKSH+AS-IV (1 mg/kg) ve F) BKSH+AS-IV (5 mg/kg). Düz kas (kırmızı renk/sarı ok başı ile), kolajen lifler ve bağ doku (mavi renk/sarı ok ile), sinüzoid (sarı yıldız ile) (Masson Trikrom; X200; ölçek çubuk 100 µm).





**Şekil 28.** Protokoller sonunda deney gruplarındaki sıçanların korpus kavernozumlarındaki **a)** kavernozal bağ doku ve kolajen artışının değerlendirilmesi (n=6). Bağ doku ve kolajen artışı; 0: Normal, 1: Hafif bağ doku/kolajen artışı, 2: Orta derecede bağ doku/kolajen artışı ve 3: şiddetli bağ doku/kolajen artışı şeklinde skorlandı. **b)** düz kas kaybının değerlendirilmesi (n=6). Kavernozal düz kas kaybı; 0: Normal (Azalma yok), 1: Hafif derecede azalma, 2: Orta derecede azalma, 3: İleri derecede azalma mevcut şeklinde skorlandı. \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001 Sham+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, ##p<0.01 BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, +p<0.05 7 ve 14 günlük BKSH+Taşıyıcı grupları karşılaştırıldığında, φp<0.05 BKSH+Tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

**Tablo 7.** Deney protokolleri sonunda sıçan korpus kavernozumlarındaki fibrozisin değerlendirilmesi (n=6).

| 7 günlük protokol    |                           | 14 günlük protokol   |                                  |
|----------------------|---------------------------|----------------------|----------------------------------|
| Deney grupları       | Fibrozis skoru            | Deney grupları       | Fibrozis skoru                   |
| Sham+Taşıyıcı        | 0.5 ± 0.22                | Sham+Taşıyıcı        | 0.33 ± 0.21                      |
| Sham+AS-IV (1 mg/kg) | 0.5 ± 0.22                | Sham+AS-IV (1 mg/kg) | 0.83 ± 0.31                      |
| Sham+AS-IV (5 mg/kg) | 0.33 ± 0.21               | Sham+AS-IV (5 mg/kg) | 0.5 ± 0.22                       |
| BKSH+Taşıyıcı        | 1.83 ± 0.31 <sup>**</sup> | BKSH+Taşıyıcı        | 2.83 ± 0.16 <sup>***, +</sup>    |
| BKSH+AS-IV (1 mg/kg) | 1.67 ± 0.42 <sup>*</sup>  | BKSH+AS-IV (1 mg/kg) | 2.5 ± 0.22 <sup>***</sup>        |
| BKSH+AS-IV (5 mg/kg) | 1.5 ± 0.22 <sup>*</sup>   | BKSH+AS-IV (5 mg/kg) | 1.67 ± 0.21 <sup>**, ##, ϕ</sup> |

Kavernoza fibrozis gelişimi; 0: Normal ( fibrozis yok), 1: hafif derecede fibrozis gelişimi, 2: orta derecede fibrozis gelişimi ve 3: şiddetli fibrozis gelişimi şeklinde skorlandı. <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01 ve <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 Sham+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, <sup>##</sup>p<0.01 BKSH+Taşıyıcı grubuyla karşılaştırıldığında, <sup>+</sup>p<0.05 7 ve 14 günlük BKSH+Taşıyıcı grupları karşılaştırıldığında, <sup>ϕ</sup>p<0.05 ise BKSH+Tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Prostat kanseri, küresel anlamda en yüksek prevalans ve insidansa sahip neoplazilerden biri olup dünya genelindeki yıllık kanser vakalarının yaklaşık %13'ünü oluşturmaktadır (1, 114, 237). Klinikte yaşam beklentisi yüksek olan erken evre veya lokalize prostat kanseri tanısı alan hastalara çoğunlukla RP uygulanmaktadır (12, 116). İşlemin amacı tümöral dokunun çıkarılması ve hastanın yaşam kalitesinin iyileştirilmesi dışında, mevcut kontinans ve erektile fonksiyonların korunmasını sağlamaktır (2, 238). Gelişmiş operasyonel yöntemlere rağmen KS'lerin prostat yüzeyi boyunca yaygın mikroskobik konfigürasyonel dallanmalar göstermesi RP operasyonu sırasında KS'lerin farklı nedenlerle hasarlanmasına sebep olabilmektedir (14, 113). Bu durum klinik anlamda RP ile ilişkili ED'ye neden olan en önemli risk faktörlerinden biridir (9). RP sonrası hastaların önemli bir kısmında farklı derecelerde EF kaybı görülmektedir (5, 7). RP ile ilişkili ED'li hastaların yalnızca %12-17'si operasyondan sonraki ilk altı ayda PDE5 inhibitörlerine istenilen düzeyde yanıt vermekte ve bu direnç KS'lerin aylar veya yıllar süren rejenerasyonu sırasında gelişen iskemik sürecin indüklediği kavernozaal düz kas kaybı ve fibrozis sonucu kronikleşebilmektedir (12, 18, 148, 149).

Güncel medikal yaklaşımlar erektile doku elastikiyetinin bozulmasına neden olan histopatolojik değişiklikleri geri çevirmede yetersiz kaldığından RP ile ilişkili ED tedavisinde düşük etkinliğe sahiptir (36, 108). Bu nedenle mevcut tedavilere alternatif olma potansiyeline sahip etkili ve aynı zamanda tolere edilebilir ajanların keşfedilmesi amacıyla yapılan çalışmalar önem kazanmıştır (108). RP ile ilişkili ED'nin ana nedeni nörojenik olduğundan KS rejenerasyonuna odaklanan çalışmalar sonunda nöronal rejenerasyon elde edilse bile kavernozaal doku mikro mimarisindeki irreversibl değişikliklerden dolayı erektile kapasitenin tam anlamıyla geriye dönmemesi, fibrotik süreçleri aktive eden yolaklara odaklanılmasını sağlamıştır (31, 36, 108). TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı, KS hasarı sonrasında gelişen nöronal dejenerasyon, kavernozaal dokuda meydana gelen düz kas hücre apoptozisi, endotelial disfonksiyon ve fibroblast/miyofibroblast dönüşümüyle tetiklenen ESM proteinlerinin birikimi ile karakterize yapısal anomalilerle ilgili gen ekspresyonlarını düzenleyen bir yolaktır (11-14). Literatürde TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı inhibisyonunun BKSH'yi takiben azalan erektile cevabı iyileştirdiği, nöronal rejenerasyonu artırdığı ve korpus kavernozaal mikromimarisini koruduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (23). Bu kapsamda; çalışmamızda TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal aktivasyonunu yolağın farklı elemanları

üzerinden inhibe ederek peritoneal (232), miyokardial (27), pulmoner (28), renal (29) ve hepatik (30) dokulardaki fibrotik süreçleri önlediği tespit edilen AS-IV'ün; BKSH modeliyle indüklenen ED'de olası terapötik etkisi fonksiyonel, morfolojik ve moleküler düzeyde araştırılmıştır.

Çalışmada, RP ile ilişkili ED'nin karmaşık doğasının yansıtılması, altta yatan mekanizmaların aydınlatılması ve yeni tedavi stratejilerinin değerlendirilmesi amacıyla BKSH modeli kullanıldı (183, 187). Çift taraflı sinir koruyucu RP sırasında meydana gelen kısmi sinir hasarını yansıtan bu model nörorejeneratif, nöroprotektif ve antifibrotik ajanların etkinliklerinin değerlendirilmesine olanak vermesi sebebiyle tercih edildi (13, 15, 183). Bu kapsamda hasar modeli KS'lerin üçer dk mekanik olarak sıkıştırılması ile oluşturuldu (146). Sıkıştırma işlemin süresi, şiddeti ve sayısı çalışmanın amacı doğrultusunda revize edildi (15, 166, 192). Deney protokollerinin süresi daha önceki uzun vadeli çalışmalarda gözlemlenen ve genellikle KS rejenerasyonuna bağlı fonksiyonel iyileşmelerin önüne geçilmesi amacıyla 7 ve 14 gün olarak belirlendi (31, 146). Deney kapsamında Sham ve BKSH model gruplarına operasyon gününden (1. gün) itibaren taşıyıcı veya 1 mg/kg/gün ve 5 mg/kg/gün AS-IV i.p. uygulandı. Protokollerin sonunda (8. ve 15. gün) öncelikle AS-IV tedavisinin EF üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla sağ KS'lerin 1, 4 ve 8 voltluk elektriksel stimülasyonları sırasında *in vivo* İKB ve OAB (eş zamanlı) ölçümleri yapıldı. EF değerlendirilmesinde, kan basıncının erektile cevap üzerindeki etkisinin normalizasyonunun sağlanması amacıyla literatürdeki birçok çalışmada da kullanılan m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB oranlarından faydalanıldı (184, 239).

Sonuçlarımıza göre, 1 voltluk stimülasyon sonrasında m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB oranları gruplar arasında anlamlı bir fark göstermezken; 4 ve 8 voltluk uyarılar sonrası hasar grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında erektile kapasitedeki anlamlı azalma hem 7 hem de 14 günlük protokollerde gösterildi. Yüksek voltaj değerlerinde gösterilen bu anlamlı düşüş, sinir hasarı tarafından indüklenen EF kaybı olarak yorumlandı. Sonuçlarımızın literatürdeki farklı sıçan BKSH modelleri ve fonksiyonel ölçüm parametrelerinin kullanıldığı daha önceki çalışmalara ait bulgular ile tutarlılık göstermesi metodolojimizin etkinliğini kanıtladı. Yapılan bir çalışmada; sıçan BKSH (3 dk *crush*) ile indüklenen ED modelinde, KS'lerin 4 voltluk elektriksel stimülasyonu ile hasar grubuna ait m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerlerinin 7 gün sonunda kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı gösterilmiştir (146). Chen ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 2 dk'lık sıçan

BKSH modeli sonrasında KS'lerin elektriksel stimölasyonu ile elde edilen fonksiyonel parametrelerinin ( $\Delta$ -İKB/OAB) 14. günde en belirgin olmak üzere 7, 14, 21 ve 28. günlerde kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı; 21. ve 28. günlerde ise bu anlamlılığın giderek azaldığı gösterilmiştir (193). Farklı bir çalışmada da sıçan BKSH modelini (15 sn x 3 tekrar) takiben 14. ve 30. günlerde 2, 4, 6 ve 8 voltluk stimölasyonlar sonrası azalan EF (t-İKB/OAB ve m-İKB/OAB) ile birlikte gelişen kavernoza fibrozis raporlanmıştır (163). Kim HJ ve arkadaşları 30 sn x 3 tekrarlı sıçan BKSH modelinden 12 hafta sonraki ED'yi (azalan m-İKB/OAB); 24. hafta sonunda ise kavernoza dokuda artan eNOS ve nNOS seviyeleri ile birlikte kontrole yakın bir fonksiyonel iyileşmeyi (artan m-İKB/OAB) göstermişlerdir. (240). Wu YN ve arkadaşları sıçan BKSH modeli (2 dk *crush*) sonrası gelişen patofizyolojik süreçleri incelemek için yaptıkları bir çalışmada; nöronal hasarın hemen ardından (1. gün) başlamak üzere EF'nin (t-İKB,  $\Delta$ -İKB, m-İKB/OAB ve  $\Delta$ -İKB/OAB) 7. ve 14. günlerde anlamlı azaldığı, 28. günde ise kısmi spontan iyileşme gösterdiğini belirtmişlerdir. Fonksiyonel sonuçlarla tutarlı şekilde, dorsal penil sinir üzerindeki nNOS pozitif sinir liflerinin sayısının 7. günden 21. güne kadar önemli ölçüde azaldığı; hasardan 7 ve 14 gün sonra gelişen akson kaybı ve KS demiyelinizasyonunun ise spontan nöronal iyileşmenin başlaması ile 21. günde tersine dönmeye başlarken 28. günde rejenerasyonun kısmen de olsa gerçekleştiği belirtilmiştir. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 7. ve 14. günlerde artan apoptotik süreçlerin 28. günde azaldığı vurgulanmıştır. Bu durum yaralanmadan 28 gün sonra KS'lerin kısmi rejenerasyonu sonucu erektil fonksiyonun iyileşebileceğini göstermiştir (31). Yapılan başka çalışmada ise fare BKSH modeli (2 dk *crush*) ardından 3 gün sonra başlayan ve 28. güne kadar önemli derecede azalan erektil cevabın 8. ve 12. haftalar arasında büyük ölçüde geri dönebileceği raporlanmıştır (13). BKSH modelleri ardından elde edilen fonksiyonel verilerin değişkenliği deneysel prosedürlerin süresiyle artan nöronal rejenerasyon seviyelerine bağlansa da; mekanik sıkıştırma yöntemlerinde kullanılan cerrahi aletin özellikleri, hasarın süresi ve şiddeti, elektriksel stimölasyon parametreleri, deney hayvanlarının tür farklılığı ve yöntemi gerçekleştiren araştırmacılardan kaynaklanan değişkenlerden ileri gelebileceği düşünülmektedir (193, 240).

Literatürde AS-IV'ün ED üzerindeki etkilerini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mao ve arkadaşları streptozotosin ile indüklenen sıçan diyabetik nefropati modelinde, 8 hafta boyunca 40 mg/kg/gün oral gavaj şeklinde uygulanan AS-IV tedavisinin mezangial hücre proliferasyonunu ve renal fibrozu TGF- $\beta$ 1/Smad/miR-192 sinyal yolağı inhibisyonu ile önleyebileceğini göstermişlerdir (241). Benzer bir çalışmada 14 hafta

boyunca yüksek yağlı diyet uygulanan KKA $\gamma$  farelerin kullanıldığı diyabetik (tip-2) nefropati modelinde 10 hafta boyunca hergün 40 mg/kg dozda oral AS-IV tedavisinin 24. hafta sonunda tübüler epitelyal mezenkimal dönüşümü ve renal interstisyel fibrozisi önlediği bildirilmiştir. AS-IV mevcut renoprotektif etkisi TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki inhibitör etkinliği ile ilişkilendirilmiştir (242). Başka bir araştırma, sıçanlarda 8 hafta boyunca haftada iki kez 20, 40 ve 80 mg/kg oral AS-IV uygulamasının T $\beta$ -R1, TGF- $\beta$ 1, pSmad2, pSmad3,  $\alpha$ -SMA ekspresyon artışını ve Smad7 ekspresyonundaki azalmayı doz-bağımlı şekilde engelleyerek karbon tetraklorür (CCI4) ile indüklenen hepatik fibrozis gelişimini önleyebileceğini göstermiştir (30). Li ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada sıçan UO modeliyile indüklenen renal fibrozisin 14 gün boyunca 3.3, 10 ve 33 mg/kg/gün oral AS-IV tedavisi ile önlenebileceği ve bu etkinin TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı inhibisyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (29). Görüldüğü gibi AS-IV'ün çeşitli dokularda TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı aracılı antifibrotik etkilerinin araştırıldığı *in vivo* çalışmalarda kullanılan dozlar ışığında; BKSH modeli ile indüklenen EF kaybı üzerine AS-IV'ün olası terapötik etkinliğinin araştırılması amacıyla seçilen tedavi dozları, maddenin düşük biyoyararlanımı da göz önünde bulundurularak 1 mg/kg ve 5 mg/kg i.p. uygulama şeklinde belirlendi. Maddenin sulu tamponlardaki çözünürlük problemi sebebiyle, taşıyıcı olarak %1'lik DMSO/SF çözeltisi kullanıldı. Protokoller boyunca sıçanların hiçbirinde, mevcut dozlarda akut toksisite bulguları raporlanmadı. Literatürde doz seçimi ve uygulama yöntemimizi destekler nitelikte olan farklı çalışmalar da bulunmaktadır. Zhang ve arkadaşlarınca yapılan bir çalışmada, farelerde siyatik sinir hasarı sonrası 2 hafta boyunca 8 ardışık gün 2.5, 5 ve 10 mg/kg i.p. AS-IV tedavisinin siyatik sinir rejenerasyonuna doz-bağımlı şekilde katkıda bulunduğu gösterilmiştir (243). AS-IV'ün izoproterenol ile indüklenen sıçan miyokardial hasarı üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada; modelden 1 gün önce başlanan ve 8 gün boyunca 5 mg/kg/gün i.p AS-IV tedavisinin hücre içi Ca<sup>+2</sup> homeostazını ve enerji metabolizmasını düzenleyerek kardiyoprotektif etki gösterebileceği vurgulanmıştır (244).

Fonksiyonel verilerimiz, 7 günlük BKSH sonrası azalan EF üzerine 1 mg/kg AS-IV tedavisinin etkisiz olduğunu gösterdi. 5 mg/kg AS-IV tedavisinin ise sinir hasarı ile indüklenen EF'deki azalmayı kısmen önlediği gösterildi. 14 günlük protokolde, 1 mg/kg AS-IV tedavisinin uygulandığı BKSH gruplarında sinir hasarı ile indüklenen m-İKB/OAB değerindeki azalma anlamlı şekilde önlenirken; t-İKB/OAB değerlerindeki azalma ise kısmen önlendi. 5 mg/kg AS-IV tedavisi sinir hasarı ile indüklenen EF'deki azalmayı ise anlamlı önledi. Bulgularımız neticesinde AS-IV tedavisinin sıçan BKSH modeli ile

indüklenen ED'deki koruyucu etkisi ilk kez gösterildi. Her iki protokolde de AS-IV tedavisi uygulanan sağlıklı hayvanlarda tedavi almayanlara göre EF derecesi bakımından anlamlı fark bulunmadı. Literatürde AS-IV'ün doğrudan olmasa bile mevcut fonksiyonel iyileşmeye katkı sağlayacak olası etkilerini destekleyen çalışmalar yer almaktadır. Zhang ve arkadaşları AS-IV'ün normal ve spontan hipertansif sıçanlardan elde edilen izole aort halkalarında endotel bağımlı ve direkt vasküler düz kas üzerine etkileri ile gevşeme yanıtı oluşturduğunu göstermişlerdir (245). Benzer bir araştırmada AS-IV'ün sıçan torasik aorta dilatasyonu üzerindeki etkisi, endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktörler ve NO üretimi ile birlikte, voltaj duyarlı ve voltaja-duyarlı olmayan reseptör aracılı  $Ca^{2+}$  kanallarının blokajı ile ilişkilendirilmiştir (246). Lin ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada AS-IV'ün PI3K/Akt/eNOS sinyal yolağını aktive ederek sıçan aort halkalarının gevşemesini endotel bağımlı desteklediğini göstermişlerdir (247). Ayrıca literatürde AS-IV'ün gevşeme mekanizmalarının bozulmasında önemli rolleri olan ve çeşitli modellerle indüklenen endotelial disfonksiyon üzerindeki koruyucu etkilerinin gösterildiği birçok çalışma mevcuttur (248).

Fibrojenik bir sitokin olan TGF- $\beta$ 1 inaktif halde iken T $\beta$ R-1 ve T $\beta$ R-2 sitoplazma membranında homodimer halindedir. Proteazlarca aktive edilen TGF- $\beta$ 1'in T $\beta$ R-2'ye bağlanması ardından oluşan heterotetramerik komplekste sırasıyla T $\beta$ R-2 ve T $\beta$ R-1 fosforillenir. Kanonikal sinyalizasyonda serin/treonin rezidülerinden fosforillenerek aktive olan T $\beta$ R-1 yolağın sinyal düzenleyicileri olan sitoplazmik Smad2 ve Smad3 moleküllerini sırasıyla Ser<sup>465/467</sup> ve Ser<sup>423/425</sup> konumundan fosforiller. Ardından pSmad2/3, Smad 4 ile kompleks oluşturur. Oluşan kompleks nükleusa geçerek transkripsiyon faktörü gibi davranır. DNA'nın uygun bölgelerine bağlanan pSmad2/3-Smad4 kompleksi fibrozis ile ilişkili hedef gen ekspresyonlarını düzenler. Smad7 ise T $\beta$ R-1 veya Smad2/3'ün fosforilasyonunu engelleyerek veya T $\beta$ R-1'in yıkımını sağlayarak yolağın inhibitörü gibi davranır ve fibrotik süreçleri baskılar (21, 22). TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı farklı dokularda meydana gelen fibrotik süreçlerde etkin bir role sahip olmakla birlikte; literatürde TGF- $\beta$ 1/Smad yolağının çeşitli modellerle indüklenen ED tedavisinde önde gelen terapötik hedefler arasında olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (23). Çalışmamızda, fonksiyonel ölçümler ardından toplanan penil doku örneklerinde TGF- $\beta$ 1, Smad2/3, pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>), Smad7 ile birlikte fibronektin ekspresyon seviyeleri ve AS-IV tedavisinin bu parametreler üzerindeki etkileri Western Blot yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Western blot sonuçlarımızda; TGF- $\beta$ 1 penil doku ekspresyonları her iki protokole ait hasar gruplarında kontrol gruplarına göre anlamlı yüksek bulundu. TGF- $\beta$ 1/Smad yolağının sitoplazmik komponentleri olan Smad2 ve Smad3 seviyelerinde gruplar arasında fark gözlenmezken; yolağın aktivatörü gibi davranan pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) ekspresyonu ve pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>)/Smad2 oranında her iki protokole ait hasar gruplarında kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı artış saptandı. Mevcut artışlar hasar grupları arasında zaman bağımlı anlamlı fark göstermedi. Sinir hasarı sonrasında sıçan penis dokularında TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı aktivasyonunun 7. ve 14. günlerde artış eğiliminde olduğu şeklinde yorumlanan bulgularımız literatürdeki fibrotik moleküler değişimlerle tutarlılık göstermektedir. TGF- $\beta$ 1'in tavşanlarda kavernoza fibrozis gelişimindeki rolünün araştırıldığı in situ bir çalışmada intrakavernoza TGF- $\beta$ 1 enjeksiyonunun doz bağımlı şekilde ESM proteinlerinin üretimini artırdığı ve kavernoza düz kas yüzdesinde azalmaya yol açarak dokunun yapısal bütünlüğünde deformasyonlara yol açtığı gösterilmiştir (249). Wan ve arkadaşları 2 dk'lık sıçan BKSH modeli sonrasında 1. günde azalan erektile cevabın (t-İKB/OAB ve m-İKB/OAB) 28. güne kadar devam ettiğini; 28 gün sonunda toplanan penil doku örneklerinde ise TGF- $\beta$ 1 ekspresyonu ve pSmad2/Smad2 oranı ile birlikte artmış kolajen içeriğini (kolajen I ve IV) moleküler düzeyde göstermişlerdir (136). Benzer bir çalışmada 2 dk'lık fare BKSH modeli ardından kavernoza dokuda TGF- $\beta$ 1 ve pSmad2 upregülasyonunun 3. günden 28. güne kadar anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (13). Shi ve arkadaşları tarafından yapılan klinik bir çalışmada spinal kord yaralanması nedeniyle EF kaybı görülen erkeklerin kavernoza dokusunda artmış TGF- $\beta$ 1 ve pSmad2 ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir (160). Johanna ve arkadaşları ise KS hasarını takiben 14. ve 30. günlerde hasar gruplarının penil doku TGF- $\beta$ 1 ekspresyon seviyelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış bildirmemiştir. Bu durum fibrotik süreci tetikleyen TGF- $\beta$ 1 bağımlı olmayan yolakların aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (163). Başka bir çalışmada ise 7 günlük BKSH modeli ile indüklenen ED'de, Smad2 ve Smad3 proteinlerinin TGF- $\beta$ 1'den bağımsız olarak A-II ile aktive edilerek kavernoza fibrozise katkıda bulunabileceği raporlanmıştır (146).

Sonuçlarımıza göre; AS-IV tedavisi TGF- $\beta$ 1 ekspresyon düzeylerindeki artışı her iki protokolde de doz bağımlı şekilde önledi. BKSH+Taşıyıcı grupları ile karşılaştırıldığında AS-IV tedavisi uygulanan hasar gruplarında pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) ekspresyon düzeyleri doz bağımlı anlamlı bir azalma gösterirken, mevcut iyileşmenin sadece 14 günlük 5 mg/kg AS-IV uygulanan BKSH grubunda kontrol grubuna yakın olduğu görüldü. pSmad2/Smad2



oranları ise hem 7 hem de 14 günlük 5 mg/kg AS-IV tedavisi uygulanan BKSH grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark göstermedi. Bulgularımız AS-IV tedavisinin, penil dokuda BKSH modeli ile indüklenen TGF- $\beta$ 1/Smad sinyalizasyonunu ligand ve Smad2 protein aktivasyonu düzeyinde doz ve zaman bağımlı şekilde engelleyebileceğini göstermektedir. Wang ve arkadaşları AS-IV'ün sıçan böbrek tübüler epitelyal hücrelerin yüksek glikoz ile indüklenen epitelyal mezenkimal hücrelere dönüşümü üzerindeki etkilerini araştırdıkları in vitro bir çalışmada; AS-IV tedavisinin TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal aktivasyonunu TGF- $\beta$ 1, pSmad2 ve pSmad3 ekspresyonlarındaki artışı önleyerek inhibe ettiğini göstermişlerdir (250). Başka bir çalışmada silika ile indüklenen sıçan pulmoner fibrozis modelinde, AS-IV'ün TGF- $\beta$ 1, pSmad2 ve pSmad3 düzeyindeki artışı önlemekle birlikte azalan Smad7 ekspresyon seviyelerini artırarak antifibrotik etki gösterdiği vurgulanmıştır (28).

Çalışmamızda TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal transdüksiyonunun negatif düzenleyicisi olarak kabul edilen Smad7 protein ekspresyonları da değerlendirildi. Sinir hasarı ile indüklenen Smad7 seviyelerindeki azalma hasar grupları arasında zaman bağımlı anlamlı fark göstermedi. Çalışma kapsamında sıçanlarda BKSH ile indüklenen ED modelinde kavernoza dokudaki Smad7 protein ekspresyonları ilk defa gösterilmiş olup bu anlamda literatüre önemli bir katkı sağlanmıştır. Yapılan farklı çalışmalarda Smad7 ekspresyonunun negatif regülasyonunun UUO ve A-II hipertansiyon fare modelleriyle indüklenen renal fibrozu desteklediği gösterilmiştir (251, 252). Ayrıca renal tübüler epitel hücrelerinde Smad7'nin aşırı ekspresyonunun Smad2 aktivasyonunu engelleyerek sıçan UUO modelinde hem renal fibrozu hem de epitelyal mezenkimal dönüşümü inhibe ettiği raporlanmıştır (253, 254).

Uygulanan AS-IV tedavisi, hem 7 hem de 14 günlük hasar gruplarında sinir hasarı ile indüklenen Smad7 seviyelerindeki artışı kontrol grubuna göre doz bağımlı olarak anlamlı derecede önledi. Tedaviyle birlikte artış eğiliminde olan Smad7 seviyeleri kontrol grubuna göre daha düşüktü. Bulgularımız, AS-IV tedavisinin penil dokuda BKSH modeli sonrası artan TGF- $\beta$ 1/Smad aktivasyonunu, Smad7 downregülasyonunu engelleyerek önleyebileceğini göstermektedir. Literatürdeki birçok çalışma AS-IV'ün Smad7 ekspresyonu üzerindeki mevcut etkisini destekler niteliktedir (29, 232). Li ve arkadaşları silika ile indüklenen sıçan pulmoner fibrozis modeli sonrasında akciğer dokusunda artış gösteren TGF- $\beta$ 1, T $\beta$ R-1, T $\beta$ R-2, pSmad2, pSmad3 ve azalan Smad7 ekspresyonlarının AS-IV tedavisi ile önlenebileceğini göstermişlerdir. Mevcut tedavi Smad2 ve Smad3

seviyelerinde ise anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır (255). İn vitro ve in vivo diyabetik nefropati modelinin kullanıldığı bir çalışmada, AS-IV'ün renal dokuda aktive olan TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal transdüksiyonunu, azalan Smad7 ekspresyonunu artırarak (mRNA ve protein düzeyinde) önleyebileceği raporlanmıştır. Ayrıca  $\alpha$ -SMA ve tip-1 kolajen artışı ile karakterize fibrotik süreçlerin inhibisyonu hem moleküler hem de histolojik olarak gösterilmiştir (241).

Çalışmamızda fibrozis belirteci olarak kullanılan ve çeşitli dokularda TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal aktivasyonu sonucu ekspresyonu arttığı bilinen fibronektin seviyeleri de incelendi. Bu kapsamda hasar gruplarında kontrol gruplarına göre fibronektin ekspresyonu zaman bağımlı olmayan anlamlı artış gösterdi. Mevcut bulgularımız literatürdeki birçok çalışma ile benzerlik göstermektedir. Cangüven ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada; sıçan BKSH modelini (3 dk *crush*) takiben 7 gün sonra kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hasar grubunda azalan EF ile birlikte fibronektin ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış olduğunu göstermişlerdir (146). Lee ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada da KS hasarı ardından 14. günde sıçanlarda histopatolojik anlamda bozulan kavernoza dokü mimarisi ve azalan EF ile birlikte kavernoza dokuda TGF- $\beta$ 1 ve fibronektin ekspresyon seviyelerinde artış gösterilmiştir (256). Başka bir araştırmada hasar grubunda kontrol grubuna göre 14. günde önemli bir artış gösteren fibronektin ekspresyon seviyesinde 30. gün aynı derecede anlamlı bir artış gösterilememiştir (163). Cabrini ve arkadaşlarının yapmış olduğu klinik bir kohort araştırmasında RP ile ilişkili ED'li hastaların penil dokü örneklerinde TGF- $\beta$ 1 ve trombospondin-1 ekspresyon seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir artış göstermişken; Smad2, Smad3, pSmad2, pSmad3 ve fibronektin seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu durum fibrotik süreci tetikleyen non-kanonik TGF- $\beta$ 1 yolaklarının aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca grupların örneklem büyüklüğünün yetersizliği, ED patofizyolojilerinin farklılığı ve ED'ye sahip oldukları sürelerin belirsizliği sebebiyle fibronektin gibi proteinler bazal seviyelerine inebileceğinden sonuçların yorumlanmasında bazı kısıtlılıkların olabileceği de vurgulanmıştır (131).

AS-IV tedavisinin sıçan penis dokusunda sinir hasarı ile indüklenen fibronektin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde; hem 7 hem de 14 günlük tedavi gruplarında hasar gruplarına göre fibronektin seviyelerinde doz bağımlı bir düşüş görüldü. TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı aktivasyonu ile indüklenen fibronektin seviyelerindeki artışın

AS-IV tedaviyle engellenmesi, AS-IV'ün TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı inhibisyonunu gerçekleştirdiğini destekler niteliktedir. Sonuçlarımız, AS-IV'ün farklı dokulardaki fibrozis modellerinde artış gösteren fibronektin seviyeleri üzerindeki etkileriyle tutarlılık göstermektedir (234, 255). Che ve arkadaşları TGF- $\beta$ 1 ile indüklenen in-vitro renal interstisyel fibroziste AS-IV'ün renal fibroblastların çoğalması ve miyofibroblastlara farklılaşmasını önleyerek kolajen-1 ve fibronektin üretimini azalttığını bildirmiş; mevcut etkiden non-kanonik sinyal yolağı üzerindeki inhibe edici etkisi sorumlu tutulmuştur (226).

Parasempatik inervasyonu takiben gelişen sağlıklı ereksiyonda elastik yapıdaki korpus kavernozumlar etkin rol oynar. Penil doku kesit alanının yaklaşık yarısını oluşturan kavernoza dokudaki morfolojik ve işlevsel değişimler nöronal hasar sonrası gelişen RP ile ilişkili ED'de önemli bir patolojik süreç olduğundan, korpus kavernoza ESM birikimi ve düz kas hücre kaybının önlenmesi RP ile ilişkili ED tedavi hedeflerinde önemli bir strateji haline gelmiştir (23, 36, 56, 108). Bu amaçla fonksiyonel ölçümler ardından uygun şekilde toplanan penil doku kesitlerindeki (enine) histopatolojik değişikliklerin zamana bağlı olarak incelenmesi ve AS-IV tedavisinin sürece olan etkisinin değerlendirilmesi amacıyla MTB testi kullanıldı. Sonuçlarımıza göre, 7 ve 14 günlük hasar gruplarında kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında 14 günlük protokolde daha anlamlı olmak üzere hem kavernoza düz kas miktarının azaldığı hem de bağ doku ve kolajen lif miktarının artışı sonucu fibrozis geliştiği gözlemlendi. Bulgularımız, önceki çalışmalarla histopatolojik anlamda tutarlılık göstermektedir. Literatürdeki birçok araştırmada sıçan BKSH modelleri ardından korpus kavernoza dokudaki fibrotik yanıtın (artan kolajen birikimi ve/veya daha düşük düz kas/kolajen oranı) KS hasarından yaklaşık 7 gün sonra artarak devam ettiği, gelişen kavernoza fibrozis derecesi ile hasar ardından geçen süre arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirtilmiştir (79, 257, 258). Sıçan BKSH modelinin kullanıldığı bir çalışmada 1, 2, 3 ve 4 haftalık BKSH model gruplarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede kavernoza fibrozis (azalan düz kas/kolajen oranı) geliştiği raporlanmıştır. Gelişen fibrozis şiddetinde gruplar arasında anlamlı bir fark gösterilemese de 2 haftalık grupta kısmen daha şiddetli olduğu belirtilmiştir (193). Buna karşılık düz kas/kolajen oranı ile KS hasarının şiddet ve süresi arasında anlamlı bir ilişki olduğunun raporlandığı çalışmalar da mevcuttur (142, 259) Song ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 30 sn x 2 tekrarlı 1 ve 4 haftalık sıçan BKSH model gruplarında düz kas/kolajen oranının kontrol grubuna göre zaman bağımlı şekilde anlamlı azaldığı gösterilmiştir (142). Kim ve arkadaşları ise 1, 4 ve 12 haftalık bilateral KS

rezeksiyon ve hasar gruplarında kavernoza dokuda meydana gelen fibrozisin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığını; rezeksiyon grubundaki fibrozisin ise zaman bağımlı şekilde hasar grubuna göre daha şiddetli olduğunu bildirmişlerdir (259).

Çalışmamız, 7 günlük protokol kapsamında uygulanan 1 mg/kg ve 5 mg/kg AS-IV tedavisinin sinir hasarı ile indüklenen kavernoza fibrozis üzerine histopatolojik anlamda herhangi bir etkinliğinin olmadığını; yalnızca 14 günlük 5 mg/kg AS-IV tedavisinin fibrozis gelişimini önleyebileceğini gösterdi. AS-IV'ün korporal doku yapısal bütünlüğü üzerindeki koruyucu etkisi histopatolojik anlamda ilk kez bu çalışmada raporlandı. Çalışmamıza ait histopatolojik verilerin moleküler analiz sonuçları ile kısmen uyumluluk gösterdiği görülmektedir. Moleküler bulguların histopatolojik bulgularla kısmi benzerliği, moleküler değişikliklerin histopatolojiye daha geç yansımaya bağlanmıştır. Mevcut bulgularımız, AS-IV'ün farklı dokularda çeşitli modellerle indüklenen fibrozis üzerindeki etkileri ile benzerlik göstermektedir (28, 30, 226). Li ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 14 ve 28 günlük protokoller kapsamında bleomisin ile indüklenen sıçan pulmoner fibrozis model gruplarında 10 mg/kg/gün i.p. AS-IV tedavisinin pulmoner dokuda artış gösteren miyofibroblast aktivasyonu ve tip-III kolajen ekspresyonunu azaltmakla birlikte gelişen histopatolojik bozuklukları ve fibrozis skorundaki artışı önleyebileceğini bildirmişlerdir (260). Sıçan silikozis modelinin kullanıldığı benzer bir çalışmada ise AS-IV'ün  $\alpha$ -SMA, tip-I kolajen ve fibronektin ekspresyonlarındaki artışı model grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azaltarak akciğer dokusunda meydana gelen fibromuskular bozuklukları önlediği gösterilmiştir. AS-IV'ün bu etkisinden TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı inaktivasyonu aracılı antifibrotik, antiinflamatuvar ve antioksidan etkilerinin sorumlu olabileceği bildirilmiştir (255). Literatürde AS-IV'ün ESM degradasyonu ve sentezinin düzenlenmesi ile ilgili olarak farklı etkilerinin gösterildiği çalışmalar da raporlanmıştır (25, 261). Liu ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, AS-IV'ün insan deri fibroblastlarında ultraviyole A'nın neden olduğu fotoyaşlanma üzerindeki koruyucu etkisi, fibroblast proliferasyonunu indüklemesine ve MMP-1/TIMP-1 oranını azaltması suretiyle kolajen yıkımını önleyici etkilerine bağlanmıştır (262). Benzer bir çalışmada AS-IV'ün UV ışımının neden olduğu fotoyaşlanma üzerindeki koruyucu etkisi TGF- $\beta$ /Smad sinyal aktivasyonu (T $\beta$ R-II ekspresyonunu artırarak ve Smad7 ekspresyonunu azaltarak) ve MMP-1 ekspresyonunun down regülasyonu sonucu azalan tip-1 kolajen yıkımıyla ilişkilendirilmiştir (263). Güncel literatür ve bulgularımız 5 mg/kg AS-IV tedavisinin RP sırasında istenmeyen KS hasarına

bağlı gelişen korporal dokulardaki irreversible yapısal değişiklikleri doz ve zaman bağımlı şekilde önleyebileceğini destekler niteliktedir.

Kronik hipoksik koşullarda apoptotik süreçleri indükleyen ve nörodejeneratif bozukluklarda rolü olan  $Ca^{+2}$  bağımlı bir proteaz olan kalpain-1'in, henüz tam olarak bilinmeyen bir mekanizma ile kanonikal ve non-kanonikal yolları aktive ederek fibrotik süreçleri indüklediği bilinmektedir (136, 264, 265). Yapılan bir araştırmada BKSH modeli sonrasında MPG ve korporal düz kas hücrelerinde kalpain-1 upregülasyonunu gösterilmiştir. Spesifik bir kalpain-1 inhibitörü olan MDL-28170 tedavisinin ise BKSH ile indüklenen EF ve nNOS sinir lifi miktarındaki azalma ile birlikte korpus kavernozumlardaki TGF- $\beta$ 1/Smad2 ve kolajen ekspresyonundaki artışı önleyebileceği bildirilmiştir (136). Mei ve arkadaşları AS-IV'ün oksidatif stres ve kalpain-1 aktivasyonunu azaltarak izoproterenol ile indüklenen hipertrofik kardiyomiyositler üzerindeki antiapoptotik etkilerini *in vivo* ve *in vitro* olarak göstermişlerdir (266). Sun ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, AS-IV'ün monokrotalin ile indüklenen pulmoner hipertansiyon gelişiminde rol oynayan NLRP-3/kalpain-1 aracılı inflamatuvar yanıtı engelleyebileceğini bildirmişlerdir (267). Kalpain-1 inhibisyonunun diyabetik ve KS yaralanması ardından gelişen ED tedavisinde yeni bir yaklaşım olabileceğini düşündüren çalışmalar ışığında, AS-IV'ün göstermiş olduğu terapötik etkiden kalpain-1 inhibisyonu aracılı TGF- $\beta$ 1/Smad yolağı inaktivasyonunun sorumlu olabileceği düşünülmektedir (136, 264, 268).

Oksidatif stres, nöroinflamasyon, proteazomal ve mitokondriyal disfonksiyon kaynaklı nörodejeneratif bozukluklarda PPAR $\gamma$  agonistlerinin nöroprotektif etkileri bilinmektedir (212, 269). PPAR $\gamma$  agonistlerinin antifibrotik etkilerinin gösterildiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar bulunmaktadır. Bu etkiden esas olarak TGF- $\beta$ 1/Smad, TGF- $\beta$ 1/non-Smad ve kanonikal WNT/ $\beta$ -katenin sinyal transdüksiyonunun inhibisyonu sorumlu tutulmaktadır (143, 150, 224). Literatürde KS hasarı ardından gelişen ED tedavisinde PPAR $\gamma$  agonistlerinin terapötik değerinin gösterildiği deneysel çalışmalar bulunmaktadır (223, 270, 271). Bu kapsamda doğal bir PPAR $\gamma$  agonisti olarak tanımlanan AS-IV'ün mevcut etkisini, PPAR $\gamma$ /TGF- $\beta$ 1/Smad sinyalizasyonu regüle ederek gösterebileceği düşünülmektedir.

KS hasarı sonrasında kavernoza dokularda ve MPG'de RhoA/ROCK sinyal yolağının aktivasyonu prelinik anlamda tanımlanmış bir süreçtir (107, 129, 134). Yolağın kavernoza atrofi ve fibrozisin gelişimindeki rolünde TGF- $\beta$ 1 aracılı etkilerinin olduğunu

bildiren çalışmalar bulunmaktadır (141, 142). Bu kapsamda AS-IV'ün mevcut terapötik etkisinde kavernoza dokusu veya MPG'deki artan RhoA/ROCK sinyal transduksiyonu üzerindeki inhibe edici etkisinin de rolü olabileceği düşünülmektedir (272).

Çalışmamız bazı kısıtlılıklar da içermektedir. AS-IV'ün düşük, orta ve yüksek tedavi dozları olmak üzere üç farklı doz şeklinde değil de sadece iki doz olarak uygulanabilmesi, çalışmamızın gözlenen en önemli eksiklerinden biridir. Daha yüksek doz AS-IV ile tedavi, erektil dokusu üzerinde antifibrotik ve işlevsel etkinliği arttırabilir. Mevcut bulgularımız da üçüncü bir yüksek dozun gerekliliğini işaret etmektedir. AS-IV tedavisinin BKSH ile indüklenen ED'de sinir hasarına bağlı gelişen nöropati sonrasında gelişebilecek olan lokal endotel disfonksiyon, nöronal rejenerasyon, inflamatuvar, oksidatif ve apoptotik süreçler üzerinde olumlu bir rol oynayıp oynamadığını belirlemek için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu kapsamda AS-IV'ün nöronal rejenerasyon üzerindeki etkinliklerinin araştırılması amacıyla deneklerin MPG'leri moleküler çalışmalar yapılması amacıyla alınmıştır. Ayrıca farklı ED modelleri kullanarak erektil dokuda meydana gelen yapısal ve işlevsel değişikliklerin incelenmesi ardından, AS-IV uygulamasının bu değişiklikler üzerindeki etkisinin araştırılması ileriye dönük planlanan çalışmalarımız arasındadır.

İlaç endüstrisinin oral biyoyararlanımı %30'un altında olan ve sistemik etki hedeflenen ilaç adaylarına olan ilgisizliği göz önünde bulundurulduğunda; RP ile ilişkili ED tedavisinde potansiyel bir hedef olan AS-IV'ün oral formlarının klinik kullanım amacıyla geliştirilmesinin önündeki en büyük engelin düşük biyoyararlanımı olduğu görülmektedir (198, 199, 208). Literatürde AS-IV'ün biyoyararlanımının yaklaşık 3.5 kat,  $t_{1/2}$  değerinin ise yaklaşık 3 kat artırılabilirliğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (203). Yapılan son çalışmalarda AS-IV'ün hidrofilik bir türevi olan LS-102'nin AS-IV'e göre daha yüksek biyoyararlanıma sahip ve farelerde 5000 mg/kg gibi yüksek dozda bile akut toksik etkileri olmayan bir bileşik olduğu raporlanmıştır. Bu sebeple LS-102 gibi ajanların klinik anlamda yeni ilaç araştırmaları için potansiyel hedefler olabileceği vurgulanmaktadır (273, 274).

Literatürde, erken dönem başlanan antiapoptotik ve antifibrotik tedavilerin RP ile ilişkili ED gelişimine neden olan kavernoza fibrozisi azaltılabileceğini gösteren veriler mevcutken; kavernoza dokusu mimarisindeki yapısal bozuklukların gelişiminden sonra başlanan tedavilerin istenen etkinlikte olmadığı raporlanmıştır. Bu sebeple kavernoza dokuda gelişebilecek olan morfolojik değişikliklerinin minimum seviyede tutulması amacıyla RP'den sonraki en erken dönemde antifibrotik tedavilerin gerekliliği

vurgulanmaktadır (18). Tez çalışmamızda, BKSH modeli ile indüklenen ED üzerine AS-IV'ün zaman ve doz bağımlı etkisi fonksiyonel, histopatolojik ve moleküler düzeyde incelenmiştir. Sonuç olarak; AS-IV uygulamasının BKSH ile indüklenen erektil fonksiyon kaybı ve kavernoza fibrozis gelişimi üzerindeki koruyucu etkisi ilk defa raporlanmıştır. AS-IV'ün bozulan EF ve kavernoza doku morfolojisi üzerindeki olumlu etkisi; TGF- $\beta$ 1/Smad yolağı elamanlarından olan TGF- $\beta$ 1, pSmad2(Ser<sup>465/467</sup>) ve Smad7 protein ekspresyon seviyelerinde meydana getirdiği değişiklikler sonucu gösterdiği sinyal inhibisyonu aracılı antifibrotik etkisine bağlanmıştır. AS-IV'ün BKSH modeli ile indüklenen ED yönetiminde, EF ve kavernoza doku üzerindeki koruyucu etkinliğinin gösterilmesi çalışmamızın bilim dünyasına sunduğu önemli bir katkıdır. Literatür ve elde edilen bulgular, TGF- $\beta$ 1/Smad sinyal yolağı inhibisyonunun RP ile ilişkili ED'deki fibrotik süreçlerin baskılanmasında önemli bir hedef olmakla birlikte, AS-IV'ün konu ile ilgili yeni ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir potansiyel ajan olabileceğini düşündürmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Culp MB, Soerjomataram I, Efstathiou JA, Bray F (2020). Recent global patterns in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol* 77(1): 38-52.
2. Mottet N, Van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, Fanti S, Fossati N, Gandaglia G, Gillessen S, Grivas N, Grummet J, Henry AM, Van der Kwast TH, Lam TB, Lardas M, Liew M, Mason MD, Moris L, Oprea-Lager DE, van der Poel HG, Rouvière O, Schoots IG, Tilki D, Wiegel T, Willemse PM, Cornford P (2020). EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG guidelines on prostate cancer 2020 update: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. *Eur Urol* 79(2): 243-262.
3. Burnett AL, Aus G, Canby-Hagino ED, Cookson MS, D'Amico AV, Dmochowski RR, Eton DT, Forman JD, Goldenberg SL, Hernandez J, Higano CS, Kraus S, Liebert M, Moul JW, Tangen C, Thrasher JB, Thompson I (2007). Erectile function outcome reporting after clinically localized prostate cancer treatment. *J Urol* 178: 597-601.
4. Ferruh Z, Rauf TD, Sultan E, Kutsal Y (2014). Prostate cancer incidence in Turkey: An epidemiological study. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(21): 9125-30.
5. Tal R, Alphas HH, Krebs P, Nelson CJ, Mulhall JP (2009). Erectile function recovery rate after radical prostatectomy: A meta-analysis. *J Sex Med* 6(9): 2538-46.
6. Salonia A, Bettocchi C, Boeri L, Capogrosso P, Carvalho J, Cilesiz NC, Cocci A, Corona G, Dimitropoulos K, Gül M, Hatzichristodoulou G, Jones TH, Kadioglu A, Martínez Salamanca JI, Milenkovic U, Modgil V, Russo GI, Serefoglu EC, Tharakan T, Verze P, Minhas S (2021). EAU working group on male sexual and reproductive health. European Association of Urology Guidelines on sexual and reproductive health 2021 update: Male sexual dysfunction. *Eur Urol* 80(3): 333-357.
7. Lima TFN, Bitran J, Frech FS, Ramasamy R (2021). Prevalence of post-prostatectomy erectile dysfunction and a review of the recommended therapeutic modalities. *J Sex Med* 33(4): 401-409.
8. Verrecchia F, Mauviel A (2007). Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* 13(22): 3056-62.
9. Dean RC, Lue TF (2005). Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* 32(4): 379-95.



10. Burnett AL, Sezen SF, Hoke A, Caggiano AO, Iaci J, Lagoda G, Musicki B, Bella AJ (2015). GGF2 is neuroprotective in a rat model of cavernous nerve injury induced erectile dysfunction. *J Sex Med* 12(4): 897-905.
11. Burnett AL (2005). Erectile dysfunction following radical prostatectomy. *JAMA* 293(21): 2648-53.
12. Cooper RB Serefoglu EC, Hellstrom WJ (2012). Sexual dysfunction following radical prostatectomy. *J Androl* 33(6): 1143-54.
13. Jin HR, Chung YG, Kim WJ, Zhang LW, Piao S, Tuvshintur B, Yin GN, Shin SH, Tumurbaatar M, Han JY, Ryu JK, Suh JK (2010). A mouse model of cavernous nerve injury-induced erectile dysfunction: functional and morphological characterization of the corpus cavernosum. *J Sex Med* 7(10): 3351-64.
14. Whalen M (2018). Preventing erectile dysfunction after radical prostatectomy: Nerve-sparing techniques, penile rehabilitation and novel regenerative therapies. Tsvetin Genadiev (Ed.), *Prostatectomy*, 129-174. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79398>.
15. Canguven O, Burnett A (2008). Cavernous nerve injury using rodent animal models. *J Sex Med* 5(8): 1776-85.
16. Tal R, Teloken P, Mulhall JP (2011). Erectile function rehabilitation after radical prostatectomy: Practice patterns among AUA members. *J Sex Med* 8(8): 2370-76.
17. Angeloni N, Bond CW, Harrington D, Stupp S, Podlasek CA (2013). Sonic hedgehog is neuroprotective in the cavernous nerve with crush injury. *J Sex Med* 10(5): 1240-50.
18. Emanu JC, Avildsen IK, Nelson CJ (2016). Erectile dysfunction after radical prostatectomy: Prevalence, medical treatments and psychosocial interventions. *Curr Opin Support Palliat Care* 10(1): 102-107.
19. Xu W, Shao X, Tian L, Gu L, Zhang M, Wang Q, Wu B, Wang L, Yao J, Xu X, Mou S, Ni Z (2014). Astragaloside IV ameliorates renal fibrosis via the inhibition of mitogen-activated protein kinases and antiapoptosis in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 350(3): 552-62.
20. Tang PMK, Zhang YY, Mak TS, Tang PC, Huang XR, Lan HY (2018). Transforming growth factor- $\beta$  signalling in renal fibrosis: from Smads to non-coding RNAs. *J Physiol* 596(16): 3493-3503.
21. Finnson KW, Almadani Y, Philip A (2019). Non-canonical (non-Smad2/3) TGF- $\beta$  signaling in fibrosis: Mechanisms and targets. *Semin Cell Dev Biol* 101: 115-22.

22. Shi X, Young CD, Zhou H, Wang X (2020). Transforming growth factor- $\beta$  signaling in fibrotic diseases and cancer-associated fibroblasts. *Biomol* 10(12): 1666. doi: 10.3390/biom10121666.
23. Decaluwé K, Pauwels B, Boydens C, Van de Voorde J (2014). Treatment of erectile dysfunction: New targets and strategies from recent research. *Pharmacol Biochem Behav* 121: 146-57.
24. Li L, Hou X, Xu R, Liu C, Tu M (2016). Research review on the pharmacological effects of astragaloside IV. *Fundam Clin Pharmacol* 31(1): 17-36.
25. Ren S, Zhang H, Mu Y, Sun M, Liu P (2013). Pharmacological effects of astragaloside IV: A literature review. *J Tradit Chin Med* 33(3): 413-416.
26. Zhang J, Wu C, Gao L, Du G, Qin X (2020). Astragaloside IV derived from *Astragalus membranaceus*: A research review on the pharmacological effects. *Adv Pharmacol* 87: 89-112.
27. Yanchun W, Wu Y, Feng K, Zhao Y, Tao R, Xu H, Tang Y (2019). Astragaloside IV inhibits cardiac fibrosis via miR-135a-TRPM7-TGF- $\beta$ /Smads pathway. *J Ethnopharmacol* 249: 112404. doi.org/ 10.1016 / j.jep. 2019. 112404.
28. Li N, Feng F, Wu K, Zhang H, Zhang W, Wang W (2019). Inhibitory effects of astragaloside IV on silica-induced pulmonary fibrosis via inactivating TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling. *Biomed Pharmacother* 119: 109387. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109387.
29. Li W, Yang FC, Yuan ZT, Zhou WC, Yin PH, Zhang XM, Peng W, Cai H (2014). Astragaloside IV inhibits renal tubulointerstitial fibrosis by blocking TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway in vivo and in vitro. *Exp Biol Med* 239(10): 1310-1324.
30. Yuan X, Gong Z, Wang B, Guo X, Yang L, Li D, Zhang Y (2018). Astragaloside inhibits hepatic fibrosis by modulation of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018: 3231647. doi: 10.1155/2018/3231647.
31. Wu YN, Chen KC, Liao CH, Chiang HS (2018). Spontaneous regeneration of nerve fiber and irreversibility of corporal smooth muscle fibrosis after cavernous nerve crush injury: Evidence from serial transmission electron microscopy and intracavernous pressure. *Urology* 118: 98-106.
32. Rehfeld A, Nylander M, Karnov K (2017). The male reproductive system. Springer (Ed.), *Compendium of histology: A theoretical and practical guide*, 569-592. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41873-5\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41873-5_26).

33. Hawksworth DJ, Burnett AL (2015). Pharmacotherapeutic management of erectile dysfunction. *Clin Pharmacol Ther* 98(6): 602-10.
34. Khimmaktong W, Komolkriengkrai M, Boonyoung P, Anupunpisit V (2019). Ameliorative effects of curcumin on microvascular complication in streptozotocin induced diabetic rat penis. *FFHD* 9(2): 92-107.
35. Corrêa LBNS, Contreiras EC, Daleprane JB, Boaventura GT, Figueiredo MA, Chagas MA (2017). Effects of transgenic soybean and organic soybean on rat penis morphology during the aging process. *Int J Morphol* 35(3): 1043-49.
36. Nunes KP, Webb RC (2012). Mechanisms in erectile function and dysfunction: An overview. Kenia Nunes (Ed.), *Erectile dysfunction: Disease associated mechanisms and novel insights into therapy*, 3-22. <https://www.intechopen.com/books/686> doi: 10.5772/1195.
37. Wei AY, He SH, Zhao JF, Liu Y, Liu Y, Hu YW, Zhang T, Wu ZY (2012). Characterization of corpus cavernosum smooth muscle cell phenotype in diabetic rats with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 24(5): 196-201.
38. Zhao J, Zhao F, Ye M, Ma K, Huang W, Qian L, Huang X, Fu H, Lv B (2020). Salidroside attenuates hypoxia induced expression of connexin 43 in corpus cavernosum smooth muscle cells. *Urol Int* 104(7-8): 594-603.
39. Celik S, Kılıc KD, Yıgıttürk K, Cavusoglu T, Erbas O et al (2017). The current situation in penile transplantation: A morphological evaluation. *FNG transplantasyon* 2(1): 34-44.
40. Hsu GL, Hsieh CH, Wen HS, Hsu WL, Wu CH, Fong TH, Chen SC, Tseng GF (2004). Anatomy of the human penis the relationship of the architecture between skeletal and smooth muscles. *J Androl* 25(3): 426-31.
41. Hafez ESE, Hafez SD (2005). Erectile dysfunction: Anatomical parameters, etiology, diagnosis and therapy. *Arch Androl* 51(1): 15-31.
42. Tuffaha SH, Sacks JM, Shores JT, Brandacher G, Lee WPA, Cooney DS, Redett RJ (2014). Using the dorsal, cavernosal, and external pudendal arteries for penile transplantation: Technical considerations and perfusion territories. *Plast Reconstr Surg* 134(1): 111-119.
43. Molodysky E, Liu SP, Huang SJ, Hsu GL (2013). Penile vascular surgery for treating erectile dysfunction: Current role and future direction. *Arab J Uro* 11(3): 254-66.

44. Hsu GL, Hsieh CH, Wen HS, Chen YC, Chen SC, Mok MS (2003). Penile venous anatomy: An additional description and its clinical implication. *J Androl* 24(6): 921-27.
45. McMahon CG (2014). Erectile dysfunction. *Int Med J* 44: 18-26.
46. Sattar AA, Salpigides G, Vanderhaeghen JJ, Schulman CC, Wespes E (1995). Cavernous oxygen tension and smooth muscle fibers: Relation and function. *J Urol* 154(5): 1736-39.
47. Prieto D (2008). Physiological regulation of penile arteries and veins. *Int J Impot Res* 20(1): 17-29.
48. Morelli A, Filippi S, Vignozzi L, Mancina R, Maggi M (2006). Physiology of erectile function: an update on intracellular molecular processes. *Eur Urol* 4: 96-108.
49. Williams S, Melman A (2012). Novel therapeutic targets for erectile dysfunction. *Maturitas* 71(1): 20-27.
50. Brackett NL, Lynne CM, Ibrahim E, Ohl DA, Sønksen J (2010). Treatment of infertility in men with spinal cord injury. *Nat Rev Urol* 7(3): 162-72.
51. Heaton JPW (2000). Central neuropharmacological agents and mechanisms in erectile dysfunction: the role of dopamine. *Neurosci Biobehav Rev* 24(5): 561-69.
52. Argiolas A, Melis RM (2005). Central control of penile erection: Role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Prog Neurobiol* 76(1): 1-21.
53. Melis RM (2011). Central control of penile erection: A revisitation of the role of oxytocin and its interaction with dopamine and glutamic acid in male rats. *Neurosci Biobehav Rev* 35(3): 939-55.
54. Myers RP (2011). Whither go pro-erectile nerves of the neurovascular bundles? *Eur Urol* 59(6): 910-11.
55. Steers WD (2000). Neural pathways and central sites involved in penile erection: Neuroanatomy and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 24(5): 507-16.
56. Lue TF (2000). Erectile Dysfunction. *NEJM* 342(24): 1802-13.
57. Traish A, Kim NN, Moreland RB, Goldstein I (2000). Role of alpha adrenergic receptors in erectile function. *Int J Impot Res* 12(1): 48-63.
58. Mas M (2010). Molecular mechanisms of penile erection. *Arch Esp Urol* 63(8): 589-98.
59. Clement P, Giuliano F (2015). Anatomy and physiology of genital organs-men. *Handb Clin Neurol* 130(3): 19-37.

60. Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, Crone JK, Becker RE, Moriarity JL, Snyder SH, Burnett AL (2002). Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *PNAS* 99(6): 4061-66.
61. Tejada IS, Angulo J, Celtek S, González-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, Simonsen U (2004). Physiology of erectile function. *J Sex Med* 1(3): 254-65.
62. Hurt KJ, Sezen SF, Lagoda GF, Musicki B, Ramea, GA, Snyder SH (2012). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. *PNAS* 109(41): 16627-29.
63. Meng J, Ganesan Adaikan P, Srilatha B (2012). Hydrogen sulfide promotes nitric oxide production in corpus cavernosum by enhancing expression of endothelial nitric oxide synthase. *Int J Impot Res* 25(3): 86-90.
64. Alexandre B, Lemaire A, Desvaux P, Amar E (2007). Intracavernous injections of prostaglandin E1 for erectile dysfunction: patient satisfaction and quality of sex life on long-term treatment. *J Sex Med* 4(2): 426-31.
65. Kutlu O, Karaguzel E, Okatan AE, Mentese A, Yulug E, Kazaz IO, Kutlu S, Dil E, Eren H, Alver A (2017). Dipyrindamole reduces penile apoptosis in a rat model of post-prostatectomy erectile dysfunction. *Int Braz J Urol* 43(5): 966-973.
66. Albersen M, Mwamukonda KB, Shindel AW, Lue TF (2011). Evaluation and treatment of erectile dysfunction. *Med Clin North Am* 95(1): 201-112.
67. Albersen M, Fandel TM, Zhang H, Banie L, Lin G, De Ridder D, Lin CS, Lue TF (2011). Pentoxifylline promotes recovery of erectile function in a rat model of postprostatectomy erectile dysfunction. *Eur Urol* 59(2): 286-96.
68. Kessler A, Sollie S, Challacombe B, Briggs K, Van Hemelrijck M (2019). The global prevalence of Erectile Dysfunction: A review. *BJU International* 124(4): 587-99.
69. Panken EJ, Fantus RJ, Chang C, Kashanian JA, Helfand BT, Brannigan RE, Bennett NE, Halpern JA (2021). Epidemiology and diagnosis of erectile dysfunction by urologists versus non-urologists in the united states: An analysis of the national ambulatory medical care survey. *Male Sexual Dysfunction. J Urol* 147: 167-71.
70. Akkus E, Kadioglu A, Esen A, Doran S, Ergen A, Anafarta K, Hattat H (2002). Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Turkey: A population-based study. *Eur Urol* 41(3): 298-304.

71. Cayan S, Kendirci M, Yaman O, Asci R, Orhan I, Usta MF, Ekmekcioglu O, Kadioglu A (2017). Prevalence of erectile dysfunction in men over 40 years of age in Turkey: Results from the Turkish society of andrology male sexual health study group. *Turk J Urol* 43(2): 122-29.
72. Gacci M, Eardley I, Giuliano F, Hatzichristou D, Kaplan SA, Maggi M, McVary KT, Mirone V, Porst H, Roehrborn CG (2011). Critical analysis of the relationship between sexual dysfunctions and lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 60(4): 809-25.
73. Alwaal A, Zaid UB, Lin CS, Lue TF (2015). Stem cell treatment of erectile dysfunction. *Adv Dru Deliv Rev* 82(83): 137-44.
74. Gökce MI, Yaman Ö (2017). Erectile dysfunction in the elderly male. *Turk J Urol* 43(3): 247-51.
75. Shamloul R, Ghanem H (2013). Erectile dysfunction. *Lancet* 381(9861): 153-65.
76. Kloner R (2007). Erectile dysfunction and hypertension. *Int J Impot Res* 19: 296-302.
77. Jin LM (2009). Angiotensin II signaling and its implication in erectile dysfunction. *J Sex Med* 6(3): 302-310.
78. Labazi H, Wynne BM, Tostes R, Webb RC (2013). Metformin treatment improves erectile function in an angiotensin II model of erectile dysfunction. *J Sex Med* 10(9): 2154-64.
79. Cho MC, Song WH, Paick JS (2018). Suppression of cavernosal fibrosis in a rat model. *Sex Med Rev* 6(4): 572-582.
80. Ponholzer A, Temml C, Mock K, Marszalek M, Obermayr R, Madersbacher S (2005). Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in 2869 men using a validated questionnaire. *Eur Urol* 47(1): 80-86.
81. Hatzimouratidis K, Hatzichristou D (2014). How to treat erectile dysfunction in men with diabetes: From pathophysiology to treatment. *Curr Diab Rep* 14(11): 545-54.
82. Kouidrat Y, Pizzol D, Cosco T, Thompson T, Carnaghi M, Bertoldo A, Solmi M, Stubbs B, Veronese N (2017). High prevalence of erectile dysfunction in diabetes: A systematic review and meta-analysis of 145 studies. *Diabet Med* 34(9): 1185-92.
83. Angulo J, Cuevas P, Gabancho S, Gonzalez CR, Videla S, Saenz de TI (2005). Enhancement of both EDHF and NO/cGMP pathways is necessary to reverse erectile dysfunction in diabetic rats. *J Sex Med* 2(3): 341-46.

84. Wu Z, Wang H, Ni F, Jiang X, Xu Z, Liu C, Cai Y, Fu H, Luo J, Chen W, Chen B, Yu Z (2018). Islet transplantation improved penile tissue fibrosis in a rat model of type 1 diabetes. *BMC Endocr Disord* 18(1): 49. doi: 10.1186/s12902-018-0276-9.
85. Shiri R, Koskimäki J, Tammela TL, Häkkinen J, Auvinen A, Hakama M (2007). Bidirectional relationship between depression and erectile dysfunction. *J Urol* 177(2): 669-73.
86. Pourmand G, Alidaee MR, Rasuli S, Maleki A, Mehrsai A (2004). Do cigarette smokers with erectile dysfunction benefit from stopping? A prospective study. *BJU Int* 94(9): 1310-1313.
87. Cao S, Yin X, Wang Y, Zhou H, Song F, Lu Z (2013). Smoking and risk of erectile dysfunction: Systematic review of observational studies with meta analysis. *PLoS One* 8(4): e60443. doi: 10.1371/journal.pone.0060443.
88. Bortolotti A, Fedele D, Chatenoud L, Colli E, Coscelli C, Landoni M, Lavezzari M, Santeusano F, Parazzini F (2001). Cigarette smoking: A risk factor for erectile dysfunction in diabetics. *Eur Urol* 40(4): 392-97.
89. Dorey G (2001). Is smoking a cause of erectile dysfunction? A literature review. *Br J Nurs* 10(7): 455-65.
90. Gholami SS, Ganzales-Cadavid, Lin CS, Rajfer J, Lue TF (2003). Peyronie's disease: A review. *J Urol* 169(4): 1234-41.
91. Pryor J, Akkus E, Alter G, Jordan G, Lebre T, Levine L, Mulhall J, Perovic S, Ralph D, Stackl W (2004). Peyronie's disease. *J Sex Med* 1(1): 110-15.
92. El-Sakka AI (2006). Prevalence of peyronie's disease among patients with erectile dysfunction. *Eur Urol* 49(3): 564-69.
93. Chitaley K, Kupelian V, Subak L, Wessells H (2009). Diabetes, obesity and erectile dysfunction: Field overview and research priorities. *J Urol* 182(6): 45-50.
94. Wei M, Macera CA, Davis DR, Hornung CA, Nankin HR, Blair SN (1994). Total cholesterol and high density lipoprotein cholesterol as important predictors of erectile dysfunction. *Am J Epidemiol* 140(10): 930-37.
95. Esposito K, Giugliano F, Di Palo C, Giugliano G, Marfella R, D'Andrea F, D'Armiento M, Giugliano D (2004). Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: A randomized controlled trial. *JAMA* 291(24): 2978-84.
96. Cheng JY, Ng EM, Ko JS, Chen RY (2007). Physical activity and erectile dysfunction: Meta-analysis of population-based studies. *Int J Impot Res* 19(3): 245-52.

97. Peter P, Jolapurn HR, Reddy VLV (2019). Hypertension can increase risk of erectile dysfunction (ED) however; antihypertensive drugs also can contribute to the problem. IJMRPS 6: 11. doi: 10.5281/zenodo.3543801.
98. Higgins A, Nash M, Lynch AM (2010). Antidepressant associated sexual dysfunction: Impact, effects and treatment. Drug Healthc Patient Saf 2: 141-150.
99. Bayraktar Z (2017). Uluslararası erektil fonksiyon indeksi (IIEF) Türkçe versiyonunun güvenilirliği: Literatür incelemesi. New J Urol 12(1): 63-70.
100. Burnett AL, Nehra A, Breaux RH, Culkin DJ, Faraday MM, Hakim LS et al (2018). Erectile dysfunction: AUA guideline. J Urol 200: 633-41.
101. Alwaal A, Al-Mannie R, Carrier S (2011). Future prospects in the treatment of erectile dysfunction: Focus on avanafil. Drug Des Devel Ther 5: 435-43.
102. Beckman TJ, Abu-Lebdeh HS, Mynderse LA (2006). Evaluation and medical management of erectile dysfunction. Mayo Clin Proc 81(3): 385-90.
103. Ozbey I (2010). The role of androgen replacement therapy in erectile dysfunction. Turk Urol Sem 1: 112-18.
104. Sharaby JS, Benet AE, Melman A (1995). Penile revascularization. The Urol Clin North Am 22(4): 821-32.
105. Luthra A, Misra A (2008). Erectile dysfunction in diabetic males: Plausible mechanisms and management strategies. Diabetes Metab Syndr Clin Res and Rev 2(1): 81-86.
106. Segal RL, Bivalacqua TJ, Burnett AL (2012). Irbesartan promotes erection recovery after nerve-sparing radical retropubic prostatectomy: A retrospective long-term analysis. BJU Int 110(11): 1782-86.
107. Hannan JL, Albersen M, Kutlu O, Gratzke C, Stief CG, Burnett AL, Lysiak JJ, Hedlund P, Bivalacqua TJ (2013). Inhibition of Rho-kinase improves erectile function, increases nitric oxide signaling and decreases penile apoptosis in a rat model of cavernous nerve injury. J Urol 189(3): 1155-61.
108. Ryu JK, Suh JK, Burnett AL (2017). Research in pharmacotherapy for erectile dysfunction. Transl Androl Urol 6(2): 207-15.
109. Bhavsar A, Verma S (2014). Anatomic Imaging of the Prostate. Biomed Res 2014: 728539. doi: 10.1155/2014/728539.
110. Aoran L, Franco O, Hayward SW (2016). Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of BPH. Urol Clin North Am 43(3): 279-88.



111. Knoblauth SE, True L, Tretiakova M, Hukkanen RR (2018). Male reproductive system. Piper MT, Suzanne MD, Kathleen SM (Ed.), Comparative anatomy and histology, 335-363. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00018-X>.
112. Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A (2011). Overview of prostate anatomy, histology and pathology. *Endocrinol Metab Clin N Am* 40(3): 565-75.
113. Fried NM, Burnett AL (2015). Novel methods for mapping the cavernous nerves during radical prostatectomy. *Nat Rev Urol* 12(8): 451-60.
114. Freddie B, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6): 394-424.
115. World Health Organization (2020). International Agency for Research on Cancer. Global Health Observatory. Lyon: World Health Organization. <https://gco.iarc.fr>. [Accessed 11 January 2021].
116. Sathianathen NJ, Konety BR, Crook J, Saad F, Lawrentschuk N (2018). Landmarks in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 15(10): 627-42.
117. Lepor H, Gregerman M, Crosby R, Mostofi FK, Walsh PC (1985). Precise localization of the autonomic nerves from the pelvic plexus to the corpora cavernosa: A detailed anatomical study of the adult male pelvis. *J Urol* 133(2): 207-12.
118. Schlegel PN, Walsh PC (1987). Neuroanatomical approach to radical cystoprostatectomy with preservation of sexual function. *J Urol* 138(6): 1402-406.
119. Walsh PC (2007). The discovery of the cavernous nerves and development of nerve sparing radical retropubic prostatectomy. *J Urol* 177(5): 1632-35
120. Kadono Y, Machioka K, Nakashima K, Iijima M, Shigehara K, Nohara T, Narimoto K, Izumi K, Kitagawa Y, Konaka H, Gabata T, Mizokami A (2017). Changes in penile length after radical prostatectomy: Investigation of the underlying anatomical mechanism. *BJU Int* 120(2): 293-99.
121. Droupy S, Hessel A, Benoît G, Blanchet P, Jardin A, Giuliano F (1999). Assessment of the functional role of accessory pudendal arteries in erection by transrectal doppler ultrasound. *J Urol* 162(2): 1987-91.
122. Rogers CG, Trock BP, Walsh PC (2004). Preservation of accessory pudendal arteries during radical retropubic prostatectomy: surgical technique and results. *Urology* 64(1): 148-151.

123. Mulhall JP, Slovic R, Hotaling J, Aviv N, Valenzuela R, Waters WB, Flanigan RC (2002). Erectile dysfunction after radical prostatectomy: hemodynamic profiles and their correlation with the recovery of erectile function. *J Urol* 167(3): 1371-75.
124. Resnick MJ, Koyama T, Fan KH, Albertsen PC, Goodman M, Hamilton AS, Hoffman RM, Potosky AL, Stanford JL, Stroup AM, Van Horn RL, Penson DF (2013). Longterm functional outcomes after treatment for localized prostate cancer. *N Eng J Med* 368(5): 436-445.
125. Nelson CJ, Scardino PT, Eastham JA, Mulhall JP (2013). Back to baseline: Erectile function recovery after radical prostatectomy from the patients' perspective. *J Sex Med* 10(6): 1636-1643.
126. Haglind E, Carlsson S, Stranne J, Wallerstedt A, Wilderäng U, Thorsteinsdottir T, Lagerkvist M, Damber JE, Bjartell A, Hugosson J, Wiklund P, Steineck G (2015). Urinary incontinence and erectile dysfunction after robotic versus open radical prostatectomy: A prospective, controlled and nonrandomised trial. *Eur Urol* 68(2): 216-225.
127. Leungwattanakij S, Bivalacqua TJ, Usta MF, Yang DY, Hyun JS, Champion HC, Abdel-Mageed AB, Hellstrom WJ (2003). Cavernous neurotomy causes hypoxia and fibrosis in rat corpus cavernosum. *J Andro* 24(2): 239-45.
128. Jeffrey DC, Burnett AL (2017). Neuroprotective and Nerve Regenerative Approaches for Treatment of Erectile Dysfunction after Cavernous Nerve Injury. *Int J Mol Sci* 18(8): 1794. doi:10.3390/ijms18081794.
129. Bell M, Sopko NA, Matsui H, Hannan JL, Bivalacqua TJ (2017). RhoA/ROCK activation in major pelvic ganglion mediates caspase-3 dependent nitrenergic neuronal apoptosis following cavernous nerve injury. *Neural Regen Res* 12(4): 572-73.
130. Yamashita S, Kato R, Kobayashi K, Hisasue S, Arai Y, Tsukamoto T (2011). Inhibition of interleukin-6 attenuates erectile dysfunction in a rat model of nerve-sparing radical prostatectomy. *J Sex Med* 8(7): 1957-1964
131. Cabrini MR, Sezen SF, Lagoda G, Segal RL, Feng Z, Andreoni C, Burnett AL (2013). Fibrotic Protein Expression Profiles in Penile Tissue of Patients With Erectile Dysfunction. *Urology* 82(4): 975.e1-6. doi: 10.1016/j.urology.2013.06.042.
132. Sezen SF, Lagoda G, Burnett AL (2012). Neuronal nitric oxide signaling regulates erection recovery after cavernous nerve injury. *J Urol* 187(2): 757-63.

133. Wang Y, Meng XH, Zhang QJ, Wang YM, Chen C, Wang YC, Zhou X, Ji CJ, Song NH (2019). Losartan improves erectile function through suppression of corporal apoptosis and oxidative stress in rats with cavernous nerve injury. *Asian J Androl* 21(5): 452-459.
134. Angeloni NL, Bond CW, Tang Y, Harrington DA, Zhang S, Stupp SI, McKenna KE, Podlasek CA (2011). Regeneration of the cavernous nerve by Sonic hedgehog using aligned peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials* 32(4): 1091-101.
135. Yin GN, Kim WJ, Jin HR, Kwon MH, Song KM, Choi MJ, Park JM, Das ND, Kwon KD, Batbold D, Kim KW, Ryu JK, Suh JK (2013). Nerve injury-induced protein 1 (ninjurin-1) is a novel therapeutic target for cavernous nerve injury-induced erectile dysfunction in mice. *J Sex Med* 10(6): 1488-501.
136. Wan ZH, Li GH, Guo YL, Li WZ, Chen L (2015). Calpain inhibition improves erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. *Urol Int* 95(2): 233-239.
137. Gratzke C, Strong TD, Gebaska MA, Champion HC, Stief CG, Burnett AL, Bivalacqua TJ (2010). Activated RhoA/Rho kinase impairs erectile function after cavernous nerve injury in rats. *The J Urol* 184(5): 2197-204.
138. Hiraga A, Kuwabara S, Doya H, Kanai K, Fujitani M, Taniguchi J, Arai K, Mori M, Hattori T, Yamashita T (2006). Rho-kinase inhibition enhances axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J Peripher Nerv Syst* 11(3): 217-24.
139. Yang Z, Wang J, Liu X, Cheng Y, Deng L, Zhong Y (2013). Y-39983 downregulates RhoA/Rho-associated kinase expression during its promotion of axonal regeneration. *Oncol Rep* 29(3): 1140-46.
140. Cho MC, Park K, Kim SW, Paick JS (2015). Restoration of erectile function by suppression of corporal apoptosis, fibrosis and corporal veno-occlusive dysfunction with Rho-kinase inhibitors in a rat model of cavernous nerve injury. *J Urol* 193(5): 1716-23.
141. Cho MC, Park K, Chai JS, Lee SH, Kim SW, Paick JS (2011). Involvement of sphingosine-1-phosphate/RhoA/Rho-kinase signaling pathway in corporal fibrosis following cavernous nerve injury in male rats. *J Sex Med* 8(3): 712-21.
142. Song SH, Park K, Kim SW, Paick JS, Cho MC (2015). Involvement of Rho-kinase/LIM kinase/cofilin signaling pathway in corporal fibrosis after cavernous nerve injury in male rats. *J Sex Med* 12(7): 1522-32.

143. Deng YL, Xiong XZ, Cheng NS (2012). Organ fibrosis inhibited by blocking transforming growth factor- $\beta$  signaling via peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 11(5): 467-78.
144. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R (2010). The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol* 225 (3): 631-37.
145. Ucgul I, Aras S, Elıbuyuk U (2018). Extracellular matrix structure and tasks. *UUMFD* 23(1): 295-310.
146. Canguven O, Lagoda G, Sezen SF, Burnett AL (2009). Losartan preserves erectile function after bilateral cavernous nerve injury via antifibrotic mechanisms in male rats. *J Urol* 181(6): 2816-22.
147. Zollinger AJ, Smith ML (2017). Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol* 60(61): 27-37.
148. Albersen M, Kendirci M, Van der Aa F, Hellstrom WJ, Lue TF, Spees JL (2012). Multipotent stromal cell therapy for cavernous nerve injury-induced erectile dysfunction. *J Sex Med* 9(2): 385-403.
149. Fode M, Ohl DA, Ralph D, Sonksen J (2013). Penile rehabilitation after radical prostatectomy: What the evidence really says. *BJU Int* 112(7): 998-1008.
150. Dantas AT, Pereira MC, de Melo Rego MJ, da Rocha LF Jr, Pitta Ida R, Marques CD, Duarte AL, Pitta MG (2015). The role of PPAR in systemic sclerosis. *PPAR Res* 2015: 124624. doi: 10.1155/2015/124624.
151. Iacono F, Giannella R, Somma P, Manno G, Fusco F, Mirone V (2005). Histological alterations in cavernous tissue after radical prostatectomy. *J Urol* 173(5): 1673-76.
152. Kelly LW, Johnson KE, Harrison CA (2017). Targeting TGF- $\beta$  mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis. *Front Pharmacol* 8: 461. doi: 10.3389/fphar.2017.00461.
153. Reka AK, Goswami MT, Krishnapuram R, Standiford TJ, Keshamouni VG (2011). Molecular cross-regulation between PPAR $\gamma$  and other signaling pathways: Implications for lung cancer therapy. *Lung Cancer* 72(2): 154-59.
154. Moreland RB, Traish A, McMillin MA, Smith B, Goldstein I, Saenz de Tejada I (1995). PGE1 suppresses the induction of collagen synthesis by transforming growth factor-beta 1 in human corpus cavernosum smooth muscle. *J Urol* 153(3): 826-34.

155. Yoshida K, Matsuzaki K, Murata M, Yamaguchi T, Suwa K, Okazaki K (2018). Clinico pathological importance of TGF- $\beta$ /Phospho-Smad signaling during human hepatic fibrocarcinogenesis. *Cancers* 10(6): 183. doi: 10.3390/cancers 10060183.
156. Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390(6659): 465-71.
157. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG (2011). TGF- $\beta$  signaling in fibrosis. *Growth Factors* 29(5): 196-202.
158. Souchelnyskyi S, Tamaki K, Engström U, Wernstedt C, ten Dijke P, Heldin CH (1997). Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 272(44): 28107-15.
159. Lakshmi SP, Reddy AT, Reddy RC (2018). Transforming growth factor  $\beta$  suppresses peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  expression via both SMAD binding and novel TGF- $\beta$  inhibitory elements. *Biochem J* 474(9): 1531-46.
160. Shin TY, Ryu JK, Jin HR, Piao S, Tumurbaatar M, Yin GN, Shin SH, Kwon MH, Song KM, Fang ZH, Han JY, Kim WJ, Suh JK (2011). Increased cavernous expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 and activation of the Smad signaling pathway affects erectile dysfunction in men with spinal cord injury. *J Sex Med* 8(5): 1454-62
161. Lee SR, Kim KH, You HS, Fu J, Hsieh TM, Bhargava V, Raj Rajasekaran M (2017). Characterization of age-related penile microvascular hemodynamic impairment using laser speckle contrast imaging: Possible role of increased fibrogenesis. *Physiol Rep* 5(21): e13481. doi: 10.14814/phy2.13481.
162. Cui K, Luan Y, Wang T, Zhuan L, Rao K, Wang SG, Ye ZQ, Liu JH, Wang DW (2017). Reduced corporal fibrosis to protect erectile function by inhibiting the Rho-kinase/LIM-kinase/cofilin pathway in the aged transgenic rat harboring human tissue kallikrein 1. *Asian J Androl* 19(1): 67-72.
163. Hannan JL, Kutlu O, Stopak BL, Liu X, Castiglione F, Hedlund P, Burnett AL, Bivalacqua TJ (2014). valproic acid prevents penile fibrosis and erectile dysfunction in cavernous nerve injured rat. *J Sex Med* 11(6): 1442-51.
164. Song KM, Chung JS, Choi MJ, Jin HR, Yin GN, Kwon MH, Park JM, Kim WJ, Lee SJ, Kim SJ, Ryu JK, Suh JK (2014). Effectiveness of intracavernous delivery of adenovirus encoding Smad7 gene on erectile function in a mouse model of cavernous nerve injury. *J Sex Med* 11(1): 51-63.

165. Bae JH, Shrestha KR, Park YH, Kim IG, Piao S, Jung AR, Jeon SH, Park KD, Lee JY (2014). Comparison between subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor-hydrogel and intracavernous injection of adipose derived stem cells in a rat model of CNI. *Urology* 84(5): 1248.e1-7. doi: 10.1016/j.urology.2014.07.028.
166. Sezen SF, Hoke A, Burnett AL, Snyder SH (2001). Immunophilin ligand FK506 is neuroprotective for penile innervation. *Nat Med* 7(10): 1073-1074.
167. Burnett AL, Becker RE (2004). Immunophilin ligands promote penile neurogenesis and erection recovery after cavernous nerve injury. *J Urol* 171: 495-500.
168. Burnett AL, McCullough AR et al (2007). Neuromodulation to preserve erectile function after radical prostatectomy: Results from the GPI 1485 neuroimmunophilin ligand clinical trial. *J Urol* 177: 383-4.
169. Vignozzi L, Filippi S, Morelli A, Marini M, Chavalmane A, Fibbi B, Silvestrini E, Mancina R, Carini M, Vannelli GB, Forti G, Maggi M (2009). Cavernous neurotomy in the rat is associated with the onset of an overt condition of hypogonadism. *J Sex Med* 6(5): 1270-1283.
170. Kishimoto T, Fukawa T, Yamaguchi K, Yamamoto Y, Nakatsuji H, Izaki H, Takahashi M, Fukumori T, Kanayama HO (2013). Mineralocorticoid receptor expression in human penile corpus cavernosum. *J Med Invest* 60(1-2): 21-26.
171. Bessede T, Alsaïd B, Ferretti L, Pierre M, Bernabé J, Giuliano F, Karam I, Benoît G, Droupy S (2010). Effect of a local delivery of triiodothyronine (T3) within neuroregenerative guide on recovery of erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. *J Sex Med* 7(5): 1798-806.
172. Zhang H, Albersen M, Jin X, Lin G (2012). Stem cells: Novel players in the treatment of erectile dysfunction. *Asian J Androl* 14(1): 145-55.
173. Fandel TM, Albersen M, Lin G, Qiu X, Ning H, Banie L, Lue TF, Lin CS (2012). Recruitment of intracavernously injected adipose derived stem cells to the major pelvic ganglion improves erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. *Eur Urol* 61(1): 201-10.
174. Lin G, Li H, Zhang X, Wang J, Zaid U, Sanford MT, Tu V, Wu A, Wang L, Tian F, Kotanides H, Krishnan V, Wang G, Ning H, Banie L, Lin CS, Deng GG, Lue TF (2015). Novel therapeutic approach for neurogenic erectile dysfunction: effect of neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 monoclonal antibody. *Eur Urol* 67(4): 716-26.

175. Lasker GF, Pankey EA, Allain AV, Dhaliwal JS, Stasch JP, Murthy SN, Kadowitz PJ (2013). Analysis of erectile responses to BAY 41-8543 and muscarinic receptor stimulation in the rat. *J Sex Med* 10(3): 704-18.
176. Lin H, Yuan J, Ruan KH, Yang W, Zhang J, Dai Y, Wang R (2013). COX-2-10aa-PGIS gene therapy improves erectile function in rats after cavernous nerve injury. *J Sex Med* 10(6): 1476-87.
177. Xiong G, Li B, Wang K, Li H (2014). Chinese herb formulae for treatment of erectile dysfunction: A systematic review of randomised controlled clinical trials. *Andrologia* 46(3): 201-23.
178. Wu YN, Liao CH, Chen KC, Liu SP, Chiang HS (2015). Effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb-761) on recovery of erectile dysfunction in BCNI rat model. *Urology* 85(5): 1214.e7-1214.e15. doi: 10.1016/j.urology.2015.01.026.
179. Shindel AW, Xin ZC, Lin G, Fandel TM, Huang YC, Banie L, Breyer BN, Garcia MM, Lin CS, Lue TF (2010). Erectogenic and neurotrophic effects of icariin, a purified extract of horny goat weed (*Epimedium* spp.) in vitro and in vivo. *J Sex Med* 7(4-1): 1518-1528.
180. Kam SC, Do JM, Choi JH, Jeon BT, Roh GS, Hyun JS (2012) in vivo and in vitro animal investigation of the effect of a mixture of herbal extracts from *Tribulus terrestris* and *Cornus officinalis* on Penile Erection. *J Sex Med* 9(10): 2544-51.
181. Jang DJ, Lee MS, Shin BC, Lee YC, Ernst E (2008). *Red ginseng* for treating erectile dysfunction: A systematic review. *Br J Clin Pharmacol* 66(4): 444-50.
182. Gonzales GF, Córdova A, Vega K, Chung A, Villena A, Góñez C, Castillo S (2002). Effect of *Lepidium meyenii* (MACA) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men. *Andrologia* 34(6): 367-72.
183. Kapoor MS, Khan SA, Gupta SK, Choudhary R, Bodakhe SH (2015) Animal models of erectile dysfunction. *J Pharmacol Toxicol Methods* 76: 43-54.
184. Wu C, Kovac JR (2016). Models for erectile dysfunction and their importance to novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 11(2): 185-96.
185. Gajbhiye SV, Jadhav KS, Marathe PA, Pawar DB (2015). Animal models of erectile dysfunction. *Indian J Urol* 31(1): 15-21.
186. Chung E, De Young L, Brock GB (2011). Investigative models in erectile dysfunction: A state of the art review of current animal models. *J Sex Med* 8(12): 3291-305.

187. Hull EM, Dominguez JM (2007). Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav* 52(1): 45-55.
188. Burnett AL, Wessellmann U (1999). History of the neurobiology of the pelvis. *Urology* 53(6): 1082-89.
189. Lewis JE, Walker DF, Beckett SD, Vachon RI (1968). Blood pressure within the corpus cavernosum penis of the bull. *J Reprod Fertil* 17(1): 155-56.
190. Walsh PC, Lepor H, Eggleston JC (1983). Radical prostatectomy with preservation of sexual function: Anatomical and pathological considerations. *Prostate* 4(5): 473-85.
191. Quinlan DM, Nelson RJ, Partin AW, Mostwin JL, Walsh PC (1989). The rat as a model for the study of penile erection. *J Urol* 141(3): 656-61.
192. Hsieh PS, Bochinski DJ, Lin GT, Nunes L, Lin CS, Lue TF (2003). The effect of vascular endothelial growth factor and brain-derived neurotrophic factor on cavernosal nerve regeneration in a nerve crush rat model. *Br J Urol* 92(4): 470-475.
193. Chen YL, Chao TT, Wu YN, Chen MC, Lin YH, Liao CH, Wu CC, Chen KC, Chou SP, Chiang HS (2018). nNOS-positive minor-branches of the dorsal penile nerves is associated with erectile function in the bilateral cavernous injury model of rats. *Sci Rep* 8(1): 929. doi: 10.1038/s41598-017-18988-2.
194. Chen KK, Chang LS (2002). Involvement of L-arginine/nitric oxide pathway at the paraventricular nucleus of hypothalamus in central neural regulation of penile erection in the rat. *Int J Impot Res* 14(3): 139-145.
195. Bernabé J, Rampin O, Sachs BD, Giuliano F (1999). Intracavernous pressure during erection in rats: An integrative approach based on telemetric recording. *Am J Physiol* 276(2): 441-449.
196. McMurray G, Casey JH, Naylor AM (2006). Animal models in urological disease and sexual dysfunction. *Br J Pharmacol* 147(2): 62-79.
197. Fu J, Wang Z, Huang L, Zheng S, Wang D, Chen S, Zhang H, Yang S (2014). Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi). *Phytother Res* 28(9): 1275-83.
198. Jin Y, Guo X, Yuan B, Yu W, Suo H, Li Z, Xu H (2015). Disposition of astragaloside IV via enterohepatic circulation is affected by the activity of the intestinal microbiome. *J Agric Food Chem* 63(26): 6084-93.



199. Gao S, Basu S, Yang Z, Deb A, Hu M (2012). Bioavailability challenges associated with development of saponins as therapeutic and chemopreventive agents. *Current Drug Targets* 13(4): 1885-99.
200. Cheng XD, Wei MG (2014). Profiling the metabolism of AS-IV by ultra performance LC coupled with quadrupole/time of flight MS. *Molecules* 19(11): 18881-96.
201. Gu Y, Wang G, Pan G, Fawcett JP, A J, Sun J (2004). Transport and bioavailability studies of astragaloside IV, an active ingredient in radix Astragali. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95(6): 295-98.
202. Huang C, Wang G, Li H, Xie H, Sun J, Lv H, Lv T (2006) . Sensitive and selective LC electrospray MS analysis of AS-IV in rat plasma 40: 788-93.
203. Chen Z, Gu B (2009). Enhanced oral bioavailability of astragaloside IV in rats through complexation with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *AJPS* 4(1): 56-64.
204. Zhang WD, Zhang C, Liu RH, Li HL, Zhang JT, Mao C, Moran S, Chen CL (2006). Preclinical pharmacokinetics and tissue distribution of a natural cardioprotective agent astragaloside IV in rats and dogs. *Life Sci* 79(8): 808-15.
205. Zhang Q, Zhu LL, Chen GG, Du Y (2007). Pharmacokinetics of astragaloside IV in beagle dogs. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 32(2): 75-79.
206. Chang YX, Sun YG, Li J, Zhang QH, Guo XR, Zhang BL, Jin H, Gao XM (2012). The experimental study of *Astragalus membranaceus* on meridian tropism: The distribution study of astragaloside IV in rat tissues. *J Choram B* 911(12): 71-85.
207. Ran R, Zhang C, Li R, Chen B, Zhang W, Zhao Z, Fu Z, Du Z, Du X, Yang X, Fang Z (2016). Evaluation and comparison of the inhibition effect of astragaloside IV and aglycone cycloastragenol on various UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms. *Molecules* 21(12): 1616. doi: 10.3390/molecules21121616.
208. Zhou RN, Song YL, Ruan JQ, Wang YT, Yan R (2012). Pharmacokinetic evidence on the contribution of intestinal bacterial conversion to beneficial effects of astragaloside IV, a marker compound of astragali radix, in traditional oral use of the herb. *Drug Metab Pharmacokinet* 27(6): 586-97.
209. Jiangbo Z, Xuying W, Yuping Z, Xili M, Yiwen Z, Tianbao Z (2009). Effect of astragaloside IV on the embryo-fetal development of Sprague Dawley rats and New Zealand White rabbits. *J Appl Toxicol* 29(5): 381-85.

210. Wan X, Jiangbo Z, Yuping Z, Xili M, Yiwen Z, Tianbao Z, Weidong Z (2010). Effect of astragaloside IV on the general and peripartum reproductive toxicity in Sprague-Dawley rats. *Int J Toxicol* 29(5): 505-16.
211. Xu M, Yin J, Xie L, Zhang J, Zou C, Zou J, Liu F, Ju W, Li P (2013). Pharmacokinetics and tolerance of total astragalosides after intravenous infusion of astragalosides injection in healthy Chinese volunteers. *Phytomed* 20(12): 1105-11.
212. Wang X, Wang Y, Hu JP, Yu S, Li BK, Cui Y, Ren L, Zhang LD (2017). Astragaloside IV, a natural PPAR $\gamma$  agonist, reduces A $\beta$  production in alzheimer's disease through inhibition of bace1. *Mol Neurobiol* 54(4): 2939-2949.
213. Kim S, Kang IH, Nam JB, Cho Y, Chung DY, Kim SH, Kim JS, Cho YD, Hong EK, Sohn NW, Shin JW (2015) Ameliorating the effect of astragaloside IV on learning and memory deficit after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Molecules* 20(2): 1904-21.
214. Chan WS, Durairajan SSK, Lu JH, Wang Y, Xie LX, Kum WF, Koo I, Yung KKL, Li M (2009). Neuroprotective effects of astragaloside IV in 6-hydroxydopamine treated primary nigral cell culture. *Neurochemi Int* 55(6): 414-422.
215. Yin Y, Liu Y, Huang LQ, Huang SQ, Zhuang JH, Chen XY, Zhang L, Wu H, Shao F, Zhao Z (2010). Anti-apoptosis effect of astragaloside IV on alzheimer's disease rat model via enhancing the expression of Bcl-2 and Bcl-X1. *Scand J Lab Ani Sci* 37(2): 75-82.
216. Tohda C, Tamura T, Matsuyama S, Komatsu K (2006). Promotion of axonal maturation and prevention of memory loss in mice by extracts of *Astragalus mongholicus*. *Br J Pharmacol* 149(5): 532-41.
217. Yin YY, Li WP, Gong HL, Zhu FF, Li WZ, Wu GC (2010). Protective effect of astragaloside on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Am J Chin Med* 38(3): 517-27.
218. Zhu SQ, Qi L, Rui YF, Li RX, He XP, Xie ZP (2008). Astragaloside IV inhibits spontaneous synaptic transmission and synchronized Ca<sup>+2</sup> oscillations on hippocampal neurons. *Acta Pharmacol Sin* 29(1): 57-64.
219. Cheng CY, Yao CH, Liu BS, Liu CJ, Chen GW, Chen YS (2005). The role of astragaloside in regeneration of the peripheral nerve system. *J Bio Mat Res* 76(3): 463-69.

220. Yu J, Zhang Y, Sun S, Shen J, Qiu J, Yin X, Yin H, Jiang S (2006). Inhibitory effects of astragaloside IV on diabetic peripheral neuropathy in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 84(6): 579-87.
221. Yue R, Li X, Chen B, Zhao J, He W, Yuan H, Yuan X, Gao N, Wu G, Jin H, Shan L, Zhang W (2015). Astragaloside IV attenuates glutamate induced neurotoxicity in PC12 cells through Raf-MEK-ERK pathway. *PLoS One* 10(5): e0126603. doi: 10.1371/journal.pone.0126603.
222. Katz EG, Moustafa AA, Heidenberg D, Haney N, Peak T, Lasker GF, Knoedler M, Rittenberg D, Rezk BM, Abd Elmageed ZY, Yafi FA, Sikka S, Abdel-Mageed AB, Hellstrom WJ (2016). Pioglitazone enhances survival and regeneration of pelvic ganglion neurons after cavernosal nerve injury. *Urology* 89: 76-82.
223. Heidenberg DJ, Delay KJ, Katz EG, Hellstorm WJ (2016). Pioglitazone improves pelvic ganglion neuronal survival. *Receptors Clin Investig* 3: e1371. doi: 10.14800/rci.1371.
224. Vallee A, Lecarpentier Y, Guillemin R, Vallée JN (2017). Interactions between TGF- $\beta$ 1, canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway and PPAR  $\gamma$  in radiation-induced fibrosis. *Oncotarget* 8(52): 90579-90604. doi: 10.18632/oncotarget.21234.
225. Zhao Y, Wang L, Wang Y, Dong S, Yang S, Guan Y, Wu X (2019). Astragaloside IV inhibits cell proliferation in vulvar squamous cell carcinoma through the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. *Dermatol Ther* 32(4): e12802. doi: 10.1111/dth.12802.
226. Che X, Wang Q, Xie Y, Xu W, Shao X, Mou S, Ni Z (2015). Astragaloside IV suppresses transforming growth factor- $\beta$ 1 induced fibrosis of cultured mouse renal fibroblasts via inhibition of the MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 464(4): 1260-66.
227. Tong J, Wu Z, Wang Y, Hao Q, Liu H, Cao F, Jiao Y (2021). Astragaloside IV synergizing with ferulic acid ameliorates pulmonary fibrosis by TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021: 8845798. doi: 10.1155/2021/8845798.
228. Yu WN, Sun LF, Yang H (2016). Inhibitory effects of astragaloside IV on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats via attenuation of oxidative stress and inflammation. *Inflammation* 39(5): 1835-1841.

229. Yuhong M, Li W, Yin Y, Li W (2015). AST IV inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis by suppressing Nox4 expression through the TGF- $\beta$ 1/Smad2 pathway. *Int J Mol Med* 35(6): 1667-74.
230. Li X, Wang X, Han C, Wang X, Xing G, Zhou L, Li G, Niu Y (2013). Astragaloside IV suppresses collagen production of activated hepatic stellate cells via oxidative stress-mediated p38 MAPK pathway. *Free Radic Biol Med* 60: 168-76.
231. Liu H, Wei W, Sun WY, Li X (2009). Protective effects of astragaloside IV on porcine serum induced hepatic fibrosis in rats and in vitro effects on hepatic stellate cells. *J Ethnopharma* 122(3): 502-508.
232. Zhang L, Li Z, He W, Xu L, Wang J, Shi J, Sheng M (2015). Effects of astragaloside IV Against the TGF- $\beta$ 1-induced epithelial to mesenchymal transition in peritoneal mesothelial cells by promoting Smad 7 expression. *Cell Physiol Biochem* 37(1): 43-54.
233. Chen P, Xie Y, Shen E, Li GG, Yu Y, Zhang CB, Yang Y, Zou Y, Ge J, Chen R, Chen H (2011). Astragaloside IV attenuates myocardial fibrosis by inhibiting TGF- $\beta$ 1 signaling in coxsackievirus B3-induced cardiomyopathy. *Eur J Pharmacol* 658(2-3): 168-74.
234. Qi Q, Mao Y, Yi J, Li D, Zhu K, Cha X (2014). Anti-Fibrotic effects of astragaloside IV in systemic sclerosis. *Cell Physiol Biochem* 34(6): 2105-16.
235. Kamshoushi AM, Sobhy N, Helal, SF, Hassaan PS, Omar HA (2018). A study of the correlation between angiotensin (1-7) and the histopathological changes in the penises of experimentally diabetic rats. *OJEMB* 8: 81-92.
236. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ et al (2020). Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol* 18(7): e3000411. doi: 10.1371/journal.pbio.3000411.
237. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A (2022). Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 72(1): 7-33.
238. Heidenreich A (2008). Radical prostatectomy in 2007: Oncological control and preservation of Functional Integrity. *Eur Urol* 53: 877-79
239. Mills TM, Stopper VS, Wiedmeier VT (1994). Effects of castration and androgen replacement on the hemodynamics of penile erection in the rat. *Biol Reprod* 51(2): 234-238.

240. Kim HJ, Kim HY, Kim SY, Lee SH, Lee WK, Yang DY (2011). Spontaneous recovery of cavernous nerve crush injury. *KJU* 52(8): 560-565.
241. Mao Q, Chen C, Liang H, Zhong S, Cheng X, Li L (2019). Astragaloside IV inhibits excessive mesangial cell proliferation and renal fibrosis caused by diabetic nephropathy via modulation of the TGF- $\beta$ 1/Smad/miR-192 signaling pathway. *Exp Ther Med* 18(4): 3053-3061.
242. Wang Y, Lin C, Ren Q, Liu Y, Yang X (2015). Astragaloside effect on TGF- $\beta$ 1, SMAD2/3, and  $\alpha$ -SMA expression in the kidney tissues of diabetic KKAY mice. *Int J Clin Exp Pathol* 8(6): 6828-6834.
243. Zhang X, Chen J (2013). The mechanism of astragaloside IV promoting sciatic nerve regeneration. *Neural Regen Res* 8(24): 2256-65.
244. Chen XJ, Meng D, Feng L, Bian YY, Li P, Yang D, Cao KJ, Zhang JN (2006). Protective effect of astragalosides on myocardial injury by isoproterenol in SD rats. *Am J Chin Med* 34(6): 1015-25.
245. Zhang WD, Zhang C, Wang XH, Gao PJ, Zhu DL, Chen H, Liu RH, Li HL (2006). Astragaloside IV dilates aortic vessels from normal and spontaneously hypertensive rats through endothelium-dependent and endothelium-independent ways. *Planta Med* 72(7): 621-26.
246. Hu G, Li X, Zhang S, Wang X (2016). Association of rat thoracic aorta dilatation by astragaloside IV with the generation of endothelium derived hyperpolarizing factors and nitric oxide, and the blockade of Ca<sup>2+</sup> channels. *Biomed Rep* 5(1): 27-34.
247. Lin XP, Cui HJ, Yang AL, Luo JK, Tang T (2018). Astragaloside IV improves vasodilatation function by regulating the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway in rat aorta endothelial cells. *J Vasc Res* 55(3): 169-76.
248. Tan YQ, Chen HW, Li J (2020). Astragaloside IV: An effective drug for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Des Dev Ther* 14: 3731-3746.
249. Nehra A, Gettman MT, Nugent M, Bostwick DG, Barrett DM, Goldstein I, Krane RJ, Moreland RB (1999). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) is sufficient to induce fibrosis of rabbit corpus cavernosum in vivo. *J Urol* 162(3-1): 910-915.
250. Wang YN, Zhao SL, Su YY, Feng JX, Wang S, Liao XM, Wang LN, Li JC, Meng P, Li HY, Zhang YF (2020). Astragaloside IV attenuates high glucose-induced EMT by inhibiting the TGF- $\beta$ /Smad pathway in renal proximal tubular epithelial cells. *Biosci Rep* 40(6): BSR20190987. doi: 10.1042/BSR20190987.

251. Chung AC, Huang XR, Zhou L, Heuchel R, Lai KN, Lan HY (2009). Disruption of the Smad7 gene promotes renal fibrosis and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. *Nephrol Dial Transpl* 24(5): 1443-54.
252. Liu GX, Li YQ, Huang XR, Wei L, Chen HY, Shi YJ, Heuchel RL, Lan HY (2013). Disruption of Smad7 promotes Ang-II mediated renal inflammation and fibrosis via Sp1-TGF- $\beta$ /Smad3-NF- $\kappa$ B-dependent mechanisms in mice. *PLoS One* 8(1): e53573. doi: 10.1371/journal.pone.0053573.
253. Lan HY, Mu W, Tomita N, Huang XR, Li JH, Zhu HJ, Morishita R, Johnson RJ (2003). Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound microbubble system in rat UUO model. *J Am Soc Nephrol* 14(6): 1535-48.
254. Li JH, Zhu HJ, Huang XR, Lai KN, Johnson RJ, Lan HY (2002). Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. *J Am Soc Nephrol* 13(6): 1464-72.
255. Li N, Wu K, Feng F, Wang L, Zhou X, Wang W (2021). Astragaloside IV alleviates silica-induced pulmonary fibrosis via inactivation of the TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 signaling pathway. *Int J Mol Med* 47(3): 16. doi: 10.3892/ijmm.2021.4849.
256. Lee J, Cho MC, Son H, Kim SW (2022). Restoring erectile function by combined treatment with JNK inhibitor and HDAC inhibitor in a rat model of cavernous nerve injury. *Andrology* 10(4): 758-766.
257. Choe S, Veliceasa D, Bond CW, Harrington DA, Stupp SI, McVary KT, Podlasek CA (2016). Sonic hedgehog delivery from self-assembled nanofiber hydrogels reduces the fibrotic response in models of erectile dysfunction. *Acta Biomater* 1(32): 89-99.
258. Ferrini MG, Kovanecz I, Sanchez S, Umeh C, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF (2009). Fibrosis and loss of smooth muscle in the corpora cavernosa precede corporal venoocclusive dysfunction (CVOD) induced by experimental cavernosal nerve damage in the rat. *J Sex Med* 6(2): 415-28.
259. Kim TB, Cho MC, Paick JS, Kim SW (2012). Is it possible to recover erectile function spontaneously after cavernous nerve injury? Time-dependent structural and functional changes in corpus cavernosum following cavernous nerve injury in rats. *World J Mens Health* 30(1): 31-39.
260. Li LC, Xu L, Hu Y, Cui WJ, Cui WH, Zhou WC, Kan LD (2017). Astragaloside IV improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats by attenuating extracellular matrix deposition. *Front Pharmacol* 8: 513. doi: 10.3389/fphar.2017.00513.

261. Wang X (2006). Effects of Astragaloside on growth activity and apoptosis of fibroblasts from human skin with and with-out wrinkle in vitro. *Chin J Med Aesthetics Cosmetol* 12(2): 94-97.
262. Liu X, Min W (2011). Protective effects of Astragaloside against ultraviolet A induced photoaging in human fibroblasts. *Chin J Integr Med* 9(3): 328-332.
263. Chen B, Li R, Yan N, Chen G, Qian W, Jiang HL, Ji C, Bi ZG (2015). Astragaloside IV controls collagen reduction in photoaging skin by improving transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling suppression and inhibiting matrix metalloproteinase-1. *Mol Med Report* 11(5): 3344-48.
264. Li FZ, Cai PC, Song LJ, Zhou LL, Zhang Q, Rao SS, Xia Y, Xiang F, Xin JB, Greer PA, Shi HZ, Su Y, Ma WL, Ye H (2015). Crosstalk between calpain activation and TGF- $\beta$ 1 augments collagen-I synthesis in pulmonary fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852(9): 1796-1804.
265. Liu Y, Liu B, Zhang GQ, Zou JF, Zou ML, Cheng ZS (2018). Calpain inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via switching the development of epithelial-mesenchymal transition. *Naunyn Schmiedeb Arch Pharmacol* 391(7): 695-704.
266. Mei M, Tang F, Lu M, He X, Wang H, Hou X, Hu J, Xu C, Han R (2015). Astragaloside IV attenuates apoptosis of hypertrophic cardiomyocyte through inhibiting oxidative stress and calpain-1 activation. *Environ Toxicol Pharmacol* 40(3): 764-73.
267. Sun Y, Lu M, Sun T, Wang H (2021). Astragaloside IV attenuates inflammatory response mediated by NLRP-3/calpain-1 is involved in the development of pulmonary hypertension. *J Cell Mol Med* 25(1): 586-590.
268. Li H, Chen LP, Wang T, Wang SG, Liu JH (2018). Calpain inhibition improves erectile function in diabetic mice via upregulating endothelial nitric oxide synthase expression and reducing apoptosis. *Asian J Androl* 20(4): 342-48.
269. Agarwal S, Yadav A, Chaturvedi RK (2017). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as therapeutic target in neurodegenerative disorders. *Biochem Biophys Res Commun* 483(4): 1166-77.
270. Aliperti LA, Lasker GF, Hagan SS, Hellstrom JA, Gokce A, Trost LW, Kadowitz PJ, Sikka SC, Hellstrom WJ (2014). Efficacy of pioglitazone on erectile function recovery in a rat model of cavernous nerve injury. *Urology* 84(5): 1122-27.

271. Heidenberg DJ, Haney NM, Rezk BM, Talwar S, Okpechi SC, Srivastav SK, Honda M, Song B, Swan K, Awadallah S, Anaissie J, Peak T, DeLay KJ, Kadowitz PJ, Sikka SC, Abdel Mageed AB, Hellstrom WJG (2019). Pioglitazone's beneficial effects on erectile function preservation after cavernosal nerve injury in the rat are negated by inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor: A preclinical study. *IJIR* 31(1): 1-8.
272. Chen T, Wang R, Jiang W, Wang H, Xu A, Lu G, Ren Y, Xu Y, Song Y, Yong S, Ji H, Ma Z (2016). Protective effect of astragaloside IV against paraquat-induced lung injury in mice by suppressing Rho signaling. *Inflammation* 39(1): 483-92.
273. Qing LS, Chen TB, Sun WX, Chen L, Luo P, Zhang ZF, Ding LS (2019). Pharmacokinetics comparison, intestinal absorption and acute toxicity assessment of a novel water-soluble astragaloside IV derivative (astragalosidic acid, LS-102). *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 44(2): 251-259.
274. Sun WX, Zhang ZF, Xie J, He Y, Cheng Y, Ding LS, Luo P, Qing LS (2019). Determination of a astragaloside IV derivative LS-102 in plasma by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in dog plasma and its application in a pharmacokinetic study. *Phytomedicine* 53: 243-51.





## **BİLİMSEL DERNEK, ORGANİZASYON VE KURULUŞLARDAKİ ÜYELİKLER/GÖREVLER**

KTÜ Eczacılık Fakültesi, Uzaktan Eğitim Komisyonu, Üye, 2020 - Devam ediyor

KTÜ Eczacılık Fakültesi, Staj Komisyonu, Üye, 2015 - Devam ediyor

18. Bölge Trazabzon Eczacı Odası, Üye, 2010 - Devam ediyor

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunları Derneği, Üye, 2010 - Devam ediyor

## **ÖDÜLLER VE BURSLAR**

1. Sözlü Bildiri Mansiyon Ödülü, Türk Farmakoloji Derneği, 26. Ulusal ve 1. Uluslararası Farmakoloji Kongresi, “Sıçanda kavernoöz sinir hasarı modelinde Astragalozit IV’ün erektil fonksiyon ve kavernozaal fibrozis üzerine etkileri”, 4-6 Kasım 2021, (online).
2. 2211-A Yurt içi Genel Doktora Bursu, TÜBİTAK BİDEB, 2015-2020.

## **YAYINLAR**

1. Kaya Yasar Y, Engin S, Barut EN, **Sevgi S**, Eroglu G, Sezen FS (2020). Evaluation of potential drug-drug interactions in hospitalized patients at a tertiary care hospital: A pilot study. Med-Science. 9(2): 389-392.
2. Badem M, Korkmaz N, Sener SÖ, Kanbolat S, Ozgen U, **Sevgi S**, Aliyazıcıoglu R, Coskun M (2018). Biological screening of traditional medicinal plants from villages of Akkus (Ordu) in Turkey on the effects of tyrosinase. J Pharm Res Int. 25(6): 1-10.
3. Renda G, Korkmaz B, Yıldırım S, Reis A, Bektas NY, **Sevgi S**, Turkis S et al (2018). Antimicrobial activity and the phenolic profile of five *Scrophularia* L. species. J Health Sci. 27(1): 10-15.
4. Renda G, Bektas NY, Korkmaz B, Celik G, **Sevgi S**, Yaylı N (2017). Volatile constituents of three *Stachys* L. species from Turkey. Marmara Pharm J. 21(2): 278-285.

## **BİLDİRİLER**

1. **Sevgi S**, Nalbantoglu Çİ, Kaya Yasar Y, Kerimoğlu G, Kesim SM (2021). Sıçanda kavernoöz sinir hasarı modelinde Astragalozit IV’ün erektil fonksiyon ve kavernozaal fibrozis üzerine etkileri. TFD, 26. Ulusal ve 1. Uluslararası Farmakoloji Kongresi, 4-6 Kasım 2021, Sözlü Bildiri, 307-308, Online.

2. Gün E, **Sevgi S**, Engin S, Barut EN, Barut B, Serdaroğlu V, Özel A, Kaya Yaşar Y, Renda G (2021). *Tchihatchewia isatidea* ekstresinin in vitro ve in vivo antiinflamatuvar etkileri. TFD, 26. Ulusal ve 1. Uluslararası Farmakoloji Kongresi, 4-6 Kasım 2021, Sözlü Bildiri, 263-264, Online.
3. Nalbantoglu Çİ, **Sevgi S**, Kerimoğlu G, Duman KM, Kalyoncu Nİ (2021). Sıçan korpus kavernozumunda diyabete bağlı gelişen fonksiyonel ve yapısal değişiklikler üzerine ursodeoksikolik asidin etkileri. TFD, 26. Ulusal ve 1. Uluslararası Farmakoloji Kongresi, 4-6 Kasım 2021, Sözlü Bildiri, 301-302, Online.
4. Kaya Yaşar Y, Engin S, Barut EN, **Sevgi S**, Eroğlu G, Sezen FS (2019). Evaluation of potential drug-drug interactions in hospitalized patients at a tertiary care hospital: a pilot study. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development (DRD 2019), 1-3 Temmuz 2019, Sözlü Bildiri, 107-109, Malatya.
5. Eroğlu G, **Sevgi S**, Çavuşoğlu İ, Kaya Yaşar Y, Renda G, Sezen FS (2019). Possible anti-nociceptive mechanisms of methanolic extract of *Fraxinus Angustifolia*. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development (DRD 2019), 1-3 Temmuz 2019, Sözlü Bildiri, 411-412, Malatya.
6. **Sevgi S**, Çavuşoğlu İ, Eroğlu G, Temiz B, Tetik S, Renda G et al (2018). In vivo antinociceptive and antiinflammatory effects of *Fraxinus Angustifolia* extracts. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (12th ISOPS), 26-29 Haziran 2018, Poster Bildirisi, 214-215, Ankara.
7. Eroğlu G, **Sevgi S**, Engin S, Barut EN, Kaya Yaşar Y, Yarış E, Sezen FS (2018). Aile sağlığı merkezlerine yapılan farmasötik bakım rotasyonlarının eczacılık eğitime kazandırdıkları: ktü eczacılık fakültesi deneyimi. II. Ulusal Eczacılık Eğitimi ve Akreditasyon Kongresi, 10-11 Mayıs 2018, Poster Bildirisi, 26-26, Eskişehir.
8. Eroğlu G, **Sevgi S**, Engin S, Barut EN, Kaya Yaşar Y, Yarış E, Sezen FS (2018). Klinik servislerde yapılan farmasötik bakım uygulamalarının değerlendirilmesi: Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi deneyimi. II. Ulusal Eczacılık Eğitimi ve Akreditasyon Kongresi, 10-11 Mayıs 2018, Poster Bildirisi, 25-25, Eskişehir.
9. Badem M, Korkmaz N, Sener SÖ, Kanbolat S, Ozgen U, **Sevgi S** et al (2017). Ethnobotanical and ethnomedicinal studies on the villages of Akkuş district (Ordu, Turkey). 3rd International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf ICNPU, 18-21 Ekim 2017, Sözlü Bildiri, Bansko, BULGARIA.

10. **Sevgi S**, Cavusoglu I, Kaya Yaşar Y, Renda G, Kadioglu M et al (2017). *Fraxinus angustifolia* metanolik ekstresinin antinositif ve antiinflatuvar etkileri. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 17-20 Ekim 2017, Poster Bildirisi, 238-238, Trabzon.
11. Renda G, **Sevgi S**, Bayazeid O, Korkmaz B, Yalçın F (2017). *Astragalus Compactus Lam.*'ın fitokimyasal analizi ve sitotoksik aktivitesi. Adnan Menderes Üniversitesi 1. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, 29 Haziran-01 Temmuz 2017, Poster Bildirisi, 983-983, Aydın.
12. **Sevgi S**, Çavuşoğlu İ, Kaya Yaşar Y, Renda G, Sezen FS et al (2017). Antinociceptive and antiinflammatory effects of methanolic extract of *Fraxinus angustifolia*. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi (İVEK), 26-29 Nisan 2017, Poster Bildirisi, 1019-1019, İstanbul.
13. Engin S, Barut EN, Kaya Yaşar Y, **Sevgi S**, Sezen FS (2017). Kronik hastalıklara ve ilaç kullanımına bağlı erektil disfonksiyon. 3. Klinik Eczacılık ve Farmasötik Bakım Kongresi, 9-12 Şubat 2017, Sözlü Bildiri, 47-47, Antalya.
14. Renda G, Yazıcı Bektaş N, Çelik G, Yaylı B, **Sevgi S**, Yaylı N (2015). SPME/GC Analysis of three *Stachys* species from Turkey. 11<sup>th</sup> ISOPS, 9-12 Haziran 2015, Poster Bildirisi, 369-369, Ankara.
15. Renda G, **Sevgi S**, Yaylı B, Yazıcı Bektaş N, Yildirim S, Reis A et al (2015). Determination of Phenolic Compounds in Five *Scrophularia* L. Species by HPLC-Dad and Their Antimicrobial Activity. 11<sup>th</sup> ISOPS, 9-12 Haziran 2015, Poster Bildirisi 378-379, Ankara.
16. **Sevgi S**, Gazioğlu EN, Engin S, Yarış E, Sezen FS (2015). Eczacılık fakültesi lisans eğitiminde farmasötik bakım dersi uygulaması: aile sağlığı merkezlerinde klinik rotasyon. 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 7-10 Eylül 2015, Poster Bildirisi, 271- 271, Ankara.
17. Barut B, **Sevgi S**, Renda G, Özel A, Yalçın FN (2015). Cholinesterase and Tyrosinase Inhibitory Activities of Two Astragalus Species from Turkey. GPSS 12-16 Kasım 2015, Poster Bildirisi, 175-175, Antalya.