



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYABETİK SIÇANLARDA GELİŞEN
EREKTİL DİSFONKSİYONDA
URSODEOKSİKOLİK ASİDİN ETKİLERİ**

İrem ÇAVUŞOĞLU NALBANTOĞLU

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU

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.

04.11.2022

İrem ÇAVUŞOĞLU
NALBANTOĞLU

İthaf

Doktora tezimi, her daim yanımda olan eşim Sermet'e ve bu süreçte dünyaya gelişiyle bana güç veren kızım Berin'e ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecinde desteğini, bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU'ya,

KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Bölümünde bulunduğum yedi yıl boyunca üzerimde emekleri bulunan Prof. Dr. Mine DUMAN KADIOĞLU, Prof. Dr. Ersin YARIŞ ve Prof. Dr. Murat KESİM hocalarıma,

Bilime olan bakış açımı her daim güçlendiren KTÜ Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. F. Sena SEZEN'e,

Doktora başladığım günden itibaren ders dönemi dahil olmak üzere tez çalışmamın planlanmasından gerçekleştirilmesine tüm aşamalarında her daim destekçim olan sevgili çalışma arkadaşım Arş. Gör. Serhat SEVGİ'ye,

Deney çalışmalarımındaki kıymetli emekleri için Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU'na ve Uzm. Dr. Tuğba ARICI'ya,

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,

Sürecin başından itibaren maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen annem Hülya ÇAVUŞOĞLU, babam Osman ÇAVUŞOĞLU ve abim Yunus Emre ÇAVUŞOĞLU'na,

Tez çalışmalarım sırasında ailelerine katıldığım, destek ve hoşgörülerini her daim hissettiğim sevgili NALBANTOĞLU ailesine,

Çalışmalarım boyunca hep yanımda olan sevgili eşim Sermet Salih NALBANTOĞLU ve deney çalışmalarım sırasında karnımda, tez yazım aşamasında da evimdeki varlığıyla bana manevi güç veren canım kızım Berin NALBANTOĞLU'na,

Doktora tez çalışmamı destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP06, Proje kodu: TDK-2020-8748)'ne teşekkürlerimi sunarım.

İrem ÇAVUŞOĞLU
NALBANTOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vvi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Penil Anatomi	3
2.2. Penil Ereksiyon	4
2.2.1. Ereksiyonun Nörofizyolojik Kontrolü	7
2.2.2. Ereksiyonun Moleküler Süreçleri	9
2.3. Eretil Disfonksiyon	14
2.3.1. Eretil Disfonksiyon Tedavisi	17
2.3.2. Eretil Disfonksiyonda Penil Fibrozis	18
2.4. Diyabetik Eretil Disfonksiyon	19
2.4.1. Diyabetik Eretil Disfonksiyon Patofizyolojisi	20
2.4.2. Diyabetik Eretil Disfonksiyon Tedavisi	24
2.4.3. Diyabetik Eretil Disfonksiyonda Penil Fibrozis	25
2.4.4. TGF-β1/Smad/CTGF Sinyal Yolağının Diyabetik Penil Fibrozis Gelişimindeki Rolü	29
2.5. Ursodeoksikolik asit	34
2.5.1 Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	34
2.5.2. Farmakokinetik Özellikleri	35
2.5.3. Farmakolojik Profili	36

3. GEREÇ ve YÖNTEM	40
3.1. Gereç	40
3.1.1. Deney Hayvanları	40
3.1.2. Alet ve Cihazlar	40
3.1.3. Kimyasallar	42
3.1.4. Antikorlar	43
3.1.5. Kitler	43
3.1.6. Çözelti ve Tamponlar	43
3.2. Yöntem	44
3.2.1. Deney Grupları ve Protokolleri	45
3.2.2. Ursodeoksikolik asit Çözeltisinin Hazırlanması	46
3.2.3. Fonksiyonel Ölçümler	46
3.2.4. Dokuların İzole Edilmesi	48
3.2.5. Western Blot Yöntemi ile Moleküler İncelemeler	48
3.2.5.1. Doku Homojenizasyonu	48
3.2.5.2. Total Protein Miktar Tayini	49
3.2.5.3. Protein Denatürasyonu ve Örneklerin Yükleme için Hazırlanması	49
3.2.5.4. Örneklerin Yüklmesi ve SDS-PAGE Jel Elektroforezi	49
3.2.5.5. Proteinlerin Membrana Transfer İşlemi	50
3.2.5.6. Bloklama ve Yıkama	50
3.2.5.7. Primer Antikor ile İnkübasyon ve Yıkama	50
3.2.5.8. Sekonder Antikor ile İnkübasyon ve Yıkama	51
3.2.5.9. Görüntüleme	51
3.2.6. Histopatolojik İnceleme	51
3.2.6.1. Fiksasyon ve Dehidratasyon	51
3.2.6.2. Saydamlaştırma ve Deparafinizasyon	51
3.2.6.3. Blok Hazırlama ve Kesit Alma	52
3.2.6.4. Deparafinizasyon ve Boyama	52
3.2.6.5. Mikroskopik İnceleme	52
3.3. İstatistiksel Analiz	53
4. BULGULAR	54
4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlıkları ve Açlık Kan Glukoz Düzeylerinin Değerlendirilmesi	54

4.2. Fonksiyonel Verilerin Değerlendirilmesi	56
4.2.1. Bazal İKB ve OAB Ölçümlerinin Değerlendirilmesi	56
4.2.2. UDKA Tedavisinin STZ ile İndüklenen Diyabete Bağlı Gelişen ED Üzerine Etkisi	57
4.3. Kavernozal Dokudaki Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi	60
4.3.1. UDKA Tedavisinin TGF- β 1 Protein Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkisi	60
4.3.2. UDKA Tedavisinin pSmad2, Smad2 ve Smad3 Protein Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi	61
4.3.3. UDKA Tedavisinin Smad7 Protein Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkisi	61
4.3.4. UDKA Tedavisinin CTGF Protein Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkisi	66
4.3.5. UDKA Tedavisinin Fibronektin Protein Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkisi	66
4.4. Histopatolojik Değerlendirme	68
4.4.1. UDKA Tedavisinin Kavernozal Doku Morfolojisi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	68
4.4.2. UDKA Tedavisinin Kavernöz Dokuda Diyabet ile İndüklenen Histopatolojik Değişiklikler Üzerine Etkisi	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	71
6. KAYNAKLAR	82
EKLER	96
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	97
ÖZGEÇMİŞ	99

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Kullanılan alet ve cihazlar	40
Tablo 2. Kullanılan kimyasallar	42
Tablo 3. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar	43
Tablo 4. Kullanılan kitler	43
Tablo 5. Kullanılan çözelti ve tamponlar	44
Tablo 6. Deney grupları ve tedavi protokolleri	45
Tablo 7. Deney gruplarına ait ortalama vücut ağırlıkları	54
Tablo 8. Deney gruplarına ait ortalama açlık kan glukoz düzeyleri	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	İnsan penis dokusunun anatomik yapısı	3
Şekil 2.	İnsanda penil ereksiyon fizyolojisi	5
Şekil 3.	Ereksiyon sırasında kan akışı ve intrakorporeal basınç değişiklikleri	6
Şekil 4.	İnsan penis dokusunda ereksiyonun nörofizyolojik kontrolü	8
Şekil 5.	Penil düz kas kasılma mekanizması	10
Şekil 6.	Penil düz kas gevşeme mekanizması	13
Şekil 7.	Erektile Disfonksiyon Sınıflandırılması	15
Şekil 8.	Penil dokunun farklı kısımlarında meydana gelen fibrozisin temsili görüntüsü	18
Şekil 9.	Diyabetik erektil disfonksiyon patofizyolojisi	21
Şekil 10.	Hipergliseminin fibrozis üzerine etkisi	28
Şekil 11.	TGF-β1'in Smad bağımlı ve Smad bağımsız yollar aracılığıyla meydana getirdiği fibrozis	31
Şekil 12.	Hiperglisemi aracılı TGF-β sinyal yolağı aktivasyonu	32
Şekil 13.	Ursodeoksikolik Asidin kimyasal yapısı	35
Şekil 14.	Ursodeoksikolik asidin TGF-β1/Smad sinyal yolağı üzerindeki hedefleri	38
Şekil 15.	Deney metodolojisi	45
Şekil 16.	Deney protokolü süresince deney gruplarına ait ortalama vücut ağırlık değişimleri	55
Şekil 17.	Deney protokolü süresince deney gruplarına ait açlık kan glukoz düzeyi değişimleri	56
Şekil 18.	Deney gruplarının elektriksel stimülasyonlar öncesi bazal İKB (mmHg) değerleri	57
Şekil 19.	Deney gruplarının elektriksel stimülasyonlar öncesindeki OAB (mmHg) değerleri	57
Şekil 20.	Kavernöz sinirlerin 1 dk boyunca 8 voltluk stimülasyon sırasında kaydedilen OAB ve İKB değerleri	58

Şekil 21.	Kavernöz sinirlere 1'er dk boyunca uygulanan a) 1 volt, b) 4 volt ve c) 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar ile elde edilen m-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması	59
Şekil 22.	Kavernöz sinirlere 1'er dk boyunca uygulanan a) 1 volt, b) 4 volt ve c) 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar ile elde edilen t-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması	60
Şekil 23.	Deney gruplarına ait a) TGF- β 1 & β -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; b) TGF- β 1 protein ekspresyonu için yapılan dansitometrik analiz sonuçları	61
Şekil 24.	Deney gruplarında a) Smad2, Smad3 ve β -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; b) Smad2 ve c) Smad3 protein ekspresyonları için yapılan dansitometrik analiz sonuçları	63
Şekil 25.	Deney gruplarında a) pSmad2 (Ser465/467) ve β -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; b) pSmad2 protein ekspresyon seviyeleri ve c) pSmad2/Smad2 oranları için yapılan dansitometrik analiz sonuçları	64
Şekil 26.	Deney gruplarında a) Smad7 & β -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; b) Smad7 protein ekspresyonu için yapılan dansitometrik analiz sonuçları	65
Şekil 27.	Deney gruplarında a) CTGF & β -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; b) CTGF protein ekspresyonu için yapılan dansitometrik analiz sonuçları	66
Şekil 28.	Deney gruplarında a) Fibronektin & β -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; b) Fibronektin protein ekspresyonu için yapılan dansitometrik analiz sonuçları	67
Şekil 29.	Deney gruplarındaki sıçanların kavernöz dokularındaki a) bağ doku ve kolajen artışı ile b) düz kas hücre kaybının değerlendirilmesi	70

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. <i>İn vivo</i> OAB ölçümü a) Supin pozisyonu, b) Sol karotid arterin tespiti ve kraniyal ucunun ligasyonu, c) 22-G enjektör ucu ile karotid artere girilmesi, d) PE-50 kanülün karotid artere yerleştirildikten sonra sabitlenmesi.	47
Resim 2. <i>İn vivo</i> İKB ölçümü. a) MPG ve kavernöz sinirin şematik gösterimi, b) Sağ MPG ve kavernöz sinirin tespiti, c) İskiokavernöz kasın eliminasyonunu takiben tunica albuginea ile sarılı olan sağ korpus kavernozumun tespiti, d) PE-50 kanülün korpus kavernoza yerleştirilmesi, e) Çevre dokulardan izole edilmiş sağ kavernöz sinirin stimülatöre bağlı olan platin bipolar elektrodlar üzerinde sabitlenmesi, f) Elektriksel stimülasyon sırasında İKB ölçümünün alınması.	48
Resim 3. Deney gruplarındaki sıçanlara ait kavernöz doku kesitlerinin mikroskop altındaki histopatolojik görünümü.	68

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ACh	Asetilkolin
AGEs	Gelişmiş glikasyon son ürünleri
ALK5	Aktivin reseptör benzeri kinaz 5
AMP	Adenozin monosfat
ATP	Adenozin trifosfat
Ang-II	Anjiotensin-II
BAP	Bilimsel Araştırma Projesi
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
Co-Smad	Common-partner Smad
CTGF	Bağ dokusu büyüme faktörü
DAG	Diaçilgliserol
Diyabet	Diabetes mellitus
dl	Desilitre
dk	Dakika
ED	Eretil disfonksiyon
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
ESM	Ekstraselüler matriks
ET	Endotelin
g	Gram
GMP	Guanozin monofosfat
GTP	Guanozin trifosfat
Hz	Hertz
IP3	İnositol trifosfat
I-Smad	İnhibitör Smad
İKB	İntrakavernöz basınç
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
i.p.	İntraperitoneal
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram

KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
KVOD	Korporeal venö-oklüzif disfonksiyon
LAP	Latens ilişkili peptid
LTBP	Latent TGF- β Bağlayıcı Protein
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
mg	Miligram
m-İKB	Maksimum intrakavernöz basınç
MLCK	Miyozin hafif zincir kinaz
MLCP	Miyozin hafif zincir fosfataz
ml	Mililitre
μm	Mikrometre
mmHg	Milimetre civa
mM	Milimolar
MMP	Matriks metalloproteinaz
mRNA	Messenger ribonükleik asit
MPG	Major pelvik gangliyon
MPOA	Medial preoptik alan
msn	Milisaniye
MTB	Masson trikrom boyama
NA	Noradrenalin
NANK	Nonadrenerjik nonkolinerjik
NFκ-β	Nükleer faktör kappa-beta
nmol/l	Nanomol/litre
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
OAB	Ortalama arteriyel basınç
PAI-1	Plazminojen aktivatörü inhibitör-1
PDE5	Fosfodiesteraz 5
PDE5i	PDE5 inhibitörleri
PE-50	Polietilen-50
PGE1	Prostaglandin E1
PGE2	Prostaglandin E2

PI3K	Fosfoinositid-3-kinaz
PIP	Fosfatidilinositol bifosfat
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
PKG	cGMP'ye bağımlı protein kinaz
PLC	Fosfolipaz
pSmad	Fosforillenmiş Smad
PVÇ	Paraventriküler çekirdek
RAS	Renin Anjiotensin Sistemi
ROCK	Rho ilişkili protein kinaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
R-Smad	Reseptörle regüle edilen Smad
SARA	Smad Anchor For Receptor Activation
sGC	Solübl guanilat siklaz
Smad	Small mothers against decapentaplegic
Smurf-2	Smad ubiquitinasyon regülatör faktör-2
sn	Saniye
STZ	Streptozotosin
TA	Tunika albuginea
TβRI	TGF-β tip I reseptörü
TβRII	TGF-β tip II reseptörü
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü beta
TGR5	Takeda G protein kenetli reseptör 5
TIMP	Metalloproteinaz doku inhibitörü
t-İKB	Total intrakavernöz basınç
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-alfa
TSP-1	Trombospondin-1
TUDKA	Tauroursodeoksikolik asit
UDKA	Ursodeoksikolik asit
VIP	Vazoaktif intestinal polipeptid
V	Volt

Formüller

Ca^{+2}	Kalsiyum iyonu
K^{+}	Potasyum iyonu
NaCl	Sodyum klorür

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa



ÖZET

Diyabetik Sıçanlarda Gelişen Eretil Disfonksiyonda Ursodeoksikolik Asidin Etkileri

Diyabetin en yaygın komplikasyonlarından biri olan erektile disfonksiyon (ED), diyabetli erkeklerin yaklaşık %75'ini etkileyen küresel bir sağlık sorunudur. Ereksiyon fizyolojisinin önemli bir parçası olan NO/cGMP sisteminde meydana gelen disfonksiyon, peniste azalmış düz kas ve endotel hücre içeriği ile birlikte meydana gelen korporal doku fibrozisi diyabetik ED patofizyolojisinde kritik rol oynayan süreçlerdir. Birçok sitokin ve büyüme faktörünün erektile dokudaki fibrojenik sürece katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Transforme edici büyüme faktörü- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) ve TGF- $\beta 1$ ile aktive edilen bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) fibrozisin indüklenmesinde ana moleküller olarak kabul edilir. TGF- $\beta 1$ /Smad/CTGF sinyal yolağı, diyabetik ED patogeneğinde önemli bir fibrojenik yolaktır. Çalışmanın amacı, farklı dokularda TGF- $\beta 1$ /Smad sinyal yolağı aracılı antifibrotik etkisi gösterilmiş olan Ursodeoksikolik asit (UDKA)'ın diyabetik penil fibrozis ve ED üzerindeki olası etkilerini fonksiyonel ve moleküler düzeyde incelemektir. Araştırmada Spraque Dawley türü 48 adet erkek sıçan (8-10 haftalık) kullanıldı. Streptozotosin (STZ) ile oluşturulan diyabet sonrasında sıçanlara 20 ve 80 mg/kg olmak üzere iki farklı dozda gavaj yolu ile UDKA veya taşıyıcı (salin) uygulandı. Ardından intrakavernozal basınç (İKB) ile eş zamanlı ortalama arteriyel basınç (OAB) ölçüldü. Maksimum-İKB/OAB (m-İKB/OAB) ve total-İKB/OAB (t-İKB/OAB) oranları erektile fonksiyon ölçütü olarak değerlendirildi. Erektile dokuda histopatolojik analizler Masson Trikrom yöntemiyle yapılırken; TGF- $\beta 1$, fibronektin, pSmad2, Smad2/3, Smad7 ve CTGF protein ekspresyonlarındaki değişiklikler Western Blot yöntemiyle değerlendirildi. Diyabetik grupta m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB kontrol grubuna göre anlamlı azaldı. Diyabet nedeniyle azalan erektile fonksiyon 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi ile anlamlı önleildi. Diyabetik grupta TGF- $\beta 1$, fibronektin, pSmad2, pSmad2/Smad2 ve CTGF ekspresyonları kontrol grubuna göre anlamlı artarken, Smad7 seviyeleri anlamlı azaldı. UDKA tedavisi protein ekspresyonlarındaki artışı doz bağımlı şekilde önlerken; Smad7 ekspresyonunu dozdan bağımsız olarak anlamlı artırmıştır. UDKA tedavisi STZ ile indüklenen kavernoza fibrozisi de dozdan bağımsız şekilde anlamlı önledi. Sonuç olarak; UDKA, STZ ile indüklenen penil fibrozis ve ED üzerinde TGF- $\beta 1$ /Smad/CTGF sinyalizasyon inhibisyonu aracılığıyla koruyucu etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Fibrozis, Korpus kavernoza, Smad

ABSTRACT

Effects of Ursodeoxycholic Acid on Erectile Dysfunction in Diabetic Rats

Erectile dysfunction (ED) which is one of the most common complications of diabetes is a global health problem affecting approximately 75% of men with diabetes. Dysfunction in the NO/cGMP system, which is an important part of erection physiology, corporal tissue fibrosis together with decreased smooth muscle and endothelial cell content in the penis are processes that play a critical role in the pathophysiology of diabetic ED. Many cytokines and growth factors have been reported to contribute to the fibrogenic process in erectile tissue. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and connective tissue growth factor (CTGF) which is activated by TGF- β 1 are the main molecules for the induction of the fibrosis. TGF- β 1/Smad/CTGF is an important fibrogenic pathway in the pathogenesis of diabetic ED. The aim of the study is to investigate the possible effects of Ursodeoxycholic acid (UDCA), which has been shown to have an antifibrotic effect mediated by TGF- β 1/Smad signaling pathway in different tissues, on diabetic penile fibrosis and ED at functional and molecular level. 48 male Sprague Dawley (8-10 weeks) rats were used in the study. After streptozotocin (STZ) induced diabetes, UDCA (20 and 80 mg/kg) or vehicle (saline) was administered by gavage to the rats. Intracavernosal pressure (ICP) and mean arterial pressure (MAP) were measured simultaneously. Maximum-ICP/MAP (m-ICP/MAP) and total-ICP/MAP (t-ICP/MAP) ratios were evaluated as measures of erectile function. In erectile tissue, changes in TGF- β 1, fibronectin, pSmad2, Smad2/3, Smad7 and CTGF protein expressions were evaluated by Western blot while histopathological analysis are performed with Masson Trichrome. m-ICP/MAP and t-ICP/MAP were significantly decreased in the diabetic group compared to the control group. Decreased erectile function due to diabetes was significantly prevented with 20 and 80 mg/kg UDCA treatment. While TGF- β 1, fibronectin, pSmad2, pSmad2/Smad2 and CTGF expressions increased significantly in the diabetic group compared to the control group, Smad7 levels were significantly decreased. UDCA treatment prevented the increases in those protein expressions dose-dependently; significantly increased Smad7 expression dose-independently. It also significantly prevented STZ-induced cavernosal fibrosis, dose-independently. As a result; UDCA showed a protective effect on STZ-induced penile fibrosis and ED through inhibition of TGF- β 1/Smad/CTGF signaling.

Keywords: Corpus cavernosum, Diabetes, Fibrosis, Smad

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Eretil disfonksiyon (ED), erkek bireylerin öz saygısını, yaşam kalitesini ve kişisel ilişkilerini olumsuz yönde etkileyen yaygın bir hastalıktır. Prevalansı 60 yaşından küçük erkeklerde %20-40, 70 yaşından büyük erkeklerde ise %50-75 olarak bildirilen ED günümüzde yaşlanmakta olan nüfus için önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (1, 2). Yaklaşık %80'i organik nedenlerden oluşan ED patogenezi birçok faktörle ilişkilidir. Yaş, obezite, sigara ve alkol kullanımı, diabetes mellitus (diyabet), kardiyovasküler hastalık, depresyon, pelvik cerrahi operasyonu ve omurilik yaralanmaları ED'yi oluşturan önemli risk faktörleridir (1). Bunlar arasında diyabet, ED'nin en önemli nedenlerinden biri olarak gösterilmektedir (3). Diyabeti olan erkeklerde yaygın görülen ED yaşam kalitesini ciddi derecede etkileyen bir seksüel bozukluk olup (4); diyabeti olmayan erkeklere kıyasla diyabetli erkeklerde 4 kat daha fazla görülür. Son yıllarda, hem tip 1 hem de tip 2 diyabet prevalansının artmasıyla birlikte erkek fertilitésinin olumsuz yönde etkileneceği ve bunun da yaşam kalitesini düşüreceği öngörülmektedir (3, 5).

Diyabetin meydana getirdiği komplikasyonlar, tedavi ve bakım maliyetlerinin daha da artmasına, morbidite ve mortalite riskinde artışa yol açmaktadır (6). Kronik hiperglisemi sonucu gelişen mikro ve makrovaskülopatik komplikasyonlar arasında başlıca endotel disfonksiyonu, otonomik ve periferik nöropatiler bulunmaktadır (7). Ereksiyonun normal olarak gerçekleşmesi için, endotel, düz kas gibi intrakavernöz yapıların ve sinir terminallerinin bütünlüğünün korunmuş olması gerektiğinden diyabet varlığında erektile fonksiyonda bozulmalar meydana gelmektedir (8). Hayvan ve insanlardan elde edilen deneysel veriler, diyabetik penisteki vasküler ve nöral değişikliklerin ED'ye neden olan temel faktörler olduğunu göstermektedir. Ereksiyon sırasında penisin kasılma gevşeme dengesini sağlayan kavernoza düz kas hücreleri ile birlikte penisin yapısını koruyan ve ekstraselüler matriksin ana bileşenleri olan kolajen ve elastik lifler, diyabette meydana gelen vasküler ve nöral değişikliklerden etkilenen en önemli yapılardır (9, 10). Diyabetik kavernöz dokuda vasküler endotelyal veya nörojenik hasara bağı olarak gelişen bu yapısal deformasyonların yol açtığı fibrotik süreçler ED patogenezinde önemli rol oynamaktadır (11-14). Mevcut tedavi yöntemleri, diyabetik ED patofizyolojisindeki bazı faktörleri önlese de fibrotik süreçlerin mekanizması tam olarak aydınlatılamadığından bu süreci yönetmede etkisiz kalmaktadırlar (12, 15). Diyabetik penil dokuda meydana gelmiş olan fibrotik

değişimleri geriye döndürmek güç olduğundan, fibrotik değişim süreci sırasında erken başlanan önleyici tedaviler ile daha yüksek bir başarı elde edileceği öngörülmektedir (8).

Diyabetle ilişkili fibrotik süreçlere aracılık eden en önemli yollardan TGF- β 1/Smad2/3 yolağının karaciğer, akciğer, böbrek, kas ve kardiyak fibrozis patogenezi içinde önemli rolü olduğu yapılan deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır (15, 16). TGF- β 1 ile aktive edilen CTGF fibrotik süreci tetikleyen ana faktörlerinden biridir (17). TGF- β 1/Smad/CTGF sinyal yolağının diyabetik sıçanların korpus kavernozumundaki fibrozis indüksiyonunda rol oynadığı ve ED'ye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (18).

Diyabetik ED patofizyolojisinde rol oynayan vasküler, yapısal ve nörojenik birçok mekanizma nedeniyle mevcut tedaviler kavernöz dokunun yanıt verebilirliğinde etkili bir artış gösterememektedir. Bu nedenle tedaviye yanıtın artması için bu çoklu mekanizmalar üzerine birlikte etki eden yeni ilaç hedefleri ihtiyacı doğmuştur (19, 20). Herhangi bir endikasyon için halihazırda kullanılan bir ilacın farklı bir endikasyonda kullanılması yani ilaçta yeniden konumlandırma (drug repositioning), yeni ilaç keşfinin uzun sürmesi ve yüksek maliyetli olması sebebiyle son yıllarda giderek artan bir stratejidir (21). TGF- β 1/Smad/CTGF sinyal yolağının fibroziste kanıtlanan rolü ve son yıllarda çeşitli ilaçlar ve bileşikler tarafından inhibe edildiğinin gösterilmesi antifibrotik tedavide hem yeni ilaç keşfi hem de ilaçta yeniden konumlandırma kapsamında bu yolağın önemli bir hedef haline gelmesini sağlamıştır (13, 22). Ursodeoksikolik asit (UDKA)'ın, kalp ve karaciğer dokularında TGF- β 1/Smad sinyal yolağı inhibisyonu aracılığıyla fibrozis gelişimini önleyebildiği *in vitro* ve *in vivo* hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (23-26).

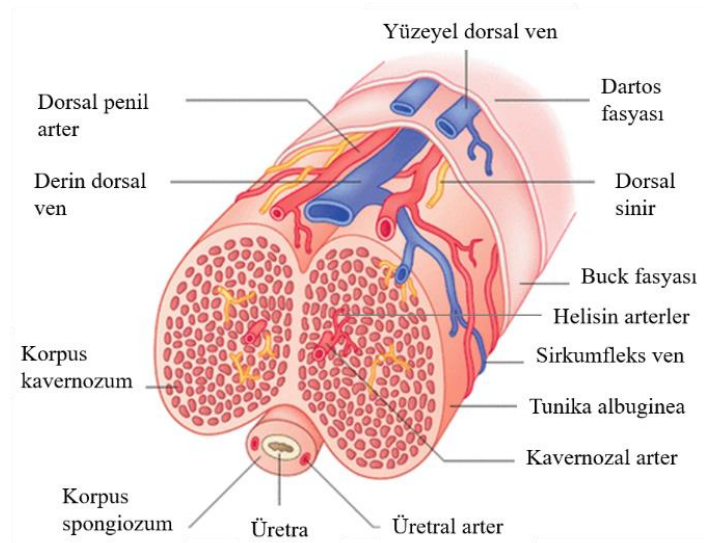
Bu tez çalışmasının amacı, başka dokularda TGF- β 1/Smad yolağı üzerinden antifibrotik etkileri gösterilmiş olan UDKA'nın streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik penil fibrozis modelinde, aynı yolak üzerinden kavernözal fibrozisi önleyici etkilerini fonksiyonel, moleküler ve histopatolojik düzeyde araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Penil Anatomi

Penis, erkeklerde cinsel ilişki ve idrar atımında görevli bir organdır. Her biri yoğun lifli bir kılıfla çevrelenmiş üç süngerimsi dokudan oluşan penis anatomik olarak skrotumun üzerinde bulunur ve iki ligament ile kasık simfizisine bağlıdır (27). Süngerimsi dokulardan ikisi, korpus kavernoza çifti olarak adlandırılıp, penisin dorsal kısmına paralel şekilde uzanmıştır. Korpus kavernoza, duvarlarında endotel ve düz kas hücreleri bulunan çok sayıda sinüzoidal boşluk içerir ve ereksiyon sırasında genişleyerek kanla dolan erektile dokudur. Korpus kavernoza sarmalayan tunika albuginea (TA) tabakası, penise desteklik sağlayan elastik fibröz kılıftır (27, 28). TA'nın elastikiyet özelliği, yapısında yaklaşık %5 oranında bulunan elastin proteininden ileri gelmektedir. Ereksiyon fizyolojisinde önemli yer tutan emisser venler TA'nın altında bulunan subtunika venöz pleksustan çıkarak TA'nın dış ve iç tabakası arasından korpus kavernoza giderler (29).

Penisin ventral kısmı boyunca üretrayı çevreleyen diğer süngerimsi doku ise korpus spongiosum'dur. Korpus spongiosum, glans penis oluşturmak için genişleyen distal ucu dışında, genellikle korpus kavernoza'dan daha küçüktür. Korpus spongiosumun süngerimsi dokusu ereksiyon sırasında kavernoza dokular kadar olmasa da kısmen genişler (28). Buna ek olarak, penise sertlik ve desteklik sağlayan TA'nın glans peniste bulunmaması, ereksiyon sırasında korpus spongiosum ve glans penisin sertleşmesini engelleyerek üretranın sıkışmamasını sağlar (Şekil 1) (29).



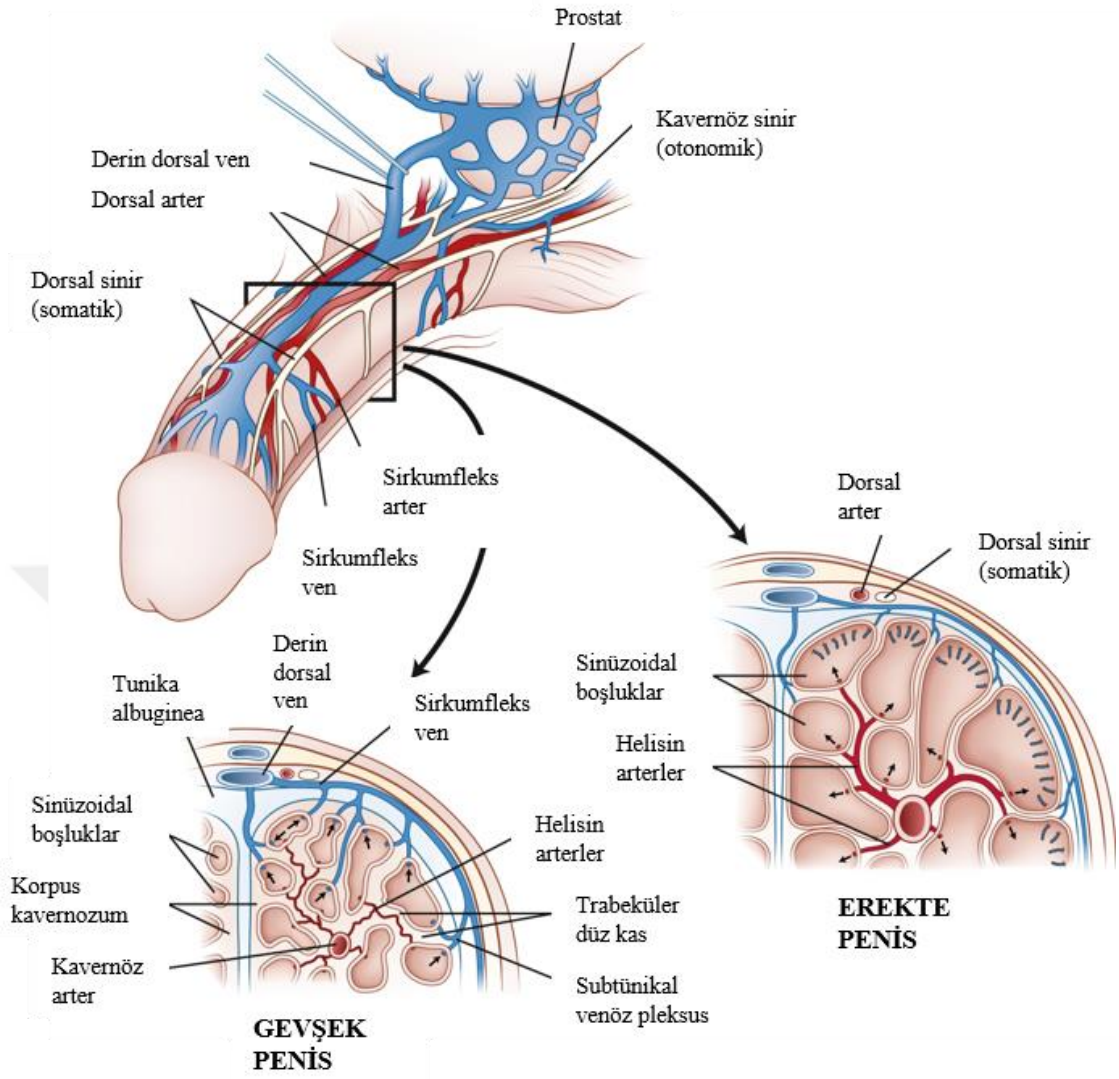
Şekil 1. İnsan penis dokusunun anatomik yapısı (Sidhu'dan, 30)

Penise arteriyel kan temini, her biri iç pudendal arterin bir dalı olan bilateral penil arterler aracılığıyla sağlanır. Dorsal arter ve kavernozaal arter olmak üzere penil arterin iki ana dalı vardır. Dorsal arter, penisin dorsal tarafı boyunca orta hattaki dorsal vene paralel olarak hareket ederek glans penise ve korpus spongiosuma kan akışını sağlarken, kavernozaal arter korpus kavernozaum içinde hareket ederek ereksiyonda görev alır. Kavernozaal arterden radyal olarak uzanan helisin arterler ereksiyon sırasında kavernozaal sinüzoidlerin kanla dolmasını sağlayan arter dallarıdır (28).

2.2. Penil Ereksiyon

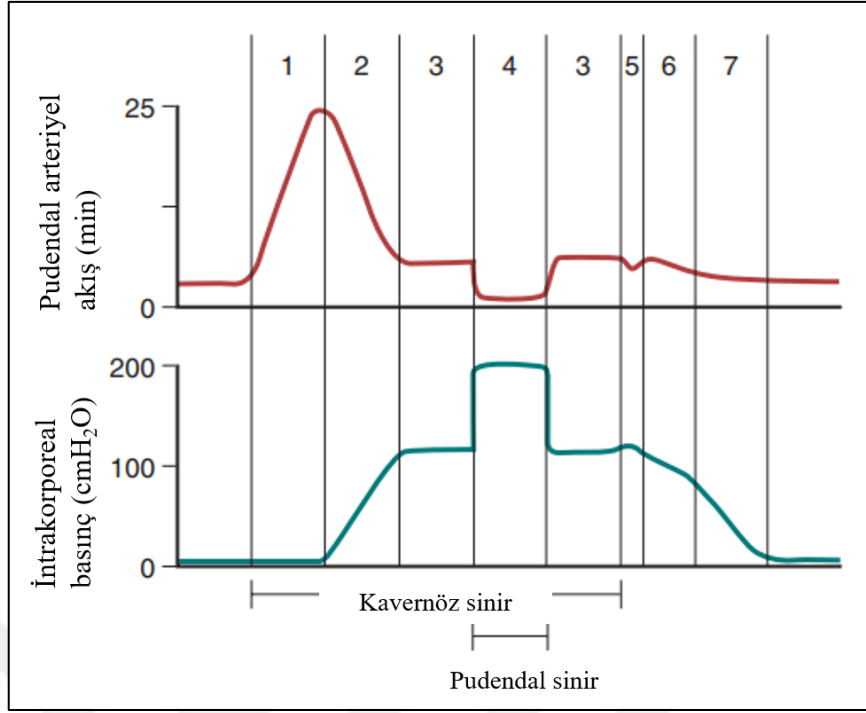
Penil ereksiyon, parasempatik nörotransmisyon, NO, elektrofizyolojik olaylar gibi nörovasküler olayların aracılık ettiği fiziksel düz kas gevşemesine dayalı hemodinamik bir süreçtir (15, 30). Nokturnal, refleksojenik ve psikojenik olmak üzere üç tip ereksiyon tanımlanmıştır. Nokturnal yani gece gelen ereksiyon, çoğunlukla hızlı göz hareketi (REM) uykusu sırasında meydana gelir. Refleksojenik ereksiyon, genital stimülasyonlarla oluşur. Psikojenik ereksiyon ise, koku, görsel ve işitsel uyaranların bir sonucudur (10, 27, 31).

Penisin gevşek ve erekte haldeki fizyolojisi Şekil 2’de gösterilmiştir (32). Ereksiyon sırasıyla; nörolojik olarak penise arteriyel kan akışının artması, kavernozaal düz kasın gevşemesi ve penisten venöz çıkışın kısıtlanması şeklinde üç süreçten oluşur (2). Cinsel uyarılma ile meydana gelen parasempatik uyarı sonucu korpus kavernozaumu besleyen kavernozaal arterler tarafından penise kan akışı sağlanır. Kan, merkezi kavernozaal arterlerden, sinüzoidleri besleyen helisin arterlere akar. Daha sonra, emisser venlerden sirkumfleks venlere gider ve derin dorsal ven içerisinde penise geri döner. Ereksiyonun sağlanması ve sürdürülmesi için peniste kanın geçici olarak tutulmasını sağlamak amacıyla bir veno-oklüzif mekanizma tanımlanmıştır. Ereksiyon sırasında trabeküler düz kas gevşemesi, korpus kavernozauma kan akışının artmasına ve korpus kavernozaum genişleyerek emisser venler ile subtunikal venüllerin baskılanmasına yol açar. Veno-oklüzyon işlemi sırasında emisser venler genişlemiş korpus kavernozaum tarafından sıkıştırıldıkça, penisteki kanı geçici olarak hapsederek ereksiyonun sürdürülmesine yardımcı olurlar (29, 33).



Şekil 2. İnsanda penil ereksiyon fizyolojisi (Bhasin'den, 32)

Penisin gevşek fazında, arteriyel damarlar daralmış, venöz damarlar baskılanmamıştır. Erekte fazda ise, trabeküler düz kaslarda ve arteriyel damarlardaki düz kas gevşemesi sinüzoidal boşlukları kanla doldurur. Genişleyen sinüzoidler, venöz pleksusu ve TA'dan geçen daha büyük damarları sıkıştırdıkça venöz çıkış düşer, böylece intrakavernöz basınç hızla artarak tam ereksiyon meydana gelir (34). Penil ereksiyon fazları Şekil 3'teki grafikte bölümler halinde gösterilmiştir (32).



Şekil 3. Ereksiyon sırasında kan akışı ve intrakorporeal basınç değişiklikleri: 0, flask; 1, latent; 2, tümesans; 3, tam ereksiyon; 4, sert ereksiyon; 5, detümesans başlangıcı; 6, yavaş detümesans; 7, hızlı detümesans (Bhasin'den, 32)

Penisin kanla dolup sertleşmesini sağlayan hemodinamik mekanizma temel olarak beş aşamaya ayrılmıştır:

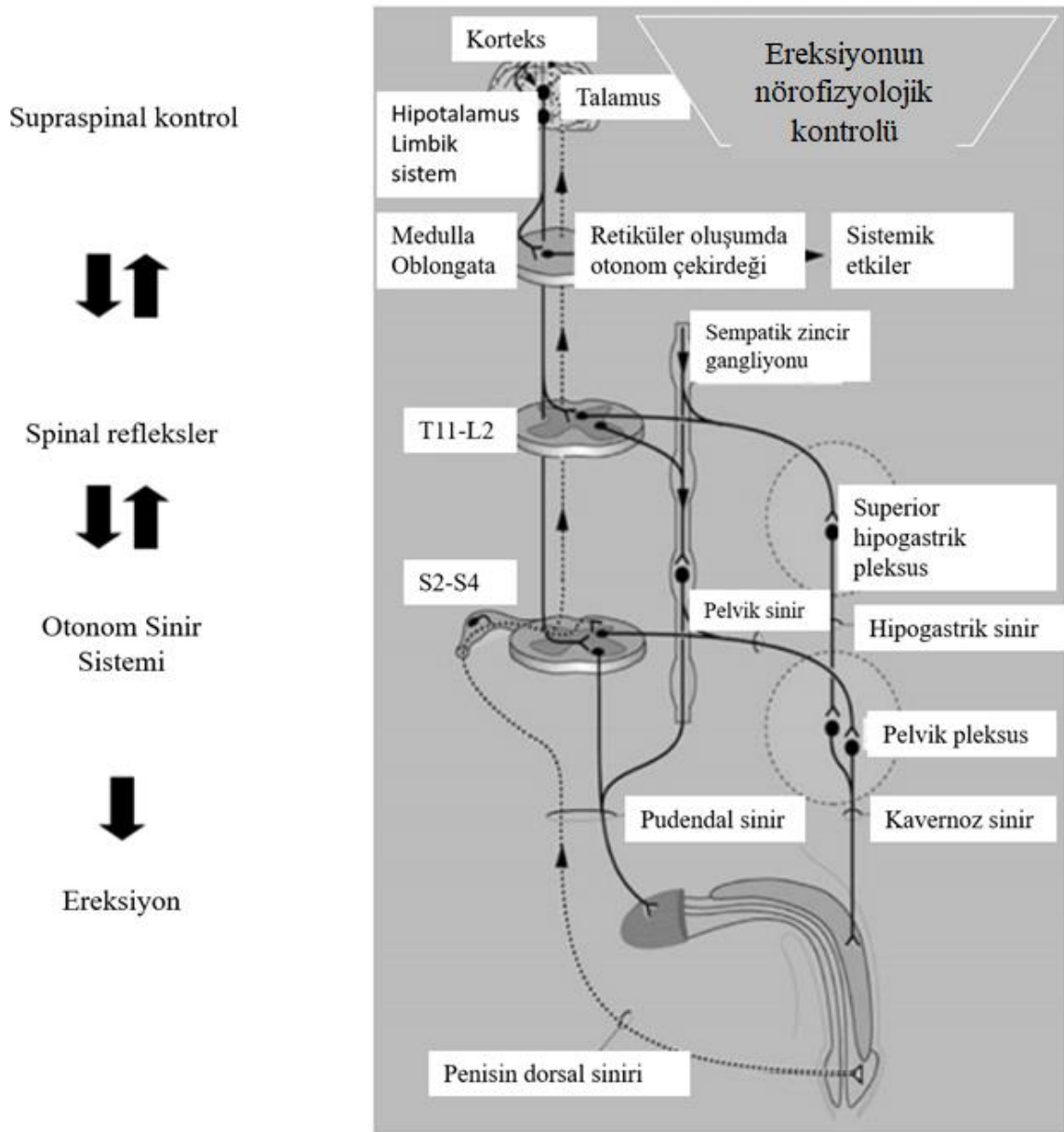
- I. Latent faz: Ereksiyonun ilk aşaması olarak arteriyel ve kavernoöz düz kasın gevşemesiyle ortaya çıkan fazdır. Bu fazda, vasküler direnç büyük ölçüde azalır ve kan, korpus kavernozumun sinüzoidlerine hızla akar. İntrakorporeal basınçta artış olmaz, penisin uzunluğu ve sertliğinde hafif bir artış olur.
- II. Tümesans: Bu fazda, kan akışı yüksek hızda devam eder ve korpus kavernozum içerisinde yüksek basınç oluşur. Bu basınç diyastolik basıncı aşmaya başladığında, sistol sırasında penise kan pompalanır.
- III. Tam ereksiyon fazı: Penise kan akışı devam eder ve sinüzoidleri doldurur. Sinüzoidler, TA tarafından kısıtlanana kadar genişlerler. Aynı zamanda, emisser venler yoluyla kan çıkışı kısıtlanır ve intrakavernoza basınç artar. Bu basınç ortalama sistolik basınç ile aynı olduğunda (yaklaşık 100 mmHg) tam ereksiyon meydana gelir. Bu aşamada kanın içeri ve dışarı akışı yaklaşık olarak eşittir ve intrakavernoza basınç sabit kalır.

- IV. Sert ereksiyon fazı: İskiokavernöz kasların kasılması penil sertliğe neden olur ve intrakavernozal basıncı sistolik kan basıncının üzerine çıkarır. Bu durum, kavernöz arterlerde kan akışının tersine dönmesine neden olabileceğinden kas yorgunluğu bu adımı sınırlayarak doku iskemisi riskini ortadan kaldırır.
- V. Detümesans: İskiokavernöz kasların gevşemesi ile başlayan bu faz, kavernöz düz kasın sempatik uyarı altında kasılması ile devam eder. Meydana gelen arteriyel vazokonstriksiyon nedeniyle geçici ve hafif bir intrakorporeal basınç artışı oluşur. Ardından kan sinüzoidal boşluklardan uzaklaşmaya başladığında yavaş bir basınç düşüşü olur. Son olarak, venöz çıkış kapasitesi taban çizgisine dönerken hızlı basınç düşüşü gerçekleşir. Penis küçülür, kısalır ve flask (sarkık, gevşek) duruma geri döner (32, 33).

2.2.1. Ereksiyonun Nörofizyolojik Kontrolü

Ereksiyonun nörofizyolojik kontrolü santral ve periferel düzeyde gerçekleşir (35). Ereksiyonu düzenleyen santral (merkezi) mekanizmalar supraspinal ve spinal düzeyde karmaşık bir yapıdadır (Şekil 4) (36). Merkezi sinir sistemi, çeşitli kaynaklardan (görsel, işitsel, dokunsal ve koku alma) gelen duyuşal uyarınları koordine eder (35). Limbik sistemde bulunan hipotalamus, nükleus akumbens, hipokampus, periaqueduktal gri ve mediyal amigdala, mediyal preoptik alan (MPOA), paraventriküler çekirdek (PVÇ) ve ventral tegmentum bölgeleri, hayvanlarda yapılan çalışmalara göre cinsel uyarılma için kontrol merkezleri olarak tanımlanmıştır (37). Sıçanlardan elde edilen verilerde, MPOA ve PVÇ içerisindeki hipotalamik nöronların, duyuşal uyarınları koordine etme mekanizmasına katkı sağladığı kanıtlanmıştır (35, 36, 38). Bu nöronların içerisinde dopamin ve oksitosin tarafından aktive edilen oksitosinerjik nöronların erkek sıçanlarda penil ereksiyona yol açtığı gösterilmiştir. PVÇ'de nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından nitrik oksit (NO) üretimine sekonder olarak oksitosin salınımı gerçekleşir. NO ve paraventriküler oksitosinerjik nöronlar arasındaki etkileşim, ereksiyonun santral düzenlenmesinde önemli bir mekanizmadır. Ereksiyonu uyarıan başlıca nörotransmitterler NO, ACh, dopamin, oksitosin ve serotoninidir (35, 39). Ereksiyonun santral kontrolünde rol oynayan dopamin santral sinir sisteminde PVÇ düzeyinde D2 reseptörleri aracılığıyla ereksiyonu kolaylaştırır (35, 36, 38). Serotonin ise HT1A reseptörü üzerinden ereksiyonu inhibe ederken, HT2C reseptörü üzerinden ereksiyonu uyarır (35, 39).

Penis, otonomik ve somatik sinirlerle inerve edilir. Otonomik bileşenlerden sempatik (T11-L2) ve parasempatik (S2-S4) sinirler, ereksiyon ve detümesans sırasında korpus kavernozum, korpus spongiozum ve glans penise giren kan akışını düzenlemek için kavernoöz sinirleri oluşturmak üzere pelviste birleşirler (40). Bu sinirler, nitrik oksitin kavernoza düz kasa iletilmesinden sorumludur (31). Somatik bileşen olarak bilinen pudental sinir ise, penil duyudan ve ekstrakorporeal çizgili kasların (bulbokavernöz ve iskiyokavernöz) kasılması ve gevşemesinden sorumludur (40).



Şekil 4. İnsan penis dokusunda ereksiyonun nörofizyolojik kontrolü (Stief'den, 36)

Ereksiyonun periferik kontrolü, peniste vasküler olayları etkileyen nöronal ve lokal faktörlere bağlıdır (35). Penisin farklı bölgeleri, otonomik (sempatik ve parasempatik) ve somatosensoriyel innervasyon alır (10). Omuriliğin sakral segmentinden (S2-S4) başlayan ve primer duyuşal ve motor lifler içeren pudental sinirler ile pelvik pleksustan çıkan sempatik, parasempatik ve nonadrenerjik nonkolinerjik (NANK veya nitreerjik) lifleri içeren kavernoöz sinirler penisin farklı bölümlerini inerve eder (35, 37, 40). Adrenerjik, kolinerjik ve NANK sinir lifleri tarafından salıverilen nörotransmitterler vasküler endotelyum ve korpus kavernozumun düz kas bileşenlerini etkileyerek erektile fonksiyonu modüle eder (35). Ereksiyon, parasempatik ve NANK sistem aracılığıyla salıverilen asetilkolin (ACh) ve NO ile stimüle edilirken, sempatik sistem aracılığıyla salıverilen noradrenalin (NA) ile de inhibe edilir. Özetle, cinsel uyarılma, hem artan parasempatik aktivitenin hem de azalan sempatik aktivitenin sonucudur (35, 41).

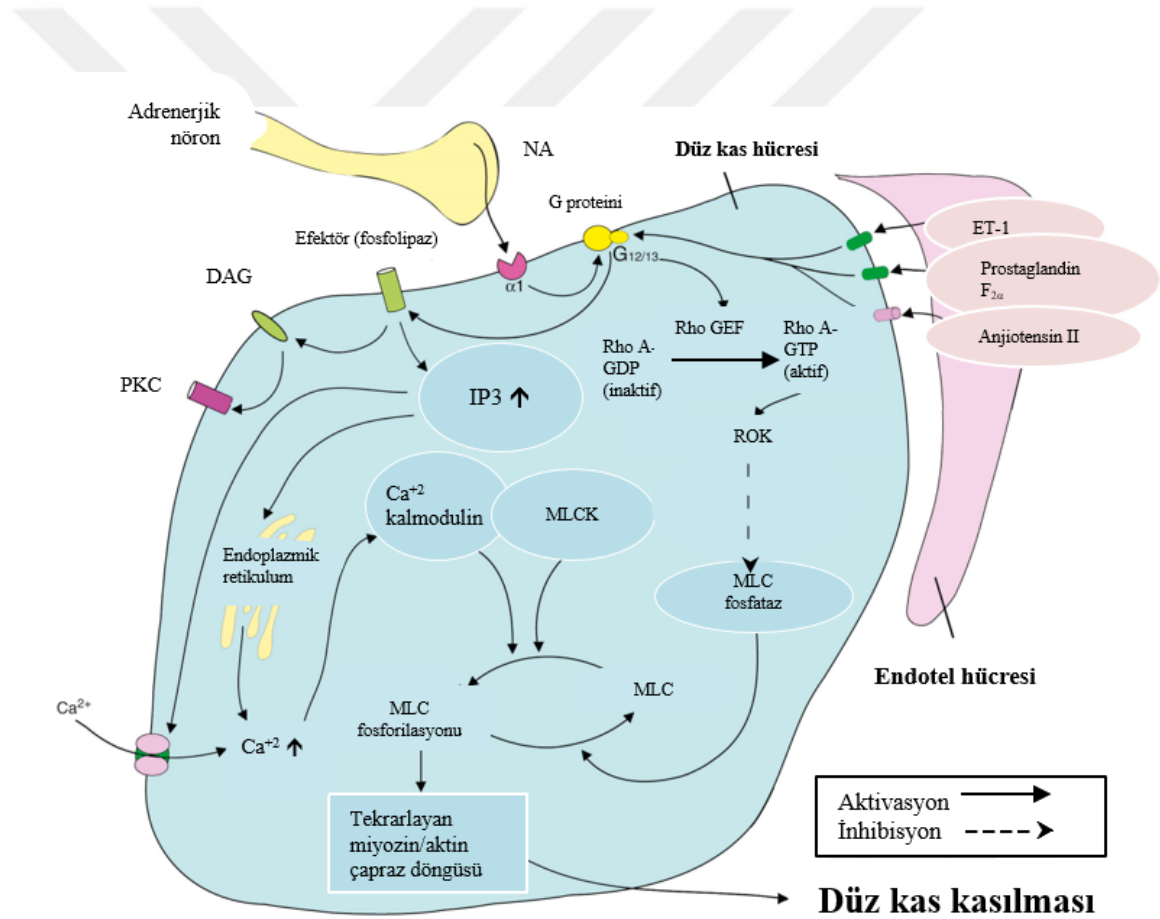
2.2.2. Ereksiyonun Moleküler Süreçleri

Penil ereksiyon, hücre dışı, hücre içi ve hücreler arası mekanizmaların aracılık ettiğı fizyolojik bir süreçtir. Hem merkezi sinir sistemi hem de periferik sinir sistemi, penil ereksiyonun temel düzenleyicileridir (42). Cinsel uyarı, korpus kavernozum duvarındaki düz kasların gevşemesini sağlayan NO gibi birtakım nörotransmitterlerin salınımına neden olur. Sinüzoidlerin kanla dolumu ve genişlemesi sonucu, tonik olarak kasılmış kavernoözal düz kasların gevşemesi ile penil ereksiyon gerçekleşir (30, 42).

Korpus kavernozumun düz kas hücreleri normalde tonik olarak kasılmış haldedir. Korporal düz kasın spontan kasılmaları sarkoplazmik retikulumdan periyodik olarak Ca^{2+} salan bir sitozolik Ca^{2+} osilatörü tarafından gerçekleştirilir. Çeşitli nörotransmitterler veya hormonlar bu osilatörü modüle ederek düz kas fonksiyonunun korunmasında görev alır (39). Penil dokunun kasılmasına katkı sağlayan en önemli nörotransmitterler Noradrenalin (NA) ve Endotelin (ET)'lerdir. Adrenerjik sinirlerden salınan NA, kasılmayı indüklemek için penil damarlardaki adrenoseptörler ($\alpha1$ ve $\alpha2$) ve korpus kavernozumun trabeküler düz kaslarını uyarır (Şekil 5). Endotelin-1 (ET-1), korpus kavernozum ve penil damarlardaki uzun süreli kasılmalardan sorumlu en güçlü kontraktile ajandır ve kavernoözal düz kas tonusunun korunmasına katkıda bulunur. ET-2 ve ET-3 ise, penil kontraksiyonda ET-1'den daha az etkilidir (35).

Penil düz kas kasılması, sitozolik kalsiyum konsantrasyonu ve RhoA proteini ile aktive olan Rho kinaz (ROCK) sinyalizasyonu tarafından kontrol edilir (10, 37, 39). NA ve

ET-1 çeşitli mekanizmalarla intraselüler kalsiyum konsantrasyonu artışına yol açarak kasılmaya aracılık ederler (39). NA ve ET-1, düz kas hücre membranında fosfolipaz C (PLC) enzimi aktive eder. Bu aktivite, fosfatidilinositol bifosfat (PIP)'ı, inositol trifosfata (IP3) ve diasilgliserol (DAG)'a dönüştürür. IP3, sarkoplazmik retikulum gibi hücre içi depolardan kalsiyum salınımını uyarırken, DAG, düz kas hücre membranındaki protein kinaz C'yi (PKC) uyararak hücre dışından hücre içine kalsiyum akışını sağlar. Artan kalsiyum iyonları, kalmoduline bağlanarak miyozin hafif zincir kinaz (MLCK)'ı aktive eder. MLCK aktivasyonu, miyozin hafif zincirlerinin (MLC) fosforilasyonunu sağlayarak düz kas kasılmasına yol açar (Şekil 5) (35, 37).



Şekil 5. Penil düz kas kasılma mekanizması (Alan'dan, 39)

NA ve ET-1, kendi reseptörlerine bağlandıklarında RhoA-ROCK sistemini de aktive ederler. ROCK, kontraktileteye aracılık eden bir serin treonin kinaz enzimi olup; aktive olmasıyla miyozin hafif zincir fosfatazı inhibe eder. Miyozin hafif zincirlerinin fosforile

olması, onları hücre içi kalsiyuma duyarlı hale getirir ve kontraksiyon meydana gelir (35, 37).

Diğer önemli kasılma faktörleri, sinir uçları tarafından salınan nöropeptid Y (NPY), vasküler endotelyumdan salınan prostanoidler ($\text{PGF}_{2\alpha}$) ve tromboksan A2 (TXA_2) ve penil dokuda sentezlenen Anjiyotensin II (Ang II) 'dir (35, 43).

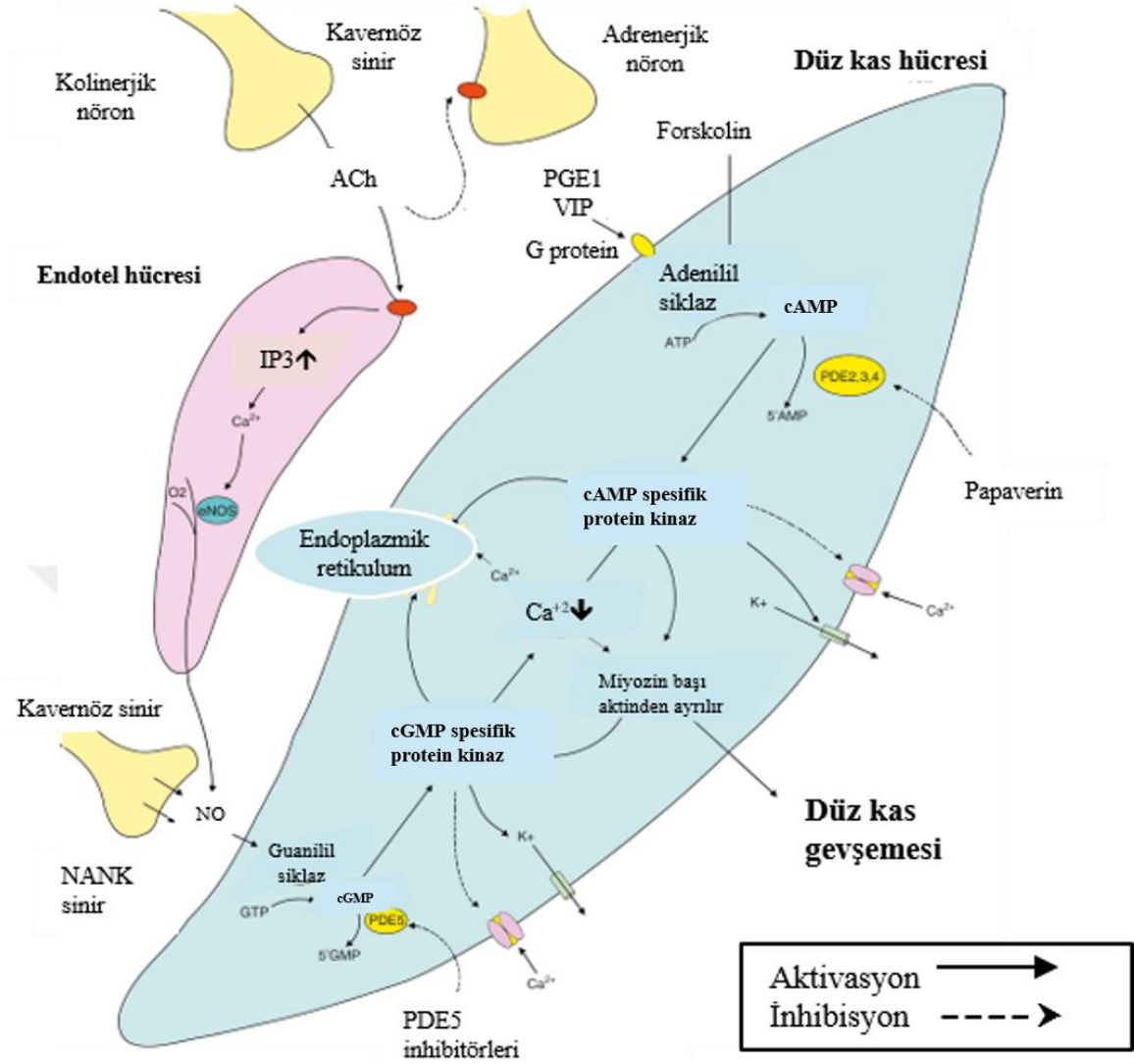
Penil ereksiyonda düz kas gevşemesine aracılık eden başlıca nörotransmitter, nitreerjik nöronlardan ve endotelden salınan NO'dur (39). Parasempatik sinir uçlarından salınan bir diğer önemli nörotransmitter olan ACh ise hem korpus kavernozumun vasküler endotelyumundan NO salınımını uyararak; hem de adrenerjik nöronlarda presinaptik reseptörlere bağlanarak NA salınımının inhibisyonu yoluyla penil düz kas gevşemesine katkıda bulunur (35, 39).

Peniste NO kaynağı parasempatik sinir uçları ve asetilkolin ile uyarılan korporal kan damarlarının ve sinüslerin endotelidir (35). Hem endotel hücrelerde hem de sinir uçlarında NOS enzimi aracılığıyla L-arginin ve O_2 'den L-sitrülin ve NO sentezlenir. Üç farklı NOS izoformu tanımlanmıştır; nöronal (nNOS), endotelyal (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS). nNOS ve eNOS, sırasıyla otonom sinirlerde ve korpus kavernozumun endotelyumunda daha çok eksprese edilirken, iNOS penil dokunun tüm hücre tiplerinde eksprese edilir (35, 44). NANK sinirlerde nNOS aracılı üretilen NO'nun ereksiyonun başlamasından sorumlu olduğu, buna karşılık shear stres ile aktive edilen eNOS aracılı NO'nun ereksiyonun sürdürülmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (35, 39).

Cinsel uyarılara yanıt olarak parasempatik sinirlerden ve endotelyal hücrelerden salınan NO, düz kas hücre zarını geçer ve sitoplazmada solübl guanilat siklaza (sGC) bağlanır. NO'nun sGC'ye bağlanması ile, guanozin trifosfat (GTP) siklik guanozin monofosfata (cGMP) dönüşür (35, 44). NO-sGC-cGMP yolağı, histamin, östrojen, insülin, kortikotropin salgılatıcı hormon, nitrovazodilatörler ve asetilkolin gibi birçok endotel bağımlı vazodilatörün vazorelaksasyon etkisinden sorumludur (39). cGMP'ye bağımlı protein kinazın (PKG) aktivasyonu ile hedef proteinler fosforile olur (35). PKG, 2 farklı genden türetilmiştir: tip I ve tip II. Düz kasta sadece PKG-I eksprese edildiğinden ereksiyon fizyolojisi için PKG-I önemlidir. PKG-I, kalsiyum salınımını ve ardından düz kas gevşemesini engellemek için IP_3 reseptörünü ve reseptörle ilişkili sGK substratını fosforile eder (2). Bu hedef proteinlerin fosforilasyonu sonucu düz kas hücre membranındaki potasyum kanalları yoluyla membran hiperpolarizasyonu ve ardından Ca^{2+} 'un endoplazmik

retikuluma alımında artış meydana gelir. Hiperpolarizasyon, membran Ca^{2+} kanallarını bloke ederek kalsiyum akışını azaltır ve düz kas hücre gevşemesine neden olur (7). Buna ek olarak NO-sGC-cGMP sinyalizasyonunun aktivasyonu, PLC aracılı IP3 üretimi, IP3 reseptör aktivitesi, RhoA/ROCK yolağı inhibisyonu ve ET'nin vazokonstrüktif aktivitesinin bozulması gibi birtakım mekanizmalar yoluyla da hücre içi kalsiyumu azaltır (39). Sonuçta, Ca^{2+} /kalmodulin kompleksinde bir azalma, akabinde azalmış bir miyozin hafif zincir kinaz aktivitesi ile fosforile miyozin hafif zincir seviyeleri ve aktin/miyozin çapraz köprülerinin bozulması meydana gelerek kavernoza düz kas gevşemesi gerçekleşir (Şekil 6) (35).

Parasempatik sinir uçları tarafından salınan Vazoaktif intestinal polipeptidi (VIP) ve kalsitonin geni ile ilgili peptid (CGRP), endotel tarafından salınan prostaglandin E1 ve E2 (PGE1, PGE2) gibi prostanoidler kavernoza düz kas gevşemesine katkıda bulunan diğer maddelerdir. PGE1, kavernoza düz kas üzerine hem doğrudan gevşetici bir etki uygular hem de adrenerjik sinirlerden NA salınımının inhibisyonu yoluyla proerektil bir aktivite gösterir. VIP, PGE1 ve PGE2 spesifik reseptörleri ile etkileşimin ardından, adenilat siklazı aktive ederek adenosin trifosfatı (ATP) siklik adenosin monofosfata (cAMP) dönüştürürler (Şekil 6). cAMP, sitozolik kalsiyum seviyelerini düşüren başka bir hücre içi ikinci haberci olarak etki eder. İlgili protein kinazın (PKA) aktivasyonu yoluyla K^+ kanallarının açılmasına yol açar ve plazma membranında hiperpolarizasyona neden olarak voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının inhibisyonuna ve kalsiyumun hücreye girişinin azalmasına neden olur (35, 43, 44).



Şekil 6. Penil düz kas gevşeme mekanizması (Alan'dan, 39)

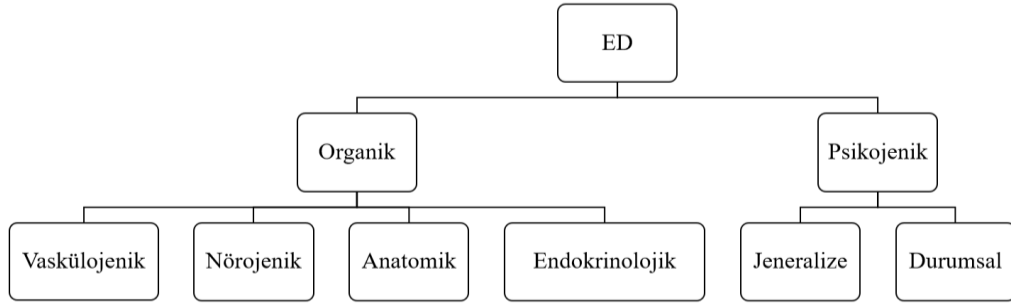
cAMP ve cGMP'yi inaktif metabolitlerine (sırasıyla adenosin monofosfat (AMP) ve guanosin monofosfat (GMP)) dönüştüren enzimler olan fosfodiesterazlar (PDE'ler) penil düz kas hücrelerinin kasılmasını veya gevşemesini belirlemek için erektil fonksiyonun düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar (35, 43). İnsanlarda toplam 11 tip fosfodiesteraz tanımlanmıştır. cGMP, tip 5, 6 ve 9 için tek substrattır. Fosfodiesteraz-5 (PDE-5), peniste cGMP hidrolizinden sorumludur (27). PDE-5, cGMP'yi hızla GMP'ye metabolize ederek yüksek sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarına ve düz kas kasılmasına neden olur (31). Bu enzimatik bozunma, yukarıda tarif edilen kaskadı sona erdiren önemli bir olaydır (35).

2.3. Erektıl Disfonksiyon

Erektıl disfonksiyon, orta yaş ve yaşlı nüfus arasında daha sık görülen kişisel, sosyal ve cinsel yaşamı ciddi oranda etkileyen bir halk sağlığı sorunudur. Cinsel istek, uyarılma, erektıl işlev ve boşalma/orgazm gibi tüm alanları etkiler. Bu nedenle, erken teşhis ve yönetimi son derece önemlidir (45). Erektıl disfonksiyon, tatmin edici bir cinsel birleşme için yeterli ereksiyonun sağlanamaması veya sürdürülememesi olarak tanımlanmaktadır. 60 yaşından büyük erkeklerin yaklaşık %50'sini etkileyen yaygın bir sorundur (42). Küresel ED prevalansı ortalaması %14 ile %48 arasında değişmekte olup, ABD ve Güney Doğu Asya'da Avrupa'dan daha yüksek oranlar söz konusudur (46). Amerika Birleşik Devletlerin'de 30 milyondan fazla erkekte görülmüş olup, gün geçtikçe kişilerin yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir (44). Massachusetts Erkek Yaşlanma Çalışması, 40 ila 70 yaş arasındaki erkek popülasyonunun % 50'sinde ED olduğunu öne sürmüştür (7). Türkiye'de ise 2002 yılında yapılan toplum bazlı bir çalışmaya göre, 40 yaşın üstündeki erkeklerde ED prevalansı %69.2 (hafif ED; %33.2, orta ED; %27.5, tam ED %8.5) olarak bulunmuştur (47). 1995 yılında dünya çapındaki ED prevalansı 152 milyon iken, önümüzdeki 25 yılda ED prevalansının önemli ölçüde artması ve 2025 yılına kadar 300 milyondan fazla erkeği etkilemesi beklenmektedir (44, 48).

Yaşlanma, omurilik yaralanması/sinir bozuklukları, uyku apnesi, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, böbrek yetmezliği, kavernoza fibrozis, Peyronie hastalığı ED'ye neden olan major etiyolojik faktörler arasında yer alır (45). Ayrıca kardiyovasküler komorbiditeler (hipertansiyon, hiperlipidemi), diyabet, obezite, metabolik sendrom, depresyon, sigara kullanımı ED ile ilişkili olduğu gösterilmiş önemli risk faktörleridir (42). Bunlar ek olarak, endokrin bozukluklar, radikal prostatektomi gibi cerrahi girişimler, Parkinson ve Alzheimer hastalığı, multipl skleroz ve omurilik hasarları da ED için önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır (49, 50). Alkolizm, yasadışı uyuşturucu kullanımı ve β -blokörler, diüretikler, antidepresanlar gibi farmakolojik ajanların da ED etiyolojisinde rol oynadığı öne sürülmüştür (7).

Erektıl disfonksiyon, erektıl süreç dışı bir nedene (diyabetik, iyatrojenik, travmatik) ya da erektıl sürecin nörovasküler mekanizmasına (ereksiyona başlayamama, penisi kanla dolduramama ve depolama başarısızlığı) göre sınıflandırılmıştır. Uluslararası İmpotans Araştırmaları Derneği tarafından önerilen ED sınıflandırması Şekil 7'de gösterilmiştir (10).



Şekil 7. ED Sınıflandırılması (Dean'dan, 10)

Eretil disfonksiyondan sorumlu psikolojik faktörler arasında stres, depresyon, performans kaygısı, obsesif kompulsif bozukluk ve kişilerarası çatışma yer almaktadır (51). Beyin tarafından spinal ereksiyon merkezinin doğrudan inhibisyonu ve penil düz kas tonusunu artırabilen aşırı sempatik çıkış veya yüksek periferik katekolamin seviyelerinin psikojenik ED patofizyolojisinde etkili iki mekanizma olduğu bildirilmiştir (10).

Eretil disfonksiyonun %10 ila 19'unun nörojenik kökenli olduğu tahmin edilmektedir (10). Ereksiyon, nörovasküler bir olay olması sebebiyle, beyni, omuriliği, kavernöz ve pudental sinirleri etkileyen herhangi bir hastalık veya kavernöz sinir hasarı riski taşıyan radikal prostatektomi gibi cerrahi operasyonlar eretil işlev bozukluğuna neden olabilmektedir. Ereksiyon için önemli olan MPOA, PVÇ ve hipokampus bölgelerindeki tümörler, travma, Parkinson, Alzheimer hastalığı, felç, ensefalit gibi patolojik süreçler sıklıkla ED ile ilişkilidir (10, 50). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, alkolizm, vitamin eksikliği ve diyabetin, kavernöz sinir terminallerini etkileyerek nörotransmitter eksikliğine neden olabileceği bildirilmiştir. Diyabetiklerde, nörojenik ve endotel bağımlı gevşemenin bozulması, yetersiz NO salınımına neden olarak eretil yanıtı değiştirir (10).

Endokrinolojik ED patofizyolosinde başta testosteron olmak üzere, prolaktin ve tiroid hormonları önemli rol oynar. Testosteron, hem santral hem de periferik mekanizmalar yoluyla cinsel işlevi ve ereksiyon fizyolojisini düzenleyen önemli bir androjendir (50, 52). Periferik düzeyde, NOS üretimini ve endotel bağımlı hiperpolarizasyon faktörlerini uyarak vazorelaksasyona aracılık eder. Hayvan çalışmalarında, testosteron yoksunluğunun korporal seviyede endotel hücre apoptozisinin artmasına, eNOS ve NO üretiminin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (52). Serebral düzeyde, testosteron, pro-eretil nörotransmitterlerin sentezini, depolanmasını ve

salınmasını uyarır (11). Hipotalamik-hipofiz eksenindeki herhangi bir işlev bozukluğu nedeniyle dolaşımda meydana gelen testosteron yokluğu cinsel dürtü ve işlevi tehlikeye atarak ED gelişimine yol açar (10, 39, 52).

Eretil disfonksiyona neden olan patojenik mekanizmalar arasında en yaygın olanı vasküler etiyolojidir. Vaskülojenik ED, arteriyel ve kavernözal yapısal birtakım bozukluklardan oluşur. ED’de etkili olan hemodinamik değişiklikler, penil kan akışını etkileyebilecek ve hem makro hem de mikro arteriyel dolaşımı bozabilecek kronik veya travmatik bozukluklardan kaynaklanır (7, 27, 46). Arteriyojenik ED, azalmış arteriyel kan akışı ve dolayısıyla azalmış perfüzyon basıncı nedeniyle meydana gelir. Bu durum, peniste maksimum sertliğin azalmasına ve tam ereksiyona geçişte gecikmeye yol açar (37). Arteriyojenik ED’de korpus kavernozuma giden kandaki oksijen geriliminin az olmasından kaynaklanan kronik hipoksi, düz kas içeriğinin azalmasına, TGF- β üretiminin artmasına ve korporal dokuda tip I ve III kolajen üretiminin artmasına neden olur (39). Arteriye yetmezlik, travmalardan veya doğum anomalilerinden kaynaklanabilmesine rağmen, çoğu durumda arteriyojenik ED, jeneralize ateroskleroz sürecinin bir parçasıdır. Ayrıca, diyabet, koroner hastalık ve hipertansiyonda görülen periferik arter hastalığı ve endotel disfonksiyonu da vakaların çoğunda görülen arteriyojenik ED gelişimine neden olur (7, 46). Montorsi ve ark.ları, 300 koroner arter hastasında ED prevalansının %49 olduğunu göstermişlerdir. Hastaların %67’si koroner arter hastalık teşhisinden ortalama 38 ay önce ED şikayeti ile geldiklerini bildirmişlerdir (37). Penil arterler koroner arterlerden daha küçük olduğu için, klinik kalp hastalığı ortaya çıkmadan önce peniste endotel disfonksiyonunun meydana geldiği düşünülmektedir (39). Bu nedenle, ED olarak ortaya çıkan kavernözal arter vaskülopatisinin, gelecekteki kalp hastalığının erken habercisi olabileceği öngörülmektedir (37).

Korporal veno-okluzif mekanizmanın bozulması, vaskülojenik ED’nin en yaygın nedenlerinden biridir. Dejeneratif TA değişiklikleri, fibroelastik yapısal değişiklikler, yetersiz trabeküler düz kas gevşemesi ve miyojenik venöz yanıtların kaybı gibi çeşitli patofizyolojik süreçler veno-okluzif disfonksiyona neden olabilmektedir. TA’da yaşlanma, diyabet gibi problemler nedeniyle oluşan dejeneratif değişiklikler subtunikal ve emisser venlerin kompresyonunu bozarak vaskülojenik ED’ye yol açar (7, 27, 39, 46).

Penil ereksiyonda rol oynayan nörovasküler sürecin bozulması veya penil düz kas yapısındaki ve işlevindeki değişiklik ED ile sonuçlanmaktadır. Yapılan araştırmalar, bu

değişikliklere dahil olan birkaç moleküler yolak tanımlamıştır (2). Ereksiyona ulaşma ve sürdürme için gerekli olan arteriyel dilatasyon ve venöz oklüzyon oluşumunda NO-cGMP sistemi önemlidir. Bu vazodilatör sistemde endotel disfonksiyonuna bağlı meydana gelen bozukluk, ED patofizyolojisinde önemli bir rol oynar (53).

Çeşitli hastalıklarda oluşan endotel disfonksiyonu sonucu NO oluşumunda azalma veya NO oksidasyonunda artış meydana gelir. Bu işlev bozukluğu nedeniyle penis, kavernoza sinüzoidleri dolduracak ve yeterli ereksiyonu oluşturacak kadar perfüze olamaz. Bu nedenle diyabet, kardiyovasküler hastalık ve hipertansiyon gibi hastalıklarda meydana gelen endotel bağımlı vazodilatasyon eksikliği, ED ile ilişkilendirilir. NO ve ED'yi birbirine bağlayan bir diğer önemli süreç, NANK sinirlerinde hasar veya nNOS aracılı NO salınımında bozulma meydana gelmesidir (7). NO/cGMP/PKG yolağındaki herhangi bir dengesizlik, özellikle NO biyoyararlanımının azalması ED'yi indükler. NO substratında azalma, NOS düzensizliği, hızlandırılmış NO degradasyonu ve PKG-1 disregülasyonu NO biyoyararlanımının azalmasına neden olan faktörlerdir (2).

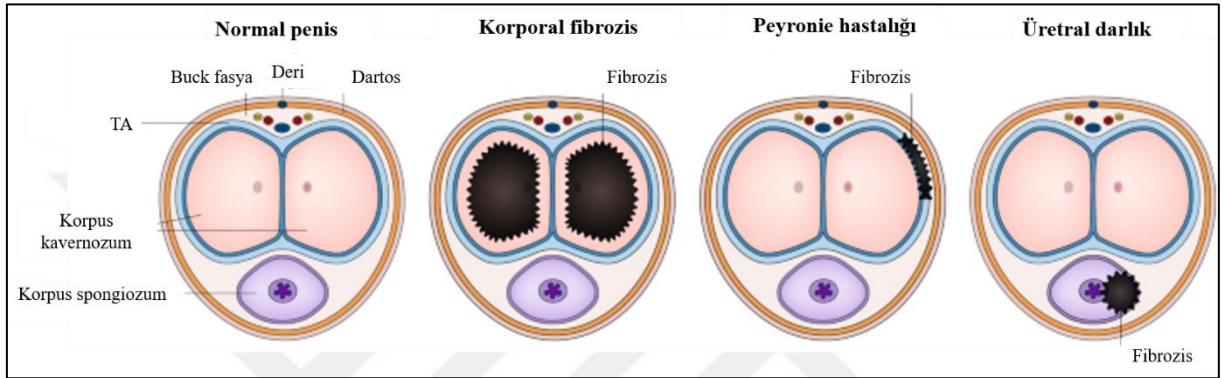
Eretil disfonksiyon patofizyolojisinde NO/cGMP yolağının yanı sıra, RhoA/ROCK sinyal yolağı, Renin-Anjiyotensin Sistemi (RAS), Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (TNF- α) gibi faktörler de önemli yere sahiptir (2, 43).

2.3.1. Eretil Disfonksiyon Tedavisi

Eretil disfonksiyonun başarılı bir şekilde tedavi edilebilmesi için hangi nedenden kaynaklandığının bilinmesi büyük önem taşımaktadır (54). Tedavide ilk olarak invaziv prosedürler yerine genellikle oral tedaviler tercih edilmektedir (31). Birinci basamak tedavide sildenafil, vardenafil, tadalafil vb. gibi PDE5 inhibitörleri (PDE5i) yer alır. Hipogonadik erkeklerde PDE5i'ye yanıtız kalanlarda, testosteron replasman tedavisi ile tedaviye başlamak PDE5i'nin etkilerini güçlendirebilmektedir (54). PDE5i tedavisinin başarısız olduğu normal hastalarda, PGE1 analogu olan alprostadil, papaverin, fentolamin gibi vazoaaktif ilaçlarla intrakavernozal enjeksiyon, intraüretral PGE1 suppozituarları ve vakum ereksiyon cihazları ile ikinci basamak tedaviye geçilir. Enjeksiyon ve cihaz başarısızlığı durumlarında kullanılan penil protezler ise üçüncü basamak tedavi olarak ED yönetiminde yer alırlar (50, 54, 55). Bu tedavilerin tümüne yanıtız hastalarda ise, mezenkimal kök hücre veya adipoz doku kök hücre transplantasyonu ile endotelial nitrik oksit sentaz veya vasküler endotelial büyüme faktörü gen tedavisi gibi vasküler rejeneratif tedaviler yararlı olabilmektedir (45, 54).

2.3.2. Erektile Disfonksiyonda Penil Fibrozis

Peyronie hastalığı, üretral darlık ve korporal fibrozis, sırasıyla TA, üretral korpus spongiosum ve korpus kavernozumun kolajen bileşimindeki değişikliklerle karakterize edilen fibrozis ile ilişkili penil doku hastalıklarıdır (Şekil 8). Ateroskleroz, diyabet ve prostatektomi sırasında kavernoöz sinir hasarı gibi iyatrojenik nedenler korporal fibrozis için en önemli etiyolojik faktörlerdir (14).



Şekil 8. Penil dokunun farklı kısımlarında meydana gelen fibrozisin temsili görüntüsü (Milenkovic'den, 14)

Korpus kavernozum fibrozisi, genellikle vaskülojenik ED patofizyolojisinde yer alan ve korporal düz kas hücrelerinin kaybı ile birlikte kavernoöz arter medyasında meydana gelen birtakım yapısal değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Fonksiyonel düz kas hücrelerinin kaybı ile birlikte kolajen ve elastik lifler gibi ekstraselüler matriks (ESM) bileşenlerindeki değişimler penil doku fibrozisini karakterize eder (56). Elastik ve kolajen liflerdeki bu değişimler, penisin elastikiyetini azaltan mekanik değişikliklere neden olur. Korpus kavernozum dokusundaki kolajen, ağırlıklı olarak tip I, III ve IV'tür. Tip I kolajen sert fibril bantları oluştururken, tip III kolajen çoğunlukla esneyebilen elastik dokuda bulunur ve penisin gerilim kuvveti için gereklidir. Kan damarlarının bazal membranını oluşturan tip IV kolajenin salgılanmasından endotel hücrelerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (13).

Kavernoza fibrozis ile birlikte genişlemiş arterler, artmış düz kas tonusu ve bozulmuş endotel bağımlı sinüzoidal gevşeme gibi çeşitli yapısal değişiklikler nedeniyle sert ereksiyon için yeterli vasküler gerilimi koruyamama sonucu kavernoza disfonksiyona bağlı ED meydana gelmektedir. Korpus kavernozumda meydana gelen fibrozis, emisser venlerin kompresyonunda yetersizliğe yol açar (37).

Korporal dokuda azalan fibroelastisite veya artmış adrenerjik tonus beraberinde meydana gelen fibrozis sonucu, subtunik venlerin pasif veno-oklüzyonu için gerekli olan gevşemeyi korporal düz kas kitlesinin yeterli derecede sağlayamaması nedeniyle korporal veno-oklüzif disfonksiyon (KVOD) meydana gelir (37, 57). Böyle bir durumda, kavernoza düz kas hücreleri kontraktıl fenotipten sentetik fenotipe dönüşerek ESM bileşenlerinin birikimine yol açar (58). Penil düz kas miktarında meydana gelen anlamlı azalmanın ve buna bağlı olarak penil dokulardaki kolajen artışının, korpus kavernoza dışa doğru genişleme kapasitesini azalttığı ve penil basınçtaki artışı engellediğı gösterilmiştir. Bu durum, korpus kavernoza dış veno-oklüzif özelliklerini azaltarak ereksiyon halindeki penisten venöz sızıntı ve akabinde ED'ye neden olur. Penil arterlerin medyasında meydana gelen kolajen birikim süreci, ayrıca arteriyel akışın azalmasına da neden olur. Bu nedenle, penil düz kas kaybı ve artan kolajen lifler hem venöz çıkış hem de arteriyel akış sorunları yaratarak ED gelişiminde önemli rol oynarlar (57).

Korpus kavernoza ve TA'da, TGF- β 1, reaktif oksijen türleri (ROS) ile birlikte diğler profibrotik faktörlerin üretimi, fibroblast ve miyofibroblastlar tarafından aşırı kolajen ve ESM birikimini stimüle eder (58). TGF- β 1, *in vitro* korpus kavernoza düz kas hücrelerinde kolajen sentezini artırdığı gösterilen pleotrofik bir sitokindir. İskemik koşullar altında, TGF- β 1 kendi mRNA'sını indükler, oluşan döngü ile sentezi aşırı artan TGF- β 1 şiddetli fibrozis gelişimine yol açar. Yapılan deneysel çalışmalarda, kolajen I ve III'ün protein ekspresyonunun, TGF- β 1 ekspresyonu ile uyumlu şekilde arttığı gösterilmiştir (13).

2.4. Diyabetik Eretil Disfonksiyon

Diyabet, pankreasın beta (β) hücrelerinden insülin salgısının azalması veya insülin etkisinin bozulması sonucu hiperglisemi ve glikozüri, aynı zamanda lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmalarının bozuklukları ile karakterize bir endokrin hastalıktır. Dünyada hızla artan ve en yaygın kronik hastalıklardan biri olan diyabet, retinopati, nöropati, nefropati, kardiyovasküler hastalıklar ve erkeklerde infertilite gibi ciddi komplikasyonlara yol açabildiğı için küresel bir sağık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu'na göre, 2011 yılında dünya genelinde 366 milyon olan diyabet prevalansının 2030 yılına kadar 522 milyon olması beklenmektedir (5, 19). Dünya çapındaki diyabetlilerin %5-10'unun tip 1 (insüline bağımlı) ve %90-95'inin ise tip 2 (insüline bağımlı olmayan) diyabet olduğu bildirilmiştir (59). Günümüzde, tip 1 veya tip 2 diyabetli genç hasta sayısında sürekli artış olduğu gözlenmektedir. Bu artış, aktif üreme

çağındaki erkeklerin fertilitatesini etkileyebileceğinden genç erkeklerde büyük endişe yaratmaktadır. Bu nedenle, erkek üreme sistemi üzerinde diyabetin neden olduğu değişikliklerden sorumlu olan moleküler mekanizmalar, çeşitli klinik ve hayvan çalışmaları ile araştırılmaktadır (5).

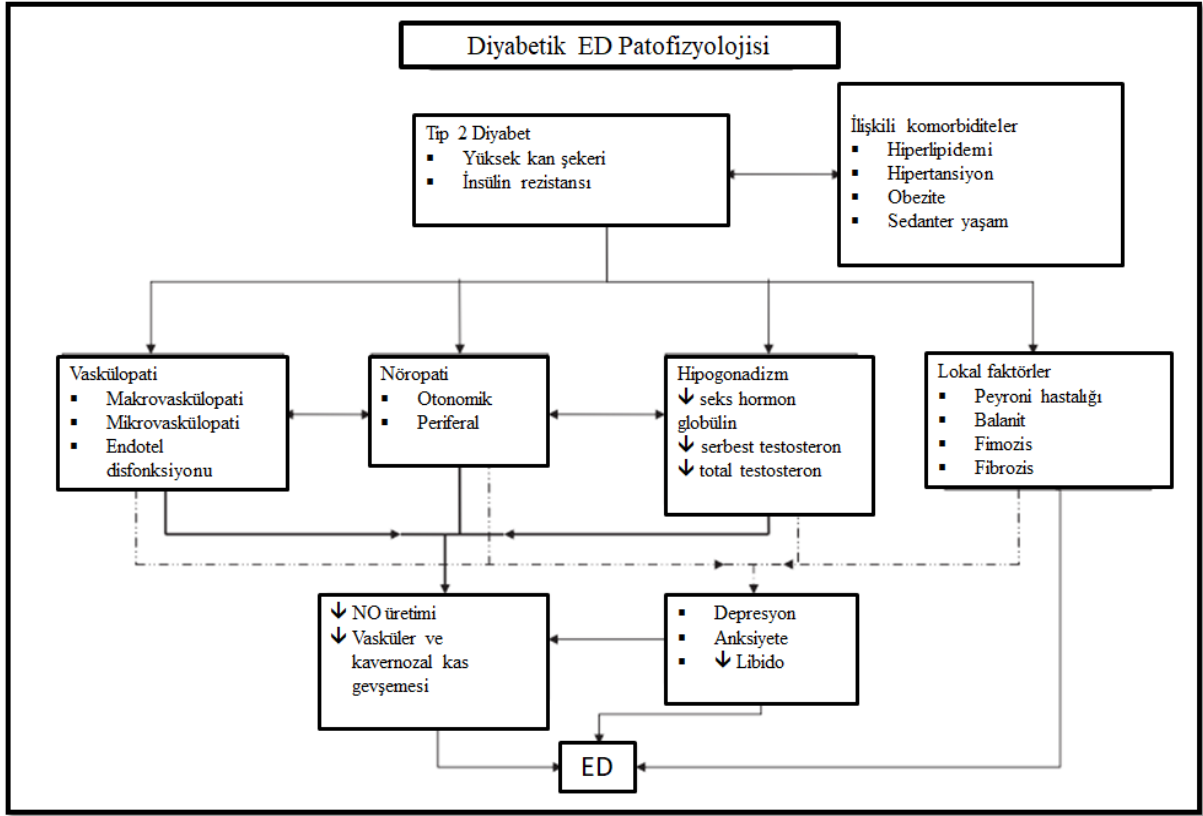
ED, diyabeti olan erkeklerde yaygın görülen ve yaşam kalitesini ciddi derecede etkileyen bir seksüel bozukluktur (4). Diyabet, ED'nin en önemli nedenlerinden biri olarak gösterilmektedir (3). Diyabetik erkeklerdeki ED prevalansı %35-75 arasında değişkenlik göstermektedir (51). Fibrozis ile ilişkili diyabetik ED prevalansının ise %28 olduğu gösterilmiştir (57). Diyabeti olmayan erkeklere kıyasla diyabetli erkeklerde 4 kat daha fazla ED görülür. Diyabetik erkeklerin yaklaşık %50-75'inde genellikle diyabetin erken dönemlerinde ve normal popülasyona göre 10-15 yıl daha erken ortaya çıkar (3, 51).

2.4.1. Diyabetik Erektile Disfonksiyon Patofizyolojisi

Penise giden kan akışını sınırlayarak ED patofizyolojisinde önemli rol oynayan diyabetik vaskülopati; makrovaskülopati, mikrovaskülopati ve endotel disfonksiyonundan oluşur. Diyabetik hastalarda makrovasküler komplikasyonlara yol açan ateroskleroz, tromboz gibi durumlardan daha önce ED'nin meydana geldiği düşünülmektedir. Diyabetle ilişkili mikrovaskülopati ise doğrudan sinir hasarının yanı sıra sinir iskemisine de yol açarak otonomik/periferik nöropatiye neden olur ve böylece diyabete bağlı nörojenik ED gelişiminde rol oynar (11).

Diyabette endotel disfonksiyonu; eNOS ekspresyonu ve aktivitesindeki bozukluklar, oksidatif stres artışı, NO'dan bağımsız gevşeme faktörlerinde bozukluklar, hormonların, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin üretiminde veya faaliyetinde değişiklikler ile ilişkilendirilmektedir. Hipergliseminin etkisiyle meydana gelen yüksek serbest yağ asitleri, PKC aktivasyonu, ROS artışı, trigliserit ve LDL seviyelerinde yükselme ve HDL seviyelerinde azalma diyabette endotel disfonksiyonunu indükleyen parametrelerdir (60).

Diyabetik ED patofizyolojisi multifaktöriyeldir ve tek bir etiyoloji ile açıklanamaz (Şekil 9) (11, 15).



Şekil 9. Diyabetik ED Patofizyolojisi (Malavige'den, 11)

Diyabet, genellikle hipertansiyon, hiperlipidemi ve metabolik sendrom gibi komorbiditelerle ilişkilidir. Bu hastalıklar diyabetik erkeklerde ED için bağımsız risk faktörleri olarak kabul edilirler (11). Diyabetli erkeklerin birtakım başka hastalıklar sebebiyle sıklıkla kullandıkları ilaçlar (antihipertansifler, antidepresanlar gibi) da ED'ye neden olabilmektedir (61). Özellikle, tiazid diüretikler ve beta-adrenoseptör antagonistleri gibi antihipertansifler, statin türevi antihiperlipidemikler ve seçici serotonin geri alım inhibitörü antidepresanlar gibi psikoterapötik ilaçlar erektil fonksiyonu olumsuz yönde etkilemektedirler. ED vakalarının yaklaşık %25'inden bu gibi ilaç tedavileri sorumlu olduğu düşünülmektedir (50, 62).

Diyabetik ED patogeneğinde; bozulmuş NO sentezi, nöropatik hasar, gelişmiş glikasyon son ürünleri (AGE'ler) ve artmış serbest oksijen radikal seviyeleri, ET ve endotelin-B (ET-B) reseptör bağlanma bölgelerinde artış, RhoA/ROCK yolağı upregülasyonu, bozulmuş PKG-1 gibi mekanizmalar ile penil dokuda yapısal değişiklikler yer alır (15).

NO, penil arterlerin endotelinde eNOS, nitrerjik nöronlarda ise nNOS aracılığıyla üretilir. Ardından, cGMP oluşumuna yol açarak korpus kavernoza düz kaslarının gevşemesine aracılık eder (63). Diyabet, NO'nun biyoyararlanımının azalması, eNOS ve nNOS ekspresyonunun downregülasyonu ve nitrerjik sinirlerin dejenerasyonu aracılığıyla NO etkisinin azalmasına ve böylece nöronal ve endotelial NO'ya bağlı kavernoza düz kas gevşemesinin bozulmasına neden olur. NO substratı olan L-argininin plazma konsantrasyonunun ve vasküler içeriğinin diyabetik sıçanlarda azaldığı gösterilmiştir (20). Kimyasal ajanlarla indüklenen veya genetik diyabetli hayvanlarda yapılan çalışmalarda, penil dokuda eNOS ve nNOS ekspresyonunda anlamlı azalma gösterilmiştir. Buna ek olarak, erektil fonksiyonun *in vivo* değerlendirilmesinde kavernoza sinire uygulanan elektriksel stimülasyon ve ACh uygulamasının ardından kavernoza cGMP seviyelerinde azalma olduğu bildirilmiştir (64). cGMP, düz kas hücrelerinin hiperpolarizasyonuna yol açan kalsiyum bağımlı potasyum kanallarını açarak hücre içi kalsiyum seviyelerini değiştiren PKG-1 yoluyla kavernoza düz kas gevşemesine neden olur. Ayrıca, PKG-1'in cGMP'yi hidrolizden koruduğu da raporlanmıştır. Yapılan çalışmalar, PKG-1 nakavt farelerde nöronal ve endotelial NO'ya yanıt olarak kavernoza düz kas gevşemesinin bozulduğunu göstermiştir. Diyabetik tavşanların korpus kavernozaumlarında yapılan *in vitro* deneyler, normal tavşanlara kıyasla diyabetiklerin PKG-1 aktivitesinde bir azalma olduğunu göstermiştir. PKG-1 aktivitesindeki azalmanın hücre içinde cGMP yolak aktivitesini azaltarak diyabetik ED gelişiminde rol oynayabileceği bildirilmiştir (63). Bu çalışmalar, diyabetik ED patofizyolojisindeki önemli mekanizmanın, penil eNOS ve nNOS downregülasyonuna bağlı NO üretiminin azalması ile beraber gelişen NO/cGMP/PKG-1 yolağının disfonksiyonu olduğunu göstermektedir (64).

NO/cGMP/PKG-1 yolağının disfonksiyonunun yanı sıra, AGE'ler, serbest oksijen radikalleri, androjen değişiklikleri, inflamasyon, fibrozis, kavernoza nöropati ve korpus kavernozaumdaki endotel disfonksiyonu gibi birçok faktör diyabetik ED patogenezine katkıda bulunur (18).

AGE'ler diyabetiklerde glikoz ve lipidler, proteinler veya nükleik asitler arasındaki enzimatik olmayan reaksiyonların ürünleri olarak hiperglisemiye sekonder gelişir. Kanda seviyesi artan glikoz, proteinlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek Schiff bazlarını oluşturur. Bu bazlar, daha kararlı Amadori ürünleri oluşturmak için reversibl bir reaksiyona girer. Bu glikozilasyon ürünlerinin bazıları daha fazla kimyasal modifikasyona uğrar ve

sonunda AGE'ler olarak adlandırılan geri dönüşümsüz glikozilasyon son ürünleri haline gelir. AGE'ler vasküler kolajen ile kovalent bağlar oluşturarak vasküler kalınlaşmaya, elastikiyetin azalmasına, endotel disfonksiyona ve ateroskleroza yol açar. Yapılan çalışmalar, AGE'lerin varlığında diyabetik sıçan korpus kavernozumunda düz kas gevşemesinin bozulduğunu göstermiştir. AGE'ler, oksidatif hücre hasarını indükleyen ve NO'yu baskılayan serbest oksijen radikalleri üreterek cGMP'nin azalmasına ve kavernoza düz kas gevşemesinin bozulmasına yol açarak diyabetik ED patogeneğinde rol alır (63).

Oksidatif stres olarak bilinen ROS üretimi ve eliminasyonu arasındaki dengesizlik, diyabet, yaşlanma, hipertansiyon ve hiperkolesterolemi gibi sistemik vasküler bozukluklarla ilişkili endotel disfonksiyonunun gelişmesinde önemli bir role sahiptir. Hiperглиsemi, eNOS fonksiyonunu, proinflatuar sitokin aktivitesini, büyüme faktörü salınımını ve düz kas kontraktilesini etkileyerek endotel fonksiyonunu değiştiren oksidatif stresi doğrudan aktive eder. Vasküler hastalıkların patogeneğinde önemli rolleri olan süperoksit, hidrojen peroksit, hipokloröz asit ve peroksinitrit gibi serbest radikallerin ana kaynağı vasküler endotelyumdur. Hiperглиsemisinin neden olduğu aşırı süperoksit üretimi sonucu oluşan süperoksit anyonu NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturur (20, 65). NO biyoyararlanımının azalmasına neden olan peroksinitrit, penil arterlerin endotel hücrelerinde ciddi hasara neden olan oldukça toksik bir moleküldür. Diyabetik peniste endotel disfonksiyonunun gelişiminde ROS'un yer aldığına dair önemli deneysel ve klinik kanıtlar mevcuttur. Diyabetik ED'li erkeklerden ve STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlardan alınan penil dokunun, sırasıyla diyabetik olmayan ED hastalarından ve diyabetik olmayan hayvanlardan alınan penil dokuya kıyasla daha düşük seviyelerde nitrat ve nitrit, daha yüksek seviyelerde süperoksit ve malondialdehit içerdiği gösterilmiştir (20).

Yapılan prelinik bir çalışma, kavernoza düz kas hücrelerinin kasılmasını modüle eden RhoA/ROCK sinyalizasyon proteinlerinin aşırı ekspresyonunun da diyabetle ilişkili ED'ye katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur (2, 20).

Diyabetik ED'nin, penil vazokonstrüksiyonda rol oynayan ET ve reseptörleri ile bağlantılı olduğunu gösteren kanıtlar vardır. ET, vasküler ve vasküler olmayan düz kasların konstrüktörüdür. Vasküler endotelyum tarafından üretilen ve peniste güçlü bir vazokonstrüktör olan ET-1'in diyabetik hastaların plazmasında yükseldiği gösterilmiştir. ET'nin iki G proteinine bağlı reseptörü (ET-A ve ET-B) vardır. ET-B reseptörleri, çoğunlukla vasküler endotelyum üzerinde bulunur. ET-B reseptörlerinin, köpeklerin

koroner arterlerinde ve insanların meme arterlerinde vazokonstrüksiyona aracılık ettiği gösterilmiştir. Diyabetik tavşanların korpus kavernozumunda ET-B reseptörlerinin upregüle olduğu gösterilmiştir. Kavernozal dokudaki ET-B reseptörlerinin vazokonstrüktif rolü olduğu düşünüldüğünden ET-B reseptörü ve ligandındaki artışın, penil damarlarda vazokonstrüksiyona neden olabileceği bildirilmektedir (63). İnsüline dirençli obez sıçanlarda ET-B reseptörlerinin penil dokuda ROS üretiminin artışına, endotel disfonksiyona ve vazokonstrüksiyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir (66). Diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada, ET-1 düzeylerindeki artışın endotelin reseptörlerinin duyarsızlaşmasına neden olduğu ve bunun ED gelişimi ile ilişkili olduğu öne sürülmüş olup, endotelin-1 reseptör antagonisti bosentanın gelişen ED'yi doz bağımlı şekilde önlediği gösterilmiştir (67).

Diyabetik ED patofizyolojisinde diğer bir önemli etken, periferik ve otonomik nöropatidir. Diyabet hem periferik hem de otonomik nöropati ile ilişkilidir ve her iki durum da ED patofizyolosinde önemli yere sahiptir. Kavernoz düz kasın gevşemesi için gerekli olan parasempatik aktivitenin bozulması otonomik nöropati ile ilişkili ED mekanizmasını açıklayabilmektedir. Diyabetle ilişkili periferik nöropati, penisin shaftından ve glansından refleksojenik erektile merkeze giden duysal uyarıların bozulmasına yol açar. Pudendal sinirin motor nöronları pelvik taban kaslarını değiştirerek bulbo kavernöz ve iskiokavernöz kasların kasılmasına neden olur. Bu durum, ereksiyonun sürdürülmesine yardımcı olan subtunikal venüllerin pasif olarak sıkıştırılmasına neden olur ve böylece kavernöz cisimlerden venöz çıkış azalır (11). Bleustein ve arkadaşları bazı diyabetik erkeklerde penil sinir disfonksiyonunun diğer periferik sinir nöropatilerinden daha önce meydana geldiğini bildirmiştir (68).

2.4.2. Diyabetik Erektile Disfonksiyon Tedavisi

Günümüzde ED tedavisinde PDE5 inhibitörleri birinci sıra olarak gösterilse de, diyabetik ED tedavisindeki etkinlikleri düşüktür (4, 19). Tip 2 diyabetli erkekler ile normal hastalar kıyaslandığında, bu ilaç grubuna normal hastaların %87'si cevap verirken, diyabetli erkeklerin yalnızca %56'sının cevap verdiği gösterilmiştir (69). Diyabetik popülasyonda PDE5i'in düşük etkinliği hastalığın çok faktörlü patofizyolojisine ve erektile dokuda meydana getirdiği fibrozis gibi geridönüşümsüz yapısal değişikliklere bağlanmaktadır (13, 20, 54, 70). Bu nedenle diyabetik ED olan hastalarda, intrakavernozal enjeksiyonlar, vakum cihazları ve implantlar gibi daha yüksek bir tedavi yöntemine geçmek gerekebilmektedir (69). Papaverin,

fentolamin, PGE1'in intrakavernöz ve intraüretral enjeksiyonu PDE5i'ye yanıt vermeyen hastalar için tedavi açısından iyi alternatif uygulamalar olmakla birlikte uygulanabilirlik açısından zorluk teşkil etmektedirler. Bunun dışında PDE5i'lerinin, miyokard enfarktüsü, aritmi ve kontrolsüz hipertansiyonlu hastalarda; nitrat veya nitrat donörlerini kullanan koroner arter hastalarında ani hipotansif kriz gibi olumsuz ve ciddi yan etkilere sebep olmaları, ED tedavisinde kullanımlarını kısıtlar niteliktedir (19, 71, 72). Gümüş ve ark. yaptıkları preklinik bir çalışmada PDE5i olan sildenafilin uzun süreli kullanımının sıçanlarda histopatolojik olarak kavernoza fibrozis riskini artırdığını göstermişlerdir (73). Şiddetli nörolojik hasarı veya vasküler hastalığı olan diyabetik hastaların PDE5i tedavisine karşı gösterdiği direnç ve bu ilaçların olumsuz yan etkileri ile birlikte uzun süreli kullanımlarının kavernoza yapıyı bozma olasılığı nedeniyle diyabetik ED tedavisinde yeni alternatif oral tedavilere gereksinim vardır (15, 20, 70, 73).

2.4.3. Diyabetik Erektile Disfonksiyonda Penil Fibrozis

Yaş ve diyabetle ilişkili ED dahil olmak üzere çoğu vaskülojenik ED olgusunda oldukça yaygın görülen altta yatan süreçlerden biri düz kas kaybının meydana geldiği korporal fibrozistir (57). Diyabetik ED, korporal dokuda düz kas hücre kaybı ve fibrozis artışı ile ilişkilendirilmiştir (18). Diyabet, ED için primer risk faktörlerinden biridir. ED ile ilişkisine ek olarak, penil fibrozis diyabetli hastalarda sık görülür. Diyabetik hastalarda meydana gelen hiperglisemi, korpus kavernoza ve penil arter duvarlarında hasar oluşturarak penil dokuda hücresel değişikliklere neden olur. Diyabetli hastalarda yapılan çalışmalar diyabetle ilişkili fibrotik yolların aşırı aktivasyonunun penil fibroze yol açtığını göstermiştir. Diyabetle ilişkili penil fibrozis sıklıkla korpus kavernoza düz kas hücrelerinde azalma, ESM birikimi ile hücre dışı bağ dokusunda artış olarak kendini gösterir (74). Diyabet, hiperkolesterolemi, vasküler hastalık, penil yaralanma veya yaşlılık gibi durumlarda korporal düz kaslarda artmış kolajen birikimi ve azalmış elastik liflerle ilişkili olarak penil sinüzoidlerde uyum kaybı görülebilmektedir. Yapılan bir hayvan çalışmasında vaskülojenik ED modelinde kavernoza genişleyebilirliğin düz kas içeriği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (10). Hayvan diyabet modellerinde, kavernoza dokuda ereksiyon için gerekli olan düz kas α -aktin ve M miyozin ağır zincirinin mRNA ve protein ekspresyonlarında azalma sonucu daha az düz kas kontraktilesi gösterilmiştir. Diyabet indüklemesinden 8 hafta sonra sıçanlarda kavernoza düz kasın maksimum kasılmasında fenilefrine yanıt olarak %50'lik bir azalma gösterilmiştir (37). Literatürde, diyabetin erken dönemlerinde başlayan

antifibrotik ve antioksidan tedavilerin kavernoza fibrozisi önleyebileceğini gösteren birçok çalışma mevcuttur (58, 75). Oluşmuş fibrozisi geri döndürmek amacıyla yapılan deneylerde STZ uygulamasından 8, 10 ve 12 hafta sonra tedaviye başlayan birçok deneysel çalışma bulunmaktadır (3, 76, 77). Diyabetin geç döneminde başlanan tedavide kavernoza doku mimarisindeki yapısal bozuklukların iyileşmesinde beklenen etki görülmediğinden, gelişebilecek fibrotik değişiklikleri engellemek amacıyla diyabet indüklemesinin hemen ardından tedaviye başlamak gerektiği vurgulanmaktadır (75). Yapılan çalışmalarda, diyabetik sıçan korpus kavernoza dokusundaki düz kasların protein içeriklerindeki ilerleyici değişimlerin hiperglisemi indüksiyonundan sonra 1-8 hafta arasında ortaya çıktığı bildirilmiştir (78, 79).

Diyabet kronik bir hastalık olması nedeniyle uzun dönemde vasküler sistemde hem yapısal hem de fonksiyonel anomalilere yol açarak mikro ve makrovasküler komplikasyonlara neden olur. Siperstein ve ark., ESM değişimleri ile bazal membran kalınlaşmasını, diyabetik komplikasyonların yapısal belirteci olarak tanımlamıştır. ESM, çözünmeyen kolajen, elastin, yapısal glikoproteinler, proteoglikanlar, hyaluronanlar ve integrinler ağından oluşan bir yapıdır. Bunlar hücreler için mekanik destek sağlamakla birlikte hücreler arası etkileşimlere aracılık ederler. ESM’de meydana gelen morfolojik ve biyokimyasal bozukluklar, hedef organlardaki fonksiyon kaybıyla doğrudan ilişkilidir. Tip 2 diyabetli hayvan modellerinde, mezenterik arter ve aort gibi damarlarda artan intimal proliferasyon ve medial kalınlık ile birlikte ESM birikimi gösterilmiştir (80).

Kronik hiperglisemi, hem tip 1 hem de tip 2 diyabette mikrovasküler diyabetik komplikasyonların başlangıcında ana faktördür (80). Hiperglisemi ve insülin direnci, diyabetiklerde fibrojenik kaskadları tetikleyen temel metabolik bozukluklardır. Yüksek glikoz seviyesi, fibroblastlar üzerinden doğrudan etki ile profibrotik gösterir. Hipergliseminin, bağışıklık hücreleri, mikrovasküler hücreler ve epitel hücrelerinin fibrojenik aktivasyonu ve organa özgü hepatositler veya kardiyomiyositler gibi parankimal hücreler üzerindeki zararlı etkileri ile dolaylı yoldan da profibrotik etkisi vardır. Hipergliseminin diyabetle ilişkili fibroziste önemli etkisi olduğunu gösteren deneysel kanıtlar da mevcuttur (81). Hiperglisemiye maruz kalan doku fibroblastlarının, kolajen ve fibronektin gibi ESM proteinlerinin sentezini indüklediğini gösteren *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır (82-84). Hayvan modellerinde, antihiperglisemik ilaç uygulamasının fibrotik değişiklikleri belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir. İnsanlarda ise, kötü glisemik kontrolün

organ fibrozisi ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Hiperglisemi aracılı fibroziste, oksidatif stres, nörohumoral sinyal, proinflamatuvar kaskadlar ve büyüme faktörü aracılı çeşitli fibrojenik yolların aktivasyonu yer alır (81).

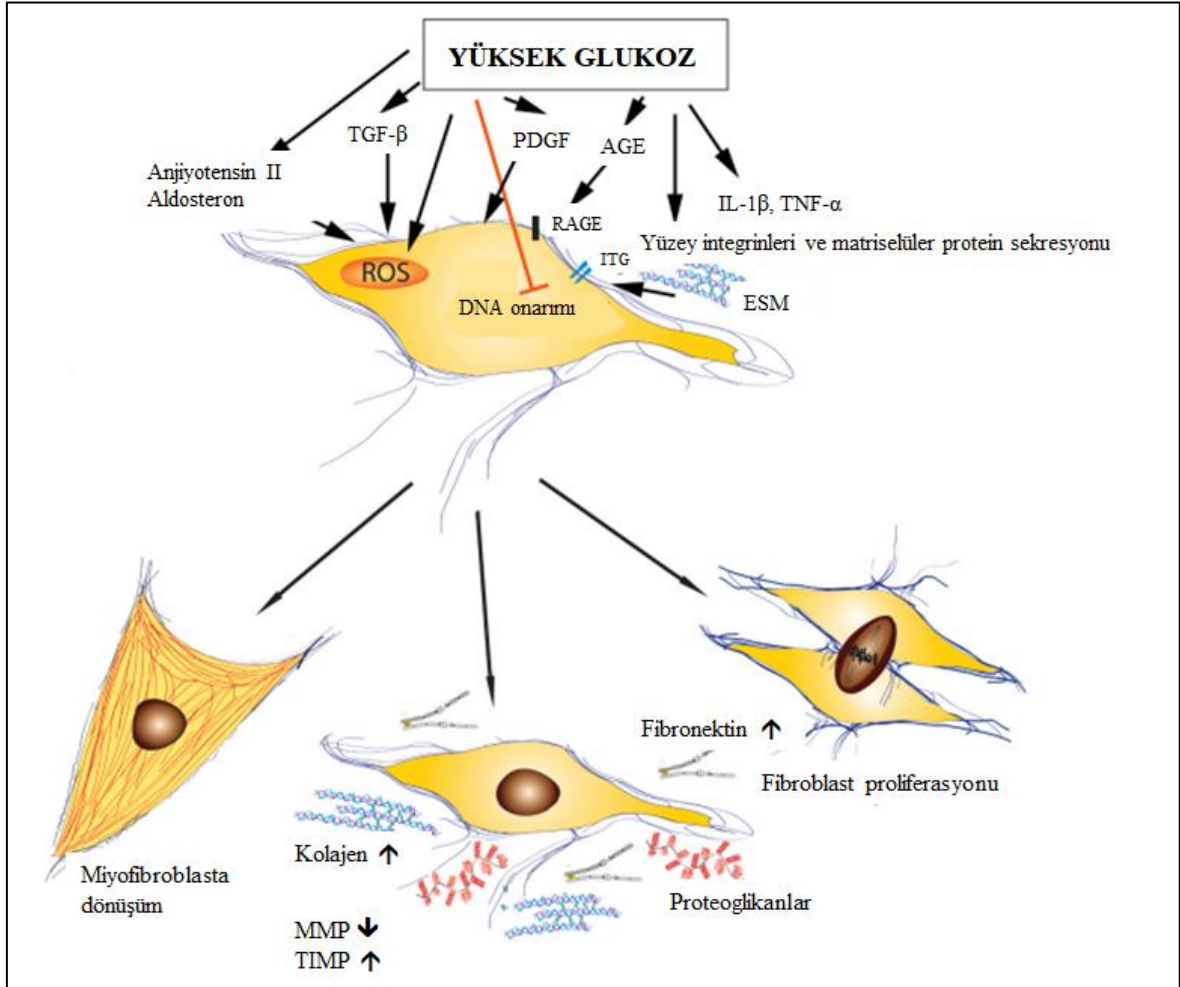
Fibrozis, ESM birikimi ile karakterize olup, hiperglisemi, dislipidemi ve hipertansiyon gibi doku hasarına neden olan olaylara patolojik bir cevaptır (80). Klinik açıdan fibrozis, geri dönüşü olmayan bir skar dokusu durumu olarak düşünülmektedir. Etkilenen organlardaki fibroblastların uzun süreli aktivasyonu, artmış fibroblast/miyofibroblast proliferasyonuna ve aşırı fibröz ESM birikimine (düz kas kolajen oranı, fibronektin vb.) neden olur. Bu nedenle normal yara iyileşmesi için gerekli olan denge bozulmuş olur (17).

Fibrozisin altında yatan mekanizmalar incelediğinde birçok sitokin ve büyüme faktörünün, trombositler gibi kan hücrelerinden ya da mezenkimal ve epitelyal hücrelerden lokal olarak türevlenen çeşitli moleküllerin fibrojenik sürece katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Bunlar arasında, TGF- β ve TGF- β aracılığı ile aktive edilen bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF), fibrotik sürecin indüksiyonu için ana faktörler olarak kabul edilir (17). TGF- β 'nın aşırı ekspresyonu ESM birikimi ve organ fibrozisi gibi patolojik değişikliklere neden olur (85).

TGF- β , çeşitli hastalıklarda ve deneysel modellerde doku fibrozisinin patogenezinde kritik rol oynadığı gösterilmiş önemli bir sitokindir. 3 tane TGF- β izoformu (TGF- β 1, β 2 ve β 3) vardır (81). Bunlar içerisinde yaygın olan izoform TGF- β 1'dir. TGF- β 1 memelilerde hemen hemen her hücrede eksprese edilirken diğer izoformlar daha sınırlı bir hücre ve doku spektrumunda eksprese edilir. İzofomların tümü fibrotik dokularda eksprese edilmesine rağmen, doku fibrozisinin gelişiminden primer olarak TGF- β 1 sorumludur. TGF- β 1, Smad bağımlı ve Smad bağımsız olarak adlandırılan bir dizi hücre içi efektörün aktivasyonu yoluyla fibrojenik etki gösterir (16). Deneysel diyabet modellerinde gelişen böbrek ve kardiyak fibrozisinin patogenezinde TGF- β ve Smad3'e bağımlı kaskadların rol oynadığına dair çok sayıda kanıt mevcuttur (81).

Diyabetik dokulardaki fibroblastlar, makrofajlar, epitel hücreleri, vasküler hücreler gibi çeşitli hücre tipleri yüksek glukoz seviyelerine maruz kaldıklarında uyarılarak TGF- β üretilip salgılayabilmektedir. Hipergliseminin yarattığı fibrojenik etki TGF- β gibi büyüme faktörlerinin indüksiyonu ve aktivasyonu, ROS oluşumu, TNF- α ve İnterlökin 1- β gibi proinflamatuvar sitokinlerin stimülasyonu, AGE'lerin üretimi, yüzey integrinlerinin

uyarılması gibi birden fazla mekanizma aracılığıyla gerçekleşir. Fibroblastlar yüksek glikoz seviyelerine maruz kaldıklarında proliferasyona uğrar ve miyofibroblastlara dönüşerek kolajen, fibronektin ve CTGF gibi profibrotik proteinleri salgılar (Şekil 10) (81).



Şekil 10. Hipergliseminin fibrozis üzerine etkisi (Tuleta'dan, 81)

Diyabette iyi bir glisemik kontrolün, meydana gelebilecek fibrotik süreçleri engelleyebileceği düşünülmektedir (81). Diyabetik hastalarda fibrozis ile ilişkili komplikasyonları azaltmada sıkı glisemik kontrolün rolü olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır (86, 87). Bu nedenle, glukoz düzeylerini düşüren birtakım ajanın diyabetle ilişkili fibroziste hedef tedaviler olabileceği düşünülmekle birlikte bu ajanların direkt antifibrotik etkileri de araştırılmaktadır. Bu amaçla, antidiyabetik ilaçlar arasında önemli bir yere sahip olan metforminin TGF-β1/Smad3 sinyal yolağı inhibisyonu aracılığıyla fibrozisi önleyebileceği bildirilmiştir. Dipeptidil peptidaz-4 inhibitörlerinden gemigliptin ve

saksagliptinin Smad3 fosforilasyonunu engelleyerek böbrek üzerinde antifibrotik etkileri olduğu gösterilmiştir. Sodyum glukoz kotransporter-2 inhibitörlerinin ve tiazolidindionların da TGF- β 1 aktivasyon inhibisyonu yoluyla çeşitli dokularda antifibrotik etkileri olduğu raporlanmıştır. Diyabetik hayvan modellerinde, RAS sistemini bloke eden anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü ve anjiyotensin reseptör antagonistlerinin TGF- β 1 ekspresyonunu azaltarak renal, miyokardiyal ve hepatik fibrozisi iyileştirdiği gösterilmiştir. Bunlara ek olarak lipid düşürücü ilaçlardan fenofibratın TGF- β 1/Smad3 aktivasyonunu düşürerek renal fibrozisi azalttığı bildirilmiştir. Elde edilen bu verilerle, diyabetle ilişkili doku fibrozisinin tedavisinde TGF- β 1/Smad3 sinyal yolağı inhibisyonunun organ disfonksiyonunu azaltmada etkili olabileceği düşünülmektedir (81).

2.4.4. TGF- β 1/Smad/CTGF Sinyal Yolağının Diyabetik Penil Fibrozis Gelişimindeki Rolü

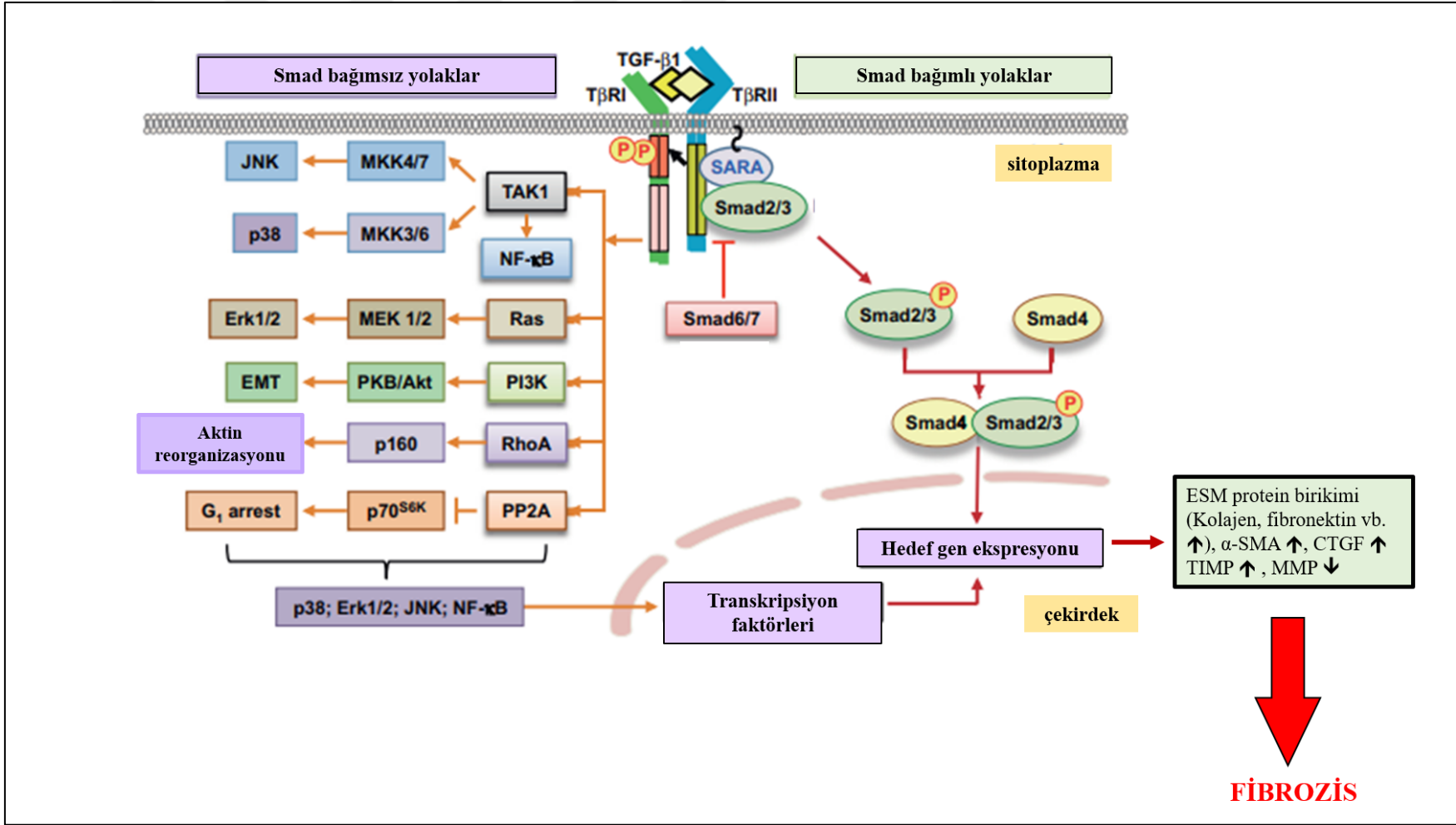
TGF- β 'nın, hücre proliferasyonu, farklılaşması, ekstraselüler matriks (ESM) düzenlenmesi ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlere katıldığı ve embriyogenezi, yara iyileşmesini, fibrozisi, iltihabı ve tümör ilerlemesini etkilediği bilinmektedir (88).

TGF- β , birçok hücre tipi tarafından inaktif latent bir kompleks olarak üretilir. Bu kompleks, LAP (latens ilişkili peptid), TGF- β , latent TGF- β bağlayıcı proteinler (LTBP)'den oluşur. Latent TGF- β , proteinler ve enzimler (trombospondin 1 (TSP-1), integrinler ve diğer TGF- β -bağlayıcı proteinler) tarafından aktive edilir ve disülfide bağlı dimerlere ve homodimerik ligandlara dönüştürülür. Aktive edilmiş TGF- β , Smad (*small mothers against decapentaplegic homolog*) ve/veya Smad bağımsız yollara karşı biyolojik tepkileri düzenlemek için T β R kompleksi veya diğer sitokinler ile etkileşime girer (89).

Smad proteinleri, TGF- β süper ailesi sinyalizasyonunda merkezi mediyatörler olup, reseptör ile regüle edilen Smad'lar (R-Smad'lar), common-mediyatör Smad'lar (Co-Smad'lar) ve inhibitör Smad'lar (I-Smad'lar) olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar (90). Fosforile edilmiş R-Smad'lar (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 ve Smad8), Co-Smad (Smad4) ile kompleks oluşturmak üzere etkileşime girerek nükleer translokasyon ve transkripsiyonel aktiviteye yol açar. TGF β 1 aracılı Smad sinyalizasyonunun negatif regülasyonu I-Smad'lar (Smad6, Smad7) tarafından gerçekleştirilir. I-Smad'lar, MAD homoloji (MH) 2 alanlarının T β RI'ye bağlanması yoluyla TGF- β sinyalizasyonunu inhibe ederek R-Smad'ların fosforilasyonunu ve ayrıca Co-Smad'lar (Smad4) ile oluşturacakları

heteromerik kompleks oluşumunu engelleyerek etkilerini gösterirler (91). Oluşturulan Smad kompleksi çekirdeğe aktarılır ve hedef gen promotörüne doğrudan bağlanarak ve/veya hücre tipine özgü bir şekilde transkripsiyonel kofaktörlerle etkileşim yoluyla hedef genlerin ekspresyonunu düzenler (90).

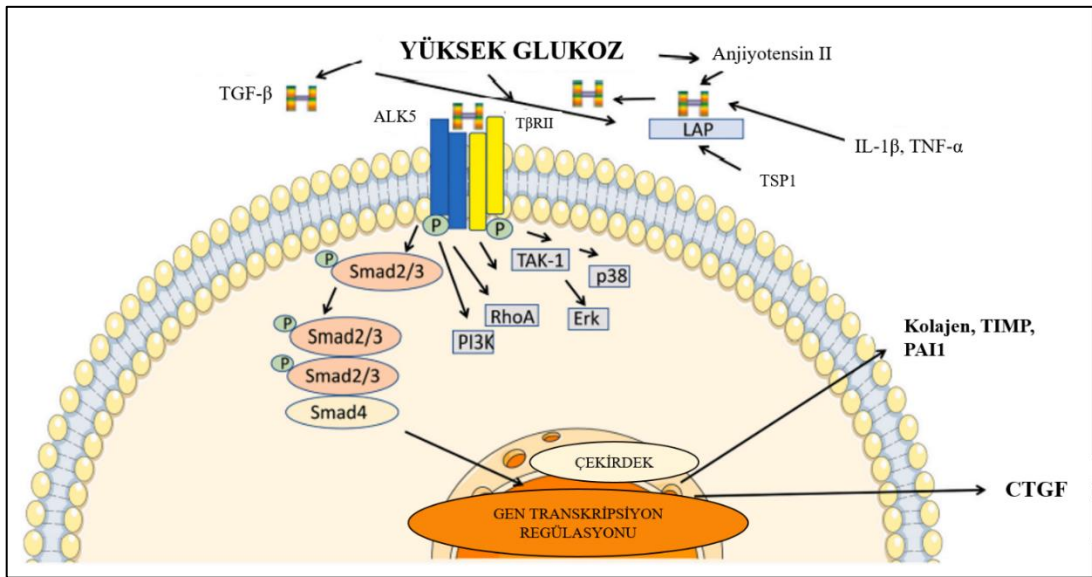
Çok hücreli organizmalarda 60'dan fazla TGF- β süper ailesi üyesi saptanmıştır. Bunlar arasında üç memeli TGF- β izoformu (TGF- β 1, 2 ve 3) vardır (17). TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3'ten oluşan TGF- β ligandları, epitel hücreleri, fibroblastlar ve immün hücreler gibi çok sayıda hücre tipi tarafından salgılanır ve inaktif şekilde depolanır (88). Aktive edilmiş TGF- β ligandları, 7 farklı tip I (aktivin reseptör benzeri kinaz/ALK) ve 5 farklı tip II TGF- β reseptörleri (T β R) aracılığıyla etki gösterir (92). Her iki reseptör türü de, bir N-terminal hücre dışı ligand bağlama alanı, bir transmembran bölgesi ve bir sitoplazmik serin/treonin kinaz alanından oluşur (90). Ligandın yokluğunda, tip I (T β RI) ve tip II (T β RII) reseptörler plazma membranında homodimerler şeklinde bulunur. Ligand bağlanması, tip I ile tip II reseptörlerinin birleşerek kompleks haline gelmesini sağlar. Aktive edilmiş TGF- β dimerleri ile tip II reseptörünün teması, tip I'i fosforile ve aktive eder. Aktifleşen tip I reseptörden çekirdeğe sinyal verme, ağırlıklı olarak Smad ailesine ait sitoplazmik protein aracılarının fosforilasyonu ile gerçekleşir (17). TGF- β , reseptörle ilişkili Smad proteinlerini (Smad2 ve Smad3) aktive ederek fibrotik etki gösterir. TGF- β , aktivin reseptör benzeri kinaz 5 (ALK5) olarak bilinen tip I reseptöre bağlanır. Serin/treonin rezidülerinden (GS domain) fosforillenen ALK5, daha sonra Smad2 (Ser^{465/467}) ve Smad3 (Ser^{423/425}) moleküllerini fosforiller (93, 94). Bu proteinler fosforillendiğinde Smad4 ile heteromerik kompleks yaparlar ve bu kompleks çekirdeğe geçer. Çekirdekte, TGF- β cevap genlerinin transkripsiyonunu regüle ederler ve sonuçta fibrozis ile ilişkili değişimler indüklenir (93). Smad2/3'ün aktivasyonu, kolajenler, plazminojen aktivatörü inhibitör-1 (PAI-1), çeşitli proteoglikanlar, integrinler, CTGF ve matriks metalloproteazlar (MMP) dahil olmak üzere birçok profibrotik genin ekspresyonunu düzenler (92). Smad7 ise TGF- β sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir (93). Smad7, T β R-1'in fosforilasyonunu ve ALK5'e bağlanmak için Smad2/3 ile yarışarak oluşacak heterodimerik kompleksin oluşumunu engellemek, protein fosfataz-1 yoluyla reseptör kompleksinin defosforilasyonunu sağlamak, E3-ubikitin ligaz ve Smad ubikitinasyon regülatör faktör-2 (Smurf-2)'nin T β R-1 etkileşimini sağlayarak ile reseptör degradasyonuna yol açmak suretiyle TGF- β sinyalizasyonunu inhibe eder ve gelişebilecek fibrotik süreçleri engeller (95).



Şekil 11. TGF-β1'in Smad bağımlı ve Smad bağımsız yollar aracılığıyla meydana getirdiği fibrozis (Kim'den, 91)

TGF- β ayrıca Rho GTPazlar (Rho), p38 mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK), c-Jun-N-terminal kinaz (JNK), fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) ve p53 dahil olmak üzere çeşitli SMAD bağımsız (non-kanonik) sinyal yollarını da indükler. Non-kanonik sinyal yolları, TGF- β aracılı biyolojik yanıtlarda rol oynar ve ayrıca kanonik yolağı da düzenleyebilirler (88). Fibrotik süreçlerin oluşumunda kanonik sinyal yollarının yanı sıra bazı non-kanonik sinyal yollarının da rolü vardır. Bu sinyal yolları; TGF- β /ALK1/Smad1/5, TGF- β /ERK, TGF- β /JNK/p38, TGF- β /PI3K/Akt, TGF- β /c-Abl, TGF- β /JAK2/STAT3, TGF- β /ROCK şeklinde sıralanabilir (95). Şekil 11’de TGF- β 1/Smad bağımlı ve TGF- β 1/Smad bağımsız sinyal yollarının fibrozis üzerindeki etkisi gösterilmiştir (91).

Diyabetik dokularda hiperglisemi aracılı TGF- β 1 indüksiyonu sonucu çoğunlukla Smad bağımlı olmak üzere Smad bağımsız yollar da aktive olur (Şekil 12). Yüksek glikoz nedeniyle meydana gelen fibrotik değişimlerin mekanizması; RAS’ın uyarılması ile latent depolardan TGF- β sentezinin tetiklenmesi, hiperglisemiye yanıt olarak gelişen proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu sonucu TGF- β ’nın de novo sentezinin uyarılması, TGF- β ekspresyonunu ve aktivasyonunu indükleyen oksidatif stresin tetiklenmesi, TSP-1 gibi matriselüler proteinlerin upregülasyonu ile artan TGF- β aktivasyonu, hücre yüzeyinde T β R ekspresyon artışı şeklinde açıklanabilir (81).



Şekil 12. Hiperglisemi aracılı TGF- β sinyal yolağı aktivasyonu (Tuleta’dan, 81)

TGF- β 1'in hücre büyümesi, farklılaşması, apoptozis ve yara iyileşmesi gibi çeşitli hücre fonksiyonların temel düzenleyicisi olduğu ve ESM sentezinin güçlü bir indükleyicisi olduğu gösterilmiştir (91). Karaciğer, akciğer, böbrek, deri gibi çeşitli organların farklı nedenlerle tetiklenen fibrotik süreçlerinde TGF- β 1 aktivasyonunun kritik önemi vardır (96). TGF- β 1, diyabetle ilişkili ED patogeneğinde konu ile en çok ilişkilendirilen fibrojenik sitokin olup, STZ ile indüklenen diyabetik sıçanların korpus kavernoza dokularında TGF- β 1 ekspresyonunun upregüle olduğu gösterilmiştir. TGF- β 1, insan korpus kavernoza düz kas hücrelerinde kolajen sentezini 2.5 ila 4.5 kat artırmaktadır (93).

Korporal fibrozisin etiyolojisine bakıldığında, diyabetik modellerde hem anormal düz kas gevşemesi hem de jeneralize arterial media fibrozisi olduğu gözlenmiştir. Bu durumun altında yatan mekanizmalar incelendiğinde TGF- β 1 ekspresyon artışı ve Smad yolağı aktivasyonu ön plana çıkmıştır (22). STZ ile indüklenen diyabetli sıçanlarda yapılan bir çalışmada, sıçanların korpus kavernoza dokusunda TGF- β 1 ekspresyonunun upregülasyonu ile birlikte Smad yolağının fosfoaktivasyonu gösterilmiştir. Bu nedenle, TGF- β 1'in alt sinyal yolağı olan Smad yolağının blokajı, potansiyel bir antifibrotik stratejidir (13). Bu amaçla yapılan çalışmalarda, korporal doku düz kas hücre kaybı ve aşırı bağ doku/kolajen artışı ile karakterize edilen penil fibrozisi indükleyen TGF- β 1/Smad sinyal yolağı inhibisyonunun kavernoza fibrozisi önleyerek diyabetle ilişkili ED'yi iyileştirebileceği gösterilmiştir (13, 97, 98).

TGF- β 1'in alt-hedeflerinde en az 60 adet ESM-ilşkili gen bulunmaktadır. CTGF, TGF- β 1 aktivitesinin bir alt mediyatörüdür ve bağ dokusu homeostazisinde, fibroblast proliferasyonu, migrasyon ve adhezyonu ile ESM ekspresyonunda önemli bir rol oynar (18). CTGF, diyabetik dokularda hem TGF- β stimülasyonu hem de TGF- β -bağımsız yollar aracılığıyla yüksek glikoz tarafından indüklenir ve fibroblast aktivasyonu için diğer fibrojenik büyüme faktörleri (TGF- β 1 ve İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü-1 gibi) ile birlikte çalışır. CTGF'nin diyabetik renal fibroziste önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (81). Çeşitli organlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda, CTGF inhibisyonunun hem fibrozis oluşumunu engellediği hem de fibrozisi inhibe ettiği gösterilmiştir. CTGF ekspresyonu, patofizyoloji ile ilişkili birçok sitokin tarafından indüklenir. TGF- β ile indüklenen CTGF, miyofibroblastları aktive eder ve ESM proteinlerinin birikimini ve yeniden şekillenmesini stimüle eder. Bu durum, dokunun yeniden biçimlenmesine ve fibroze yol açar. CTGF'nin

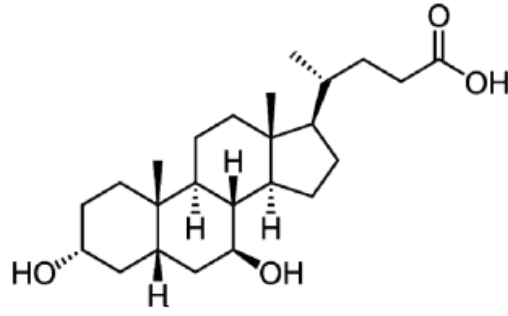
ekspresyonu TGF- β ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi sitokinler tarafından indüklenirken, CTGF de TGF- β ve VEGF'nin ekspresyonunu indükler. Böylece, fibrozisin ilerleyici doğasına katkıda bulunan bir döngü oluşur. CTGF inhibe edilerek, bu pozitif geri bildirim halkaları kırılabilir, bu da organların normal yapı ve fonksiyonlarını geri kazanmalarını sağlayabilir (99). Zhang ve ark., TGF- β 1/Smad sinyal yolağının up-regülasyonunun diyabetik sıçanların penisindeki yapısal değişikliklerde önemli bir rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (93). Yapılan çalışmalar, TGF- β 1 ve alt-efektörlerinin (Smad ve CTGF) bu yapısal değişimde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. TGF- β 1/Smad/CTGF sinyal yolağının diyabetik sıçanların korpus kavernozumundaki fibrozis indüksiyonunda rol oynadığı ve ED'ye katkıda bulunduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (18).

2.5. Ursodeoksikolik Asit

Ursodeoksikolik asit (UDKA), ilk defa 1927 yılında Çin kara ayısının safrasında tanımlanan ve Latince'de ayı türünün karşılığı olan "ursus" olması nedeniyle adını bu türden alan hidrofilik bir safra asididir. Kurutulmuş ayı safrası, Çin'de karaciğer hastalığının ampirik tedavisinde yüzyıllardır kullanılmaktadır. Ayılarda doğrudan kolesterolden sentezlenen birincil safra asidi olmasına karşın, insanlarda toplam safra asidi havuzunun % 1±3'ünü oluşturacak şekilde ikincil safra asidi olarak bulunur ve bağırsakta birincil safra asidi kenodeoksikolik asidin bakteriler tarafından 7 β -epimerizasyonu ile oluşturulur (100, 101).

2.5.1. Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Kimyasal yapısı 1936 yılında Iwasaki tarafından aydınlatılmış olan UDKA daha sonra Japonya'da hepatoprotektif bir ajan olarak sentezlenerek vitaminlerle kombinasyon şeklinde pazara sunulmuştur (Şekil 13) (100, 102).



Şekil 13. Ursodeoksikolik Asidin kimyasal yapısı ($C_{24}H_{40}O_4$) (Kotb'den, 102)

Makino, 1975 yılında, safra kesesinde taş bulunan hastaların UDKA ile tedavisinden sonra safra taşlarının çözündüğünü gösteren ilk prospektif çalışmayı bildirmiştir. Japonya ve Avrupa'dan gelen ilk raporlar, UDKA'nın safra taşlarını çözebildiğini ve hepatotoksik olmadığını ortaya koymuştur. Japonya'daki gözlemlere benzer şekilde, Leuschner ve ark. kronik aktif hepatitli hastalarda safra taşı dissolüsyonu için verilen UDKA'nın rutin karaciğer fonksiyon testlerini iyileştirdiğini gözlemlemişlerdir. Poupon, 1987 yılında, primer biliyer siroz hastalarında UDKA'nın uzun süreli kullanımının güvenli ve etkili olduğunu öne sürmüştür. Bu ilk raporlar, UDKA'nın, kronik kolestatik bozukluklarda kullanımı hakkında daha fazla araştırma yapılmasına yol açmıştır. Bugün klinik uygulamada UDKA, kolestatik karaciğer hastalıkları olan hastaların tedavisinde tanımlanmış bir role sahiptir (100, 101). UDKA, Şekil 13'te gösterildiği gibi kolesterol türevi bir molekül olup, kimyasal ve yapısal olarak steroid hormonları ile benzerlikler gösterir (102).

2.5.2. Farmakokinetik Özellikleri

Safra asitleri karaciğerde kolesterolden sentezlenen doğal steroidlerdir. Safraya atıldıktan sonra, safra asitlerinin %95'i bağırsakta geri emilir, karaciğere geri döner ve enterohepatik dolaşıma girerek safraya yeniden salgılanır. Birincil safra asitleri (kolik ve kenodeoksikolik asit) dekonjuge edilir ve daha sonra kolonik bakteriler tarafından dehidroksilasyonla ikincil safra asitlerine (deoksikolik ve litokolik asit) dönüştürülür. Normal şartlar altında safra asitlerinin yaklaşık %95'i glisin veya taurin ile konjuge edilir. Safra asitleri hücre içi proteinlere sıkıca bağlandığı için dolaşımdaki serbest konsantrasyonları düşüktür (100).

Hidrofilik bir safra asidi olan UDKA oral yoldan uygulanmasının ardından $30 \pm 60\%$ bağırsaklardan absorbe edilir, bunun yaklaşık %80'i ince, %20'si de kalın bağırsaklarda

pasif olarak emilir. Ardından portal dolaşıma giderek sinüzoidal alanlarda, spesifik safra asidi taşıyıcıları NTCP ve OATP aracılığıyla hepatositlere alınır. Hepatosit içinde, glisin veya taurine konjuge edilir ve daha sonra kanaliküler alan boyunca BSEP olarak adlandırılan başka bir safra asidi taşıyıcı molekül yoluyla safra kanallarına taşınır. Safraya salgılanmasını takiben ince bağırsağa ulaşır ve ardından diğer safra asitleri ile birlikte enterohepatik dolaşıma girer (101).

UDKA, %70'e yakın ilk geçiş etkisine sahiptir. Oral uygulamanın ardından, safrada UDKA konsantrasyonu 1 ± 3 saat sonra zirveye ulaşır. Yayınlanan bir derlemede, günlük 10 ± 15 mg/kg oral uygulanan UDKA'nın, safra asidi havuzunun $\%40 \pm 60$ 'ını oluşturarak karaciğerde ve dolaşımda baskın safra asidi haline geldiği bildirilmiştir. Başka bir derlemede ise, günde 8 ± 10 mg/kg verilen UDKA'nın, biliyer safra asitlerinde yaklaşık $\%40$ 'lık bir zenginleşmeye neden olduğu belirtilmiştir. İnsanlarda, UDKA'nın yarı ömrü 3.5 ila 5.8 gün olup, başlıca eliminasyon yolu feçestir. Absorbe edilmeyen UDKA, mikrobiyal dönüşüme uğrayarak kolonik içerikte çözünmeyen ve dışkı yoluyla atılan litokolik aside dönüşür (100, 101).

2.5.3. Farmakolojik Profili

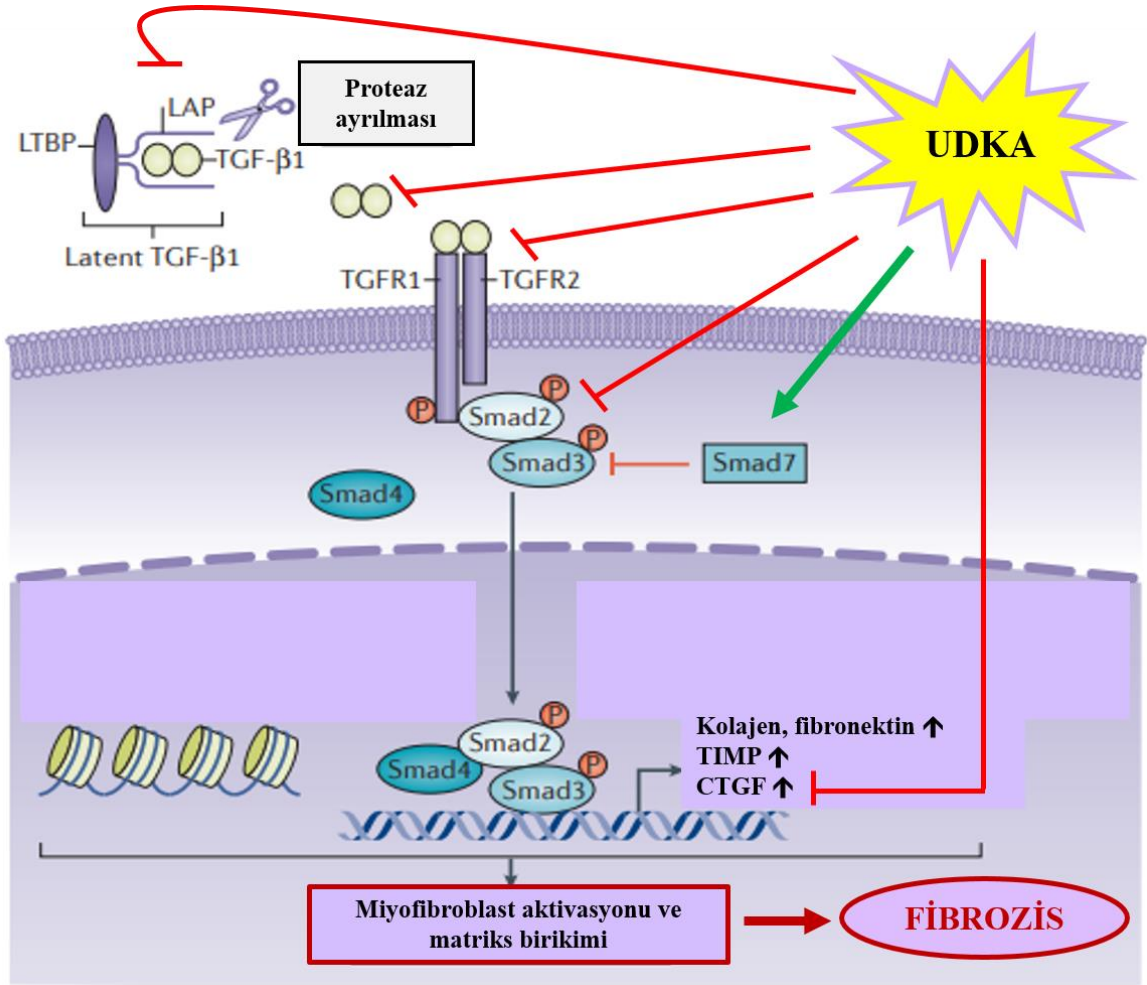
Vücutta doğal olarak sentezlenen UDKA, toplam safra asitlerinin $\%3$ 'ünü oluşturan, dışarıdan verildiğinde biliyer safra asitlerinin yüzdesini $\% 2-4$ 'ten yaklaşık $\% 50$ 'ye kadar artırabilen hidrofilik bir safra asididir (103). Klinikte safra taşlarının çözünmesi, biliyer ağrının önlenmesi, erişkin kolestatik karaciğer hastalıkları (primer biliyer siroz, primer sklerozan kolanjit, gebelikte intrahepatik kolestaz), pediatrik kolestatik karaciğer hastalıkları (kistik fibroz, progresif ailesel intrahepatik kolestaz), ilaca bağlı kolestaz, kronik viral hepatit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır (104). Karaciğerden kolesterol salgılanmasını ve kolestrolün bağırsaklardan fraksiyonel absorpsiyonunu baskılar. Böylece hem safranin hem de safra taşlarının kolesterol içeriğini düşürerek etki gösterir (103).

Membran koruyucu etkisi ile hepatik hücre hasarı, sitolizi ve apoptozu azaltması UDKA'nın olası etki mekanizmalarından en önemlileridir. Diğer olası etki mekanizmaları ise safra asitlerinin biliyer sekresyonunun uyarılması, oksidatif stresi azaltması ve immünomodülatör etkileridir (103). Farklı hücre tiplerindeki apoptozu modüle etmede UDKA'nın önemli rol oynadığı gösterilmiş olup; kaspaz bağımsız mekanizma üzerinden tümör baskılayıcı protein p53 inhibisyonu ve siklin D1'in inhibisyonu aracılığıyla antiapoptotik etki gösterdiği bildirilmiştir (102, 105-107). Ayrıca, sitotoksik deoksikolik

safrası asidinin neden olduğu apoptozu bloke ederek, hasarlı hücrelerin apoptozunu dolaylı olarak bloke eder. Bunun yanı sıra, UDKA'nın antiapoptotik etkisi kısmen de EGFR/Raf-1/ERK sinyalizasyon kaskadının modülasyonu aracılığıyla gerçekleşir. Sekonder hidrofilik bir safrası asidi olan UDKA immünmodülatör etkilerini, mitokondriyal membran depolarizasyonunun ve kanal oluşumunun inhibisyonu, reaktif oksijen türlerinin üretimi, sitokrom C salınımı, kaspaz aktivasyonu üzerinden gösterir. İmmün sistem üzerindeki bir diğeri önemli etkisi ise, glukokortikoid reseptörüne bağlanarak, enfeksiyona, malign dönüşüme, sinaptik plastisite ve hafıza süreçlerine karşı immünsüpresif etkinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan NF- κ B'yi baskılamasıdır (102).

Karaciğeri ve kalp gibi çeşitli dokularda UDKA'nın antifibrotik etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Buko ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, tiyoasetamid ile indüklenmiş karaciğeri fibrozisinde oral gavaj yoluyla uygulanan 80 mg/kg UDKA'nın karaciğeri dokusu üzerinde terapötik ve profilaktik antifibrotik etkisi gösterilmiştir (108). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan başka bir çalışmada, intragastrik yolla uygulanan 10, 20, 40 ve 80 mg/kg UDKA tedavisinin karaciğeri steatozisini önleyici etkisi, özellikle 40 ve 80 mg/kg'da olmak üzere doz bağımlı şekilde gösterilmiştir (109). Farelerde yapılan hepatik fibrojeniz hücre kültürü çalışmasında, UDKA, TGF- β 1/Smad2/3 sinyal yolağını bloke ederek hepatik fibrojenizinin anahtar mediyatörlerini baskılamıştır (23). Farelerde yapılan başka bir çalışmada, izoproterenol ile indüklenmiş miyokard fibrozisi modelinde, UDKA'nın miyokard dokusundaki TGF β -1 protein ekspresyonunu ve doz bağımlı olarak miyokardiyal kollajen I ve III miktarlarını düşürerek miyokardiyal fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (24). STZ ile indüklenmiş diyabetik fare modelinde yapılan bir çalışmada ise, UDKA'nın, TGF- β ve fibronektin düzeylerini azaltarak kardiyak dokuda antifibrotik etkisi gösterilmiştir (25). Liang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, UDKA'nın TGF- β 1/Smad sinyal yolağı elemanlarından TGF- β 1, Smad3 ve Smad7 protein ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri aracılığıyla hepatik fibrozis gelişimini önleyebileceği belirtilmiştir (26).

Yapılan deneysel çalışmalara dayanarak antifibrotik etkisi gösterilmiş olan UDKA'nın, TGF- β 1/Smad/CTGF sinyal yolağı üzerindeki olası hedefleri Şekil 14'de gösterilmiştir (85).



Şekil 14. UDKA'nın TGF-β1/Smad sinyal yolağı üzerindeki hedefleri (Meng'den, 85)

Yapılan çalışmalarda UDKA'nın TGF-β1'in neden olduğu konakçı hücre apoptozunu da azaltabildiği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, UDKA'nın, deoksikolik asit ve kenodeoksikolik asit tarafından uyarılan apoptozu inhibe ettiği gözlenmiştir. *İn vitro* bir çalışmada, hepatoma hücrelerinin 72 saat boyunca 1 nmol/l TGF-β1 ile inkübasyonu, %34 apoptoz ile ilişkilendirilmiştir. Çalışma UDKA varlığında tekrarlandığında, apoptozun %45 azaldığı gösterilmiştir (103). Ayrıca, sıçanlarda gentamisin ile indüklenen bir nefrotoksisite modelinde, UDKA'nın tubuler endotel hücrelerinde azalmış eNOS ekspresyonunu artırdığı, artmış NF-kB ekspresyonu ile kaspaz-3 ekspresyonunu ise azalttığı ve böylece gösterdiği antioksidatif, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etki ile renal hasarı iyileştirdiği gösterilmiştir (110).

Hidrofilik özelliği sebebiyle sistemik dağılıma daha çok yayıldığı için uzun yarı ömre sahip olan UDKA'nın kan beyin bariyerini de aşması avantajıyla Alzheimer ve Parkinson

gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarında mikrogliya aktivasyonunun baskılanmasına yol açtığı düşünülmektedir (102). Son dönemde yapılan preklinik ve klinik çalışmalarda, UDKA ve onun taurin konjugatı olan Tauroursodeoksikolik asidin (TUDKA) oral biyoyararlanımlarının iyi olması, kan beyin bariyerini geçebilmeleri, daha az sitotoksik etkiye sahip olmaları gibi avantajlarıyla Parkinson, Huntington, Alzheimer ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi nörolojik hastalık modellerinde nöroprotektif etkisinin olduğu vurgulanmıştır (111, 112). Ayrıca, retinal dejenerasyon modellerinde de UDKA'nın nöroprotektif etkisinin olduğu gösterilmiştir (113).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Deneysel çalışmanın yapılabilmesi için KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan onay alındı (Protokol No:2019/31, Ek-1). Çalışmamızda KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezi Laboratuvarı'ndan temin edilen 40 adet Sprague-Dawley erkek sıçan (9-12 haftalık, 270-300 g) kullanıldı. Sıçanlar deney protokolü süresince KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezi'nde 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusunda uygun sıcaklık ve nem ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, %60) koşullarında barındırılarak *ad libitum* beslendi. Işığın şiddeti özellikle albino ırklarda önemli olduğundan deney protokolü süresince laboratuvar ortamı gün ışığına karşı izole edildi. Deney süresince sıçanların vücut ağırlıkları haftalık olarak, kan şekeri düzeyleri ise ayda bir ölçülerek kaydedildi. Kafeslere, sorumlu araştırmacı tarafından deney protokolü ve deney hayvana ait kimlik bilgilerini içeren bilgi etiketi yapıştırıldı.

3.1.2. Alet ve Cihazlar

Çalışmamızdaki incelemeler kapsamında kullanılan alet ve cihazlar Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Kullanılan alet ve cihazlar

Adı	Marka ve üretim yeri
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Buz makinesi	Uğur UMB30, Türkiye
Cerrahi ipek iplik (4/0)	Medipac, Greece
Cryo tüp	Isolab-091.11.102, Türkiye
Cryo tüp kutusu	Isolab-093.02.001, Türkiye
Dikey jel elektroforez sistemi	Invitrogen (XCell SureLock Mini-Cell), ABD
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

Tablo 1. (Devam)

Etüv	Magaterm, Türkiye
Görüntüleme cihazı	ChemiDoc-It2-UVB Ltd, England
Hassas Terazı	Ohaus, Türkiye
Hemostat pens (curved smooth)	FST-13021-12, Almanyası
Homojenizatör	Qiagen, ABD
Işık mikroskopu	Olympus BX51; Olympus Co., Tokyo, Japan
İnlaler 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, Almanyası
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
Veri kayıt sistemi	BIOPAC M35, ABD
Vorteks	Isolab, Türkiye

3.1.3. Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan kimyasal ajanlara ait bilgiler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasallar

Adı	Marka ve Kodu
Ursodeoksikolik asit	Ursofalk®, Ali Raif İlaç San. A.Ş.
Streptozotosin	Sigma Aldrich®, S0130
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
Ketamin HCl	Ketalar®, Pfizer
Ksilazin (%2)	Rompun®, Bayer
Ksilen	Isolab, 990.019, 1330-20-7
Sitrik asit	Sigma, 27109
Sodyum sitrat	Sigma, W302600
Metanol	Isolab, 947.046, 67-56-1
Parafin (granül)	Tekkim, 200661.00502
%5’lik Dekstroz çözeltisi	Polifleks %5 Dekstroz sudaki i.v. infüzyon için çözelti, Polifarma İlaç San. ve Tic. A.Ş.
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 yedi 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- β aktin antikor	St. John's Laboratory, STJ91464, 1:1000
Anti-TGF- β 1 antikor	FineTest, FNab09851, 1:1000
Anti-pSmad2 (Ser ^{465/467}) antikor	Cell Signaling Tech., 3108, 1:1000
Anti-Smad2/3 antikor	Cell Signaling Tech., 3102, 1:1000
Anti-Smad7 antikor	Abcam, ab216428, 1:1000
Anti-CTGF antikor	FineTest, FNab02054, 1:1000
Anti-Fibronectin antikor	FineTest, FNab03122, 1:1000
Anti-goat IgG HRP-linked antikor	Advansta, R05072-500, 1:10000

3.1.5. Kitler

Çalışmanın histopatolojik ve moleküler incelemelerinde kullanılan kitlere ait bilgiler Tablo 4'te yer almaktadır.

Tablo 4. Kullanılan kitler

Adı	Marka ve Kodu
GBL Masson Trikróm 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 tamponlardan 50 mM sodyum sitrat (pH:4.5) tamponu aşağıdaki şekilde hazırlandı:

1478 mg sodyum sitrat ve 1050 mg sitrik asit 100'er mL deiyonize suda çözüldü. Ardından sodyum sitrat çözeltisi üzerine pH 4.5 oluncaya kadar sitrik asit çözeltisi eklenerek hazırlanan çözelti +4°C'de bir hafta boyunca saklandı.

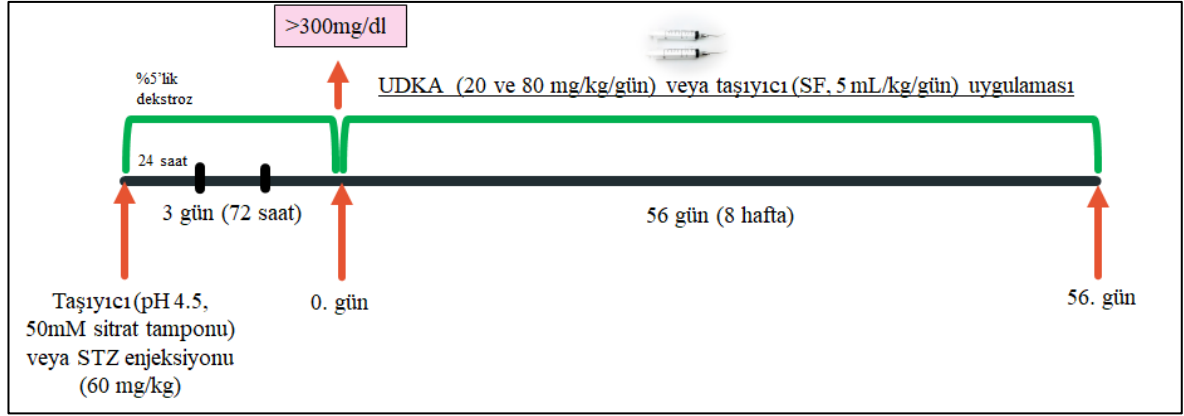
Kullanılan diğer çözelti ve tamponlar Tablo 5'te yer almaktadır.

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

Deney hayvanları ağırlıkları göz önünde bulundurularak gruplara ayrıldı. Ardından taşıyıcı (50mM sitrat tamponu, pH 4.5) veya deneysel diyabetik ED modelinin indüklenmesi amacıyla sıçanlara STZ (60 mg/kg, i.p.) uygulaması yapıldı. STZ enjeksiyonu sonrası ani gelişebilecek olan hipoglisemiye önlemek amacıyla STZ gruplarına içme suyu olarak 24 saat boyunca %5'lik dekstroze çözeltisi verildi. STZ enjeksiyonu yapılan gruplarda enjeksiyondan 72 saat sonra sıçanların kuyruk venlerinden alınan kan glukoz seviyeleri ölçülerek >300 mg/dl olanlar diyabetli olarak kabul edildi. Sıçanlar rastgele 6 gruba ayrıldı. 8 hafta boyunca sıçanlara oral gavaj yoluyla taşıyıcı (serum fizyolojik (SF), 5 ml/kg) veya UDKA (20 mg/kg/gün veya 80 mg/kg/gün) uygulaması yapıldı. Uygulamanın yapıldığı gün 0. gün olarak kabul edildi (Şekil 15). İlacın uygulama yolu, dozu ve süresi daha önceki çalışmalardan faydalanılarak belirlendi (108, 109). Literatür ışığında 20 ve 80 mg/kg olarak seçilen tedavi dozları sırasıyla düşük ve yüksek doz şeklinde düşünülerek tercih edildi.



Şekil 15. Deney metodolojisi

3.2.1. Deney Grupları ve Protokolleri

Çalışma kapsamında planlanan deney grupları ve tedavi protokolleri Tablo 6'da gösterilmiştir. Fonksiyonel analizler için intrakavernöz basınç (İKB) ve ortalama arteriyel basınç (OAB) ölçümü yapıldı. Ardından sıçanlar sakrifiye edilip, çıkarılan penil dokuların bir kısmı (distal kısım) histopatolojik analizler için %10'luk formalin solüsyonunda fikse edilirken, proksimal kısmı moleküler analizler için uygun şartlarda (-80°C'de) saklandı. Deney süresince sıçanların vücut ağırlıkları (haftalık olarak) ve kan şekeri ölçümleri (0, 28 ve 56. gün) kaydedildi. Tüm cerrahi uygulamalar, ilaç tedavileri ve diğer işlemler, günün aynı saatinde aynı kişiler tarafından yapıldı.

Tablo 6. Deney grupları ve tedavi protokolleri

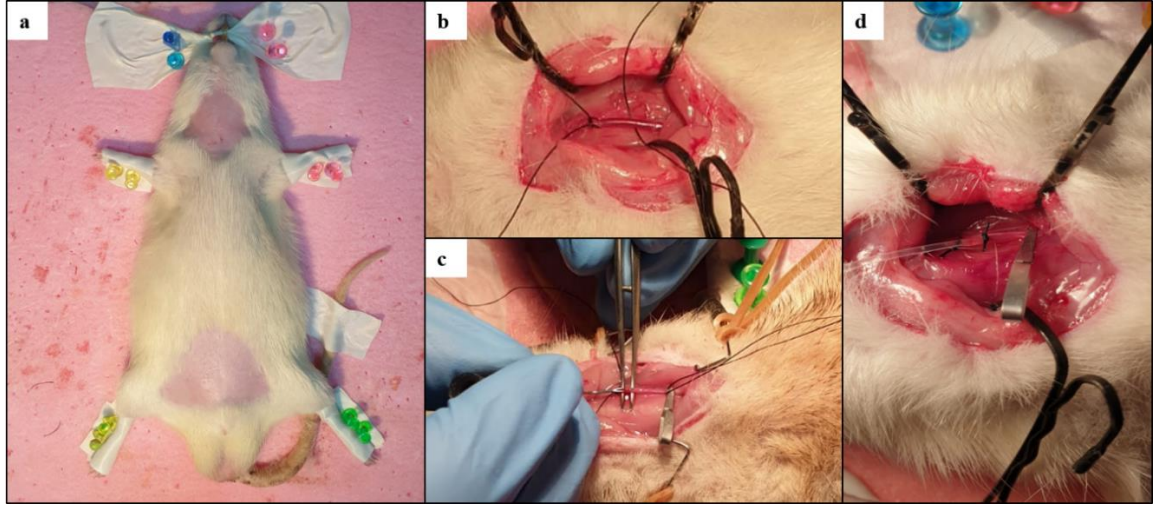
Deney Grupları	n (0. gün)	n (56.gün)
Kontrol + SF (% 0.9 NaCl, oral gavaj)	6	6
UDKA (20 mg/kg, oral gavaj)	6	6
UDKA (80 mg/kg, oral gavaj)	6	6
Diyabet + SF (% 0.9 NaCl, oral gavaj)	10	8
Diyabet + UDKA (20 mg/kg, oral gavaj)	10	7
Diyabet + UDKA (80 mg/kg, oral gavaj)	10	7
Toplam sıçan sayısı:	48	40

3.2.2. UDKA Çözeltisinin Hazırlanması

20 mg/kg ve 80 mg/kg UDKA uygulaması için taşıyıcı olarak SF çözeltisi kullanıldı. UDKA, Ursofalk kapsül (Ali Raif İlaç San. A.Ş.) içerisinden toz şeklinde alınıp SF içerisinde çözündürülerek uygulama günleri taze olarak hazırlandı. Kapsül şeklindeki ilaç deney gününe kadar 25°C'lik oda sıcaklığında muhafaza edildi. Oral gavaj volümlerinin standardizasyonu sıçanların vücut ağırlığına göre her 100 g için 0.5 ml olacak şekilde belirlendi.

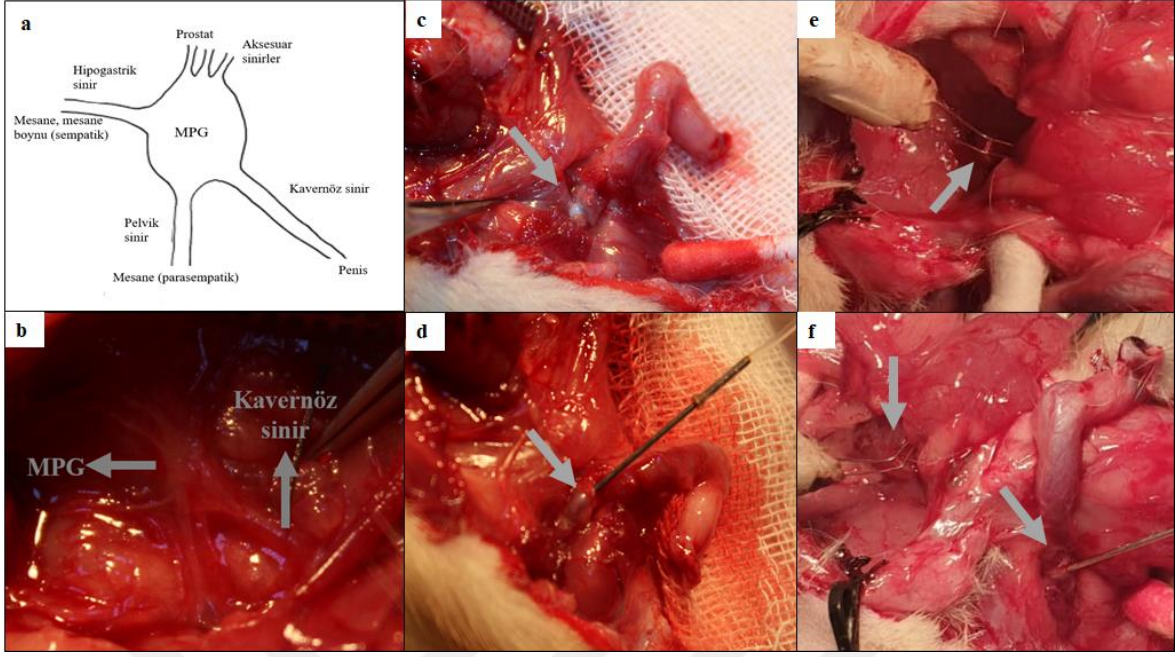
3.2.3. Fonksiyonel Ölçümler

Ölçümden bir gün önce operasyon odası ve ekipmanlar hazırlandı. Ardından sıçanlar, ortama adapte olabilmeleri için deneyin yapılacağı gün deney başlamadan 2 saat önce operasyon odasına alındı ve tartıldı. İKB fonksiyonu, sistemik kan basıncına göre değerlendirildiği için İKB ile eş zamanlı olarak OAB ölçüldü. Bu amaçla sıçanlara ketamin (80 mg/kg, i.p) ve ksilazin (10 mg/kg i.p.) anestezisi uygulandı. Anestezi derinliğinin sağlanması ardından sıçanlar supin pozisyonunda diseksiyon tablasına sabitlendi ve ilgili kısımdaki kıllar dikkatlice kesilerek bölge antiseptik povidon iyot çözeltisi ile sterilize edildi (Resim 1a). Kısa bir boyun derisi insizyonu sonrasında sternoid kas tespit edilerek ayrıldı. Pens yardımıyla başta vagus sinir olmak üzere diğer sinir demetlerine zarar vermeden sol karotid arter izole edildi. Karotid arterin kraniyal ucuna, kraniyal kan akımının kesilmesi amacıyla Resim 1b'de görüldüğü gibi 4.0 nolu cerrahi iplik yardımıyla ligasyon yapıldı. Dikkatlice gerdirilen arter, ligasyon bölgesinin 1.5 cm aşağısından ince bir damar klemp'i yardımıyla sıkıştırıldı, böylece bu bölgedeki kan akımı tamamen durdurulmuş oldu. 22-G nolu enjektör ucu ile karotid arterin kraniyel ligasyon bölgesine yakın olan ucundan kan akımına karşı olacak şekilde 15-30 derecelik bir açıyla küçük bir delik açılarak bir basınç transdüserine bağlı olan ve 250 ünite/mL heparinli SF içeren polietilen (PE-50) kanül artere yerleştirildi (Resim 1c). Ardından karotid arterin kanüle edilen kısmı 4.0 nolu cerrahi iplikle sıkı bir şekilde bağlandı (Resim 1d). Kan akımının yeniden sağlanması sonrasında OAB ölçümünün alınabilmesi amacıyla yerleştirilen klemp dikkatlice çıkarılarak SF ile ıslatılmış steril gazlı bez ile ilgili bölge örtüldü.



Resim 1. *İn vivo* OAB ölçümü **a)** Supin pozisyonu, **b)** Sol karotid arterin tespiti ve kraniyal ucunun ligasyonu, **c)** 22-G enjektör ucu ile karotid artere girilmesi, **d)** PE-50 kanülün karotid artere yerleştirildikten sonra sabitlenmesi.

İKB ölçümü için ise sıçanın traşlanan abdominal bölgesine küçük bir insizyon yapıldı. Mesane tespit edilip sabitlenerek, testisler ve çevre dokuları üst abdomene alındı. Prostat bezinin dorsalateralinde yer alan sağ kavernöz sinir tespit edilip dikkatlice izole edildi (Resim 2b). Alt abdomen dikkatli kesilerle açıldıktan sonra penis çevre dokulardan izole edilerek serbestleştirildi. İnce bir cerrahi makas yardımıyla iskiokavernöz kas ayrıldıktan sonra sağ korpus kavernoza tespit edildi (Resim 2c). Serbest haldeki penis, pens yardımıyla yatay duruma getirilip sabitlendikten sonra bir ucu basınç transduserine bağlı 27-G enjektör ucu bulunan polivinil kanül sağ korpus kavernoza yerleştirildi (Resim 2d). Dışarıya doğru sızıntı olup olmadığının doğrulanması amacıyla kanülden az miktarda 250 U/mL heparinli SF dokuya gönderildi. Ardından küçük bir pens yardımıyla sağ kavernöz sinir stimülatöre bağlı olan platin bipolar elektrodlar üzerinde sabitlendi (Resim 2e). Kavernöz sinirin elektriksel uyarılmasına bağlı oluşan İKB değişiklikleri, uygulanan farklı elektriksel uyarı parametrelerine [1-4-8 volt (V), frekans 16-Hz, birim uyarı süresi 1 milisaniye (msn) ve uyarı süresi 60 saniye (sn)] cevap olarak değerlendirildi (Resim 2f). Elektriksel stimülasyonlar 3 dk arayla ardışık uygulandı. Deney boyunca veriler sisteme kaydedildi.



Resim 2. *İn vivo* İKB ölçümü. **a)** MPG ve kavernöz sinirin şematik gösterimi, **b)** Sağ MPG ve kavernöz sinirin tespiti, **c)** İskiokavernöz kasın eliminasyonunu takiben *tunica albuginea* ile sarılı olan sağ korpus kavernozumun tespiti, **d)** PE-50 kanülün korpus kavernozuma yerleştirilmesi, **e)** Çevre dokulardan izole edilmiş sağ kavernöz sinirin stimülatöre bağlı olan platin bipolar elektrodlar üzerinde sabitlenmesi, **f)** Elektriksel stimülasyon sırasında İKB ölçümünün alınması.

3.2.4. Dokuların İzole Edilmesi

Fonksiyonel ölçümlerin bitiminde penis izole edildi. Çevre dokulardan temizlenen penil doku örneklerinin distal kısmından 0.5 cm boyunda enine sirküler kesitler alındı. Histopatolojik parametrelerin çalışılması amacı ile alınan doku örnekleri, hızlı bir şekilde trimlendikten sonra, içerisinde yeteri miktarda %10'luk nötral tamponlu formaldehit solüsyonu bulunan kaplarda fikse edildi. Penisin proksimal kısmı ise moleküler analizlerde kullanılmak amacıyla sıvı azotta hızlı bir şekilde dondurularak deney gününe kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Sıçanların ölümü, eksanguinasyon (kansızlaştırma) yöntemiyle gerçekleştirildi.

3.2.5. Western Blot Yöntemi ile Moleküler İncelemeler

3.2.5.1. Doku Homojenizasyonu

Penil doku örnekleri, buz üzerinde 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)] içeren tüplerde cerrahi makas yardımıyla mekanik parçalama işlemine tabi tutuldu. Ardından buzlu ortamdaki tüpler homojenizatör ile 2×10^4 rpm devirde 10'ar sn 5 tekrar olacak şekilde (5sn interval ile) homojenize edildi. +4 °C'de 16000xg'de 10 dk'lık santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Buz üzerine alınan süpernatant kısımlar epondorflar içerisinde hızlıca alikotlanarak (küçük hacimlerde) -80 °C'de saklandı.

3.2.5.2. Total Protein Miktar Tayini

Süpernatantların total protein konsantrasyonu Qubit® Protein Assay Kits (bovin serum albümin (BSA) standartlarını (0, 200, 400 ng/mL) içeren kit) ve Qubit® 3.0 florometre cihazı kullanılarak ölçüldü. 0.5 mL tüplere koyulan 10µl'lik doku homojenatları ile BSA standartları üzerine seyreltme tamponu ile 1:200 oranında dilüe edilen test reaktifi eklendi. Ardından elde edilen çözelti vorteksenerek 25°C'de/karanlıkta 15 dk inkübe edildi. 485/590 nm dalga boyunda renk değişim yoğunluğuna bağlı absorbans değerleri ölçülen numune örnekleri ve standartlardan faydalanılarak konsantrasyon/absorbans grafiği elde edildi. Hesaplanan grafik denklemi ile örneklerin protein miktarları mg/mL cinsinden belirlendi.

3.2.5.3. Protein Denatürasyonu ve Örneklerin Yükleme için Hazırlanması

Total protein içeriği 20 µg olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine alınan doku homojenatlarına 5 µL 4X NuPAGE LDS Sample Buffer (lityum dodesil sülfat (LDS), pH 8.5, SERVA mavisi G250 ve fenol kırmızısı), 2 µL 10X NuPAGE Sample Reducing Agent (500 mM ditiotreitol) ve son hacim 20 µL olacak şekilde distile su ilave edildi. 70°C'de 10 dk inkübe edilen çözelti denatüre edildi. Vorteksleme işlemi ardından 2-3 sn'lik santrifüjleme ile örnekler jel elektroforezi için hazır hale getirildi.

3.2.5.4. Örneklerin Yüklenmesi ve SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Elektroforez tankı içerisine XCell SureLock dikey jel aparatının yerleştirilmesi ardından NuPAGE %4-12'lik Bis-Tris poliakrilamid gradient jelini içeren jel kasetlerine ait jel tarakları dikkatlice çıkarıldı. 500 µL NuPAGE antioxidant içeren 200mL 1X MES yürütme tamponu tankın bir kısmına ilave edildi. Geri kalan kısım 600 mL 1X MES yürütme tamponu ile dolduruldu. İlk ve son bölümüne marker (5 µl) diğer kısımlarına ise örnekler (20) µl gelecek şekilde kuyucuklar yüklendi. Ardından güç kaynağına bağlanan sistem 35 dk boyunca (200 V, 135 amper) yürütüldü. Sonuçta örneklerdeki proteinler, molekül ağırlıklarına (M_A) göre farklı bant yoğunluklarında basamaklı bir şekilde ayrıştırıldı.

3.2.5.5. Proteinlerin Membrana Transfer İşlemi

Elektroforez işleminin tamamlanması ardından kenar bağlantıları temizlenen jeller deiyonize su dolu bir kap içerisinde yıkandı. Jeldeki örnekler, yarı kuru blotting sistemi (iblot transfer kiti) aracılığıyla nitroselüloz membrana transfer edildi. Bu kapsamda jel, cihaza yerleştirilen anot rafı üzerindeki membrana konuldu. Distile suyla yıkanan filtre kağıdı hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek jelin üzerine yerleştirildi. Ardından kitteki katot rafı üzerindeki bakır yüzeyi yukarı, jelimsi yüzeyi ise ıslak filtre kağıdına bakacak şekilde filtre kağıdının üzerine yerleştirildi. Roller yardımıyla hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Kit içerisinde yer alan sünger üzerindeki metal, sistem kapağının sağ tarafında yer alan elektrota denk gelecek şekilde yerleştirildikten sonra cihazın kapağı kapatıldı. Uygun program seçilerek gerçekleştirilen yedi dk'lık transfer işlemi marker bantlarının membrana transfer olduğu gözlenerek doğrulandıktan sonra nitroselüloz membran dikkatlice deiyonize su içerisine alındı.

3.2.5.6. Bloklama ve Yıkama

%0.1 Tween-20 içeren TBS [(20 mM Tris, %0.9 NaCl (pH 7.4)] solüsyonu içine %5'lik BSA (2.5 g BSA, 50 mL %0.1 Tween-20 içeren TBS) eklenerek jelden membrana aktarılan spesifik olmayan bağlanma bölgeleri bloklama ile kapatıldı. Nitroselüloz membran, 10 mL %5'lik BSA bloklama çözeltisi içerisine koyularak çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi. Bloklama işleminin ardından membran, %0.1 Tween-20 içeren TBS solüsyonu içerisinde 5 dk boyunca 3 kez hafifçe çalkalanarak yıkandı.

3.2.5.7. Primer Antikor ile İnkübasyon ve Yıkama

Primer antikor olarak kullanılan antikorlar; anti-beta aktin antikor (1:1000), anti-fibronektin antikor (1:1000), anti-pSmad2(Ser^{465/467}) antikor (1:1000), anti-Smad2/3 antikor (1:1000), anti-SMAD7 antikor (1:1000), anti-CTGF antikor (1:1000) ve anti-TGF- β 1 antikor (1:1000) şeklinde belirtilen dilüsyon oranlarında hazırlandı. 1000 katlık seyreltme işlemi için primer antikorların 10 μ L'sine 9.990 μ L %5'lik BSA bloklama çözeltisi eklendi. Yıkama solüsyonunun uzaklaştırılmasının ardından membran, 10 mL dilüe edilmiş primer antikor içerisinde bir gece boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ardından membran, oda sıcaklığında 120 dk boyunca çalkalayıcıda hafifçe çalkalanarak inkübasyona devam edildi. İnkübasyon bittikten sonra primer antikoru uzaklaştırılması amacıyla membran, yıkama solüsyonu içerisinde 5 dk boyunca 3 kez çalkalayıcıda hafifçe çalkalanarak yıkandı.

3.2.5.8. Sekonder Antikor ile İnkübasyon ve Yıkama

Sekonder antikor (anti-goat IgG HRP-linked antikor), %5'lik BSA bloklama solüsyonu ile üretici firmanın kullanım klavuzu doğrultusunda 10.000 kat dilüe edildi. 10.000 katlık dilüe işlemi için sekonder antikorun 1 µL'sine 9.999 µl %5'lik BSA bloklama çözeltisi eklendi. Yıkama solüsyonunun uzaklaştırılmasının ardından membran, 10 ml dilüe edilmiş sekonder antikor içerisinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından sekonder antikorun uzaklaştırılması amacıyla membran, yıkama solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında 3 kez 5 dk boyunca hafifçe çalkalanarak yıkandı.

3.2.5.9. Görüntüleme

6 ml ECL Solüsyonu (NZY Supreme ECL HRP Substrat) içerisinde görüntüleme cihazına yerleştirilen membranlardaki protein bantları görünür hale getirilerek elde edilen ışıma CCD kamera ile kaydedildi. Image 3 yazılımı aracılığıyla dansitometrik olarak hesaplanan relatif bant yoğunluğu, aynı membrandaki standart protein (β-aktin) bant yoğunluğu ile oranlanarak belirlendi.

3.2.6. Histopatolojik İnceleme

STZ modeli ile indüklenen ED sonrası penil dokudaki histopatolojik değişikliklerin zamana bağlı olarak incelenmesi ve uygulanan tedavi protokolünün bu süreçte olan etkisinin değerlendirilmesi amacıyla Masson Trikrom Boyama (MTB) yöntemi kullanıldı.

3.2.6.1. Fiksasyon ve Dehidratasyon

Yaklaşık 48 saatlik fiksasyonu takiben doku takip kasetlerine yerleştirilen penil doku kesitleri formaldehit solüsyonunun uzaklaştırılması amacıyla musluk suyunda yıkandı (12 saat boyunca). Ardından dehidratasyon amacıyla dokuların her biri yaklaşık 1 saat süren artan dereceli alkol serilerinden (sırasıyla %70, %90, %96 ve absöü alkol) geçirilerek dokulardaki su ve alkolün yer değıştirilmesi sağlandı.

3.2.6.2. Saydamlaştırma ve Parafinizasyon

Doku örneklerindeki alkolün uzaklaştırılıp yerine ksilenin geçmesi prensibine dayanan saydamlaştırma işlemi ardından örnekler yaklaşık 60 °C'lik etüvde eriyik halde bulunan parafinde 2 saat bekletildi. Doku takip kasetlerindeki eriyik parafine gömülerek oda sıcaklığında bir müddet saklanarak kolay kesilebilmeleri amacıyla buzdolabında donmaya bırakıldı. Ksilen ve parafinin yer değıştirilmesi ile dokular daha kolay kesilebilir sertlik ve saydamlığa getirildi.

3.2.6.3. Blok Hazırlama ve Kesit Alma

Yarı otomatik mikrotoma yerleştirilen parafin bloklardan, tıraşlama işleminin ardından lam üzerine 5 mikrometre (μm) kalınlığında seri kesitler alındı. Ardından kırışıklıkların giderilmesi amacıyla 37°C 'lik su banyosuna konulan dokular lam üzerine alındı.

3.2.6.4. Deparafinizasyon ve Boyama

Alınan kesitler 60°C 'lik etüvde fiziksel deparafinizasyona tabi tutulduktan sonra ksilen yardımıyla kimyasal deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan dereceli alkol serilerine tabi tutularak hidrate edilen doku kesitleri distile sudan geçirilerek boyamaya hazır hale getirildi. Dokulardaki düz kas ve bağ doku/kolajen seviyelerinin değerlendirilmesi amacıyla GBL Masson Trikrom Boyama Seti kullanıldı. Doku kesitleri üretici firmanın boyama prosedürü doğrultusunda boyandı. Artan dereceli alkol serileri ile yenilenen dehidrasyon sonrasında tekrar ksilenle muamele edilen boyalı kesitlere kapatma medyumunu olan entellan (Kanada balsamı) damlatıldı. Lamelle kapatılan boyalı kesitler (hava kabarcığı kalmayacak şekilde) kurumaya bırakıldı. Mikroskopik incelemeler için hazır hale getirilen boyalı kesitlerdeki düz kas ve kolajen/bağ doku içeriğinin sırasıyla kırmızı ve maviye boyandığı, sinüzoidal boşlukların ise şeffaf görünümlü olduğu gözlemlendi.

3.2.6.5. Mikroskopik İnceleme

Doku kesitlerinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi ardından mikroskoba bağlı kamera ile fotoğrafları çekildi. Histopatolojik inceleme kapsamında preparatlarda korporal doku morfolojisi ve fibrozis gelişim sürecinin incelenmesi amacıyla her sıçana ait penis kesitindeki korpus kavernozumlar; bağ doku/kolajen ve düz kas (sırasıyla mavi ve kırmızı renkli) miktarı ve yapısal bütünlük açısından değerlendirildi. 'Analysis 5 Research' (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak değerlendirme yapıldı. Bu kapsamda kesitlerdeki bağ doku ve kolajen içeriği; 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 skorlanırken düz kas içeriği de; 0: Normal (Azalma yok), 1: Hafif derecede azalma, 2: Orta derecede azalma, 3: İleri derecede azalma şeklinde semi-kantitatif olarak skorlandı (114).

3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda grup başına düşen hayvan sayısı uygulanan modele bağlı ölüm riski göz önünde bulundurularak NC3Rs Arrive Guideline'a göre belirlendi. Bu doğrultuda, istatistiksel anlamlılığının da güçlendirilmesi amacıyla (0.8-0.85 güç ve 0.05 oranında tip 1 hata olasılığı) nondiyabetik gruplarda n=6, diyabetik gruplarda ise n=10 olarak tasarlandı (115). Tüm sonuçlar 'aritmetik ortalama değer $\pm$ standart hata' şeklinde sunuldu. Eldeki verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Sıçanların vücut ağırlıkları (g), açlık kan glukoz düzeyleri (g/dl), bazal İKB (mmHg) ve OAB ölçümlerinin (mmHg) değerlendirilmesi tek yönlü ANOVA analizini takiben *post hoc* Tukey testi ile yapıldı. Fonksiyonel verilerin (m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB) tek yönlü ANOVA analizini takiben *post hoc* Dunnett's testi ile değerlendirilmesi ardından iki grup arasındaki farkın belirlenmesi için student t-testi kullanıldı. Gruplar arasındaki moleküler ve histopatolojik sonuçların semikantitatif değerlendirilmesinde student-t testi kullanıldı. Tüm deneysel veriler 'GraphPad Prism 5' programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0.05$ ise gruplar arası fark anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlıkları ve Açlık Kan Glukoz Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Genel sağlık durumlarının değerlendirilmesi amacıyla yapılan periyodik gözlemlerde, diyabet gruplarının günlük su tüketimlerinin kontrol gruplarına kıyasla daha fazla olduğu gözlemlendi. Deney süresince diyabetik grupta iki, diyabetik tedavi gruplarında ise üçer ölüm tespit edildi. Deney protokolleri boyunca haftalık olarak ölçülen sıçan vücut ağırlıklarından 0, 28 ve 56. gün değerleri Tablo 7’de, ayda bir ölçülen kan glukoz düzeylerinden 0, 28 ve 56. gün değerleri ise Tablo 8’de sunuldu. Tedavi edilen ve edilmeyen tüm diyabetik sıçanların vücut ağırlığı ortalaması, kontrol grubundaki sıçanlarla karşılaştırıldığında zamana bağımlı şekilde anlamlı düşük bulundu. UDKA, bu parametreler üzerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadı (Şekil 16). Diyabetik gruplardaki kan glukoz seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış gösterdi. 20 ve 80 mg/kg UDKA uygulanan sıçanların kan glukoz düzeyleri, diyabet grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulundu (Şekil 17).

Tablo 7. Deney gruplarına ait ortalama vücut ağırlıkları

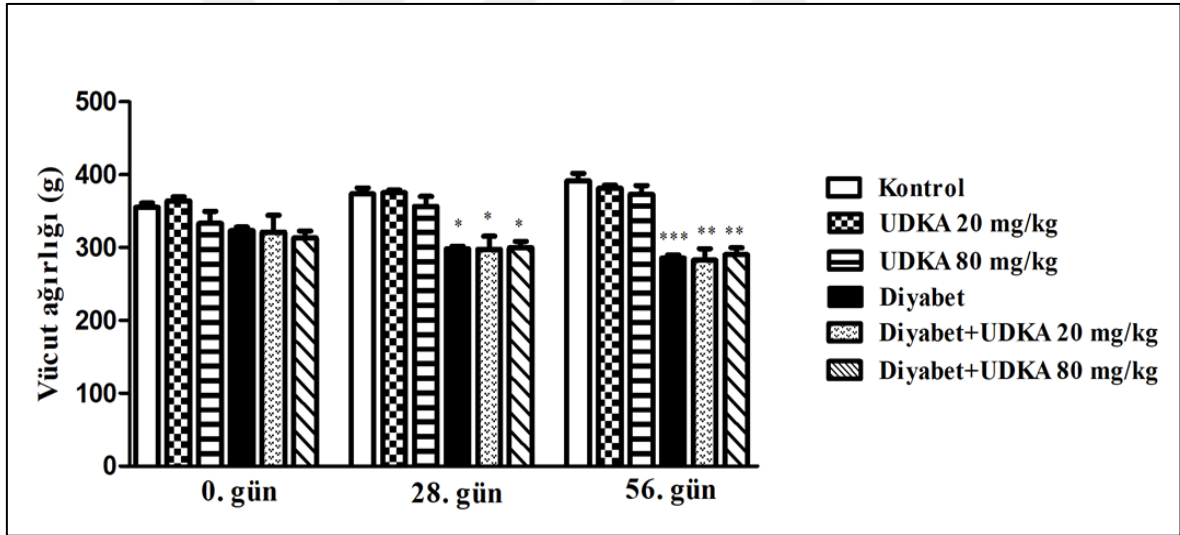
Vücut Ağırlığı (g)	0. Gün	28. Gün	56. Gün
Kontrol (n=6)	355.0 ± 6.19	373.5 ± 8.55	391.5 ± 10.58
UDKA 20mg/kg (n=6)	364.0 ± 5.78	375.0 ± 3.88	381.6 ± 4.13
UDKA 80mg/kg (n=6)	333.0 ± 16.91	356.6 ± 13.64	373.2 ± 12.08
Diyabet (n=8)	323.0 ± 5.04	298.3 ± 3.48*	285.5 ± 4.38***
Diyabet+UDKA 20mg/kg (n=7)	321.2 ± 23.00	297.5 ± 17.94*	282.8 ± 15.74***
Diyabet+UDKA 80mg/kg (n=7)	313.3 ± 9.62	299.9 ± 8.50*	290.3 ± 9.55***

*p<0.05 ve *** p<0.001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

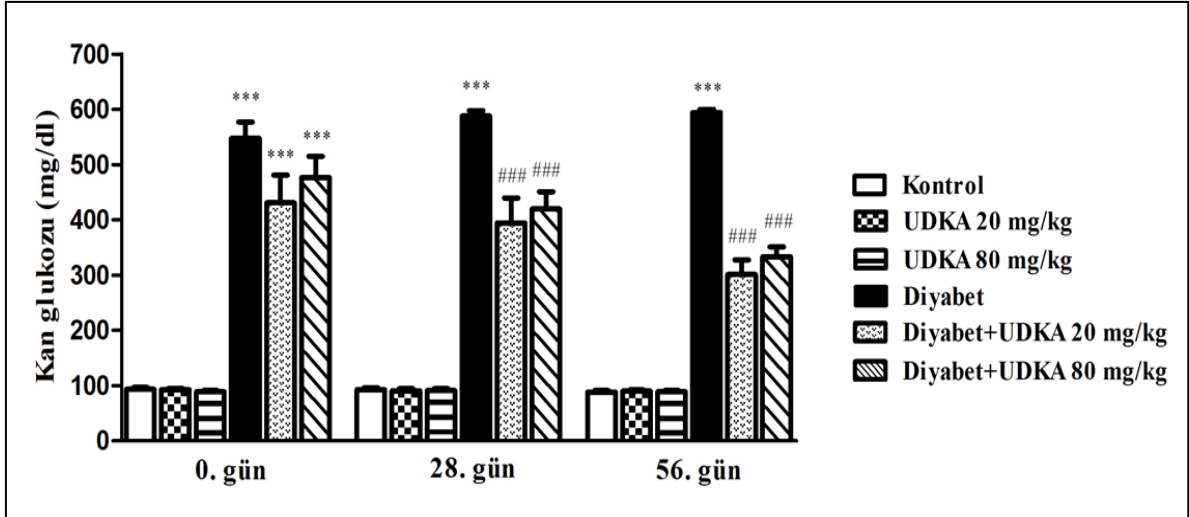
Tablo 8. Deney gruplarına ait ortalama açlık kan glukoz düzeyleri

Kan şekeri (g/dl)	0. Gün	28. Gün	56. Gün
Kontrol (n=6)	93.33 ± 3.22	92.83 ± 2.98	88.00 ± 2.78
UDKA 20mg/kg (n=6)	92.60 ± 2.50	90.60 ± 3.70	90.20 ± 2.22
UDKA 80mg/kg (n=6)	88.80 ± 2.39	91.20 ± 3.45	89.00 ± 2.12
Diyabet (n=8)	547.5 ± 29.70***	587.6 ± 10.11***	594.5 ± 5.50***
Diyabet+UDKA 20mg/kg (n=7)	431.0 ± 49.60***	394.3 ± 45.42###	300.8 ± 26.77###
Diyabet+UDKA 80mg/kg (n=7)	476.1 ± 38.42***	419.9 ± 31.22###	333.3 ± 17.55###

*** p<0.001 Kontrol grubu ile; ### p<0.001 Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.



Şekil 16. Deney protokolü süresince deney gruplarına ait ortalama vücut ağırlık değişimleri. *p<0.05, **p<0.01 *** p<0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.



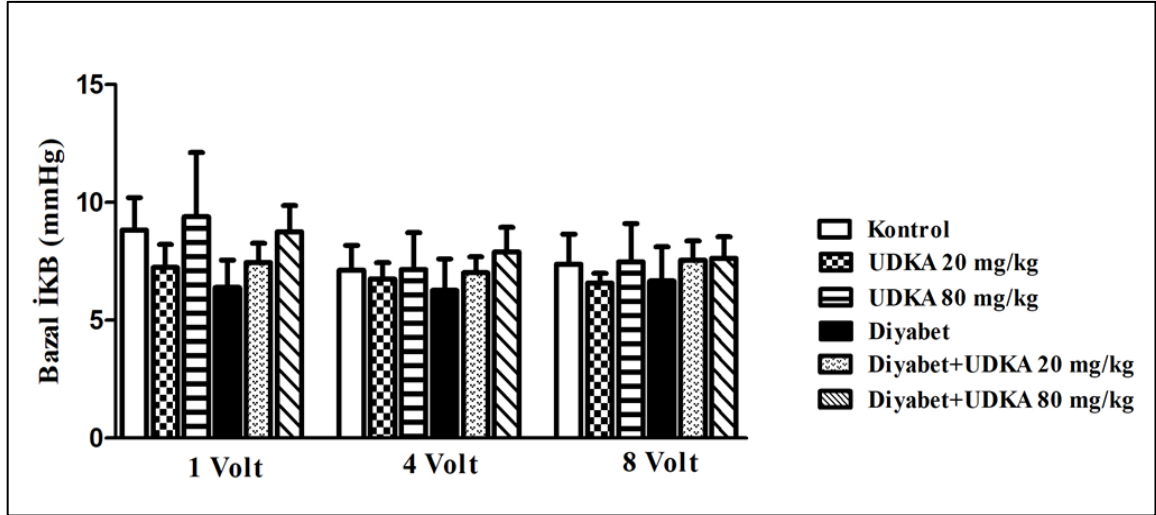
Şekil 17. Deney protokolü süresince deney gruplarına ait açlık kan glukoz düzeyi değişimleri. *** $p<0.001$ kontrol grubu ile, ### $p<0.001$ diyabet grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

4.2. Fonksiyonel Verilerin Değerlendirilmesi

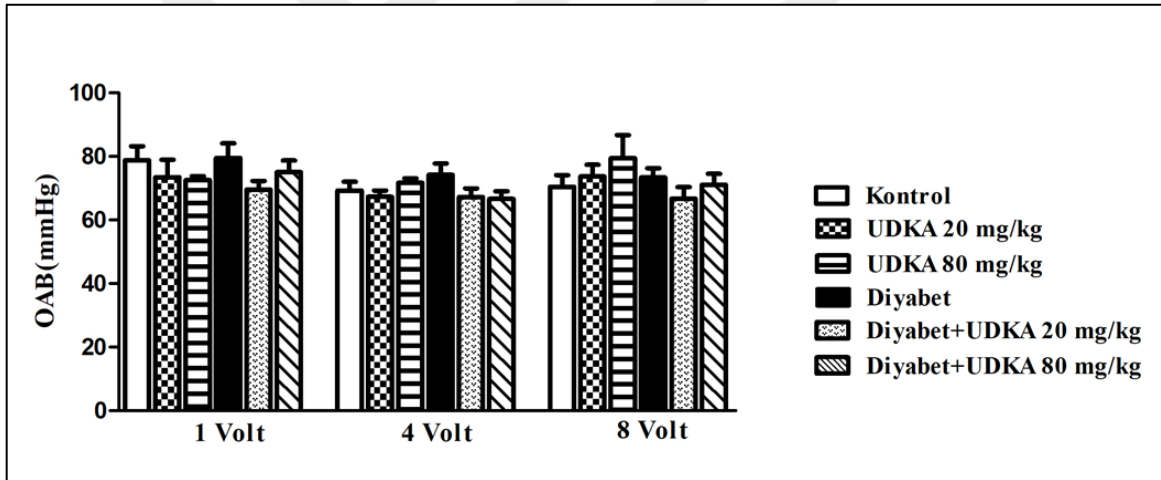
Deney gruplarına ait *in vivo* çalışmalarda, kavernoöz sinirin elektriksel stimülasyonu sırasında eş zamanlı İKB ve OAB değişiklikleri ölçüldü. UDKA tedavisinin STZ ile indüklenen deneysel ED üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB oranları hesaplandı.

4.2.1. Bazal İKB ve OAB Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

Kontrol ve diyabet gruplarındaki sıçanların 1, 4 ve 8 voltluk stimülasyonlar öncesindeki OAB değerleri ile bazal İKB değerleri gruplar arasında anlamlı fark göstermedi (Şekil 18 ve 19).



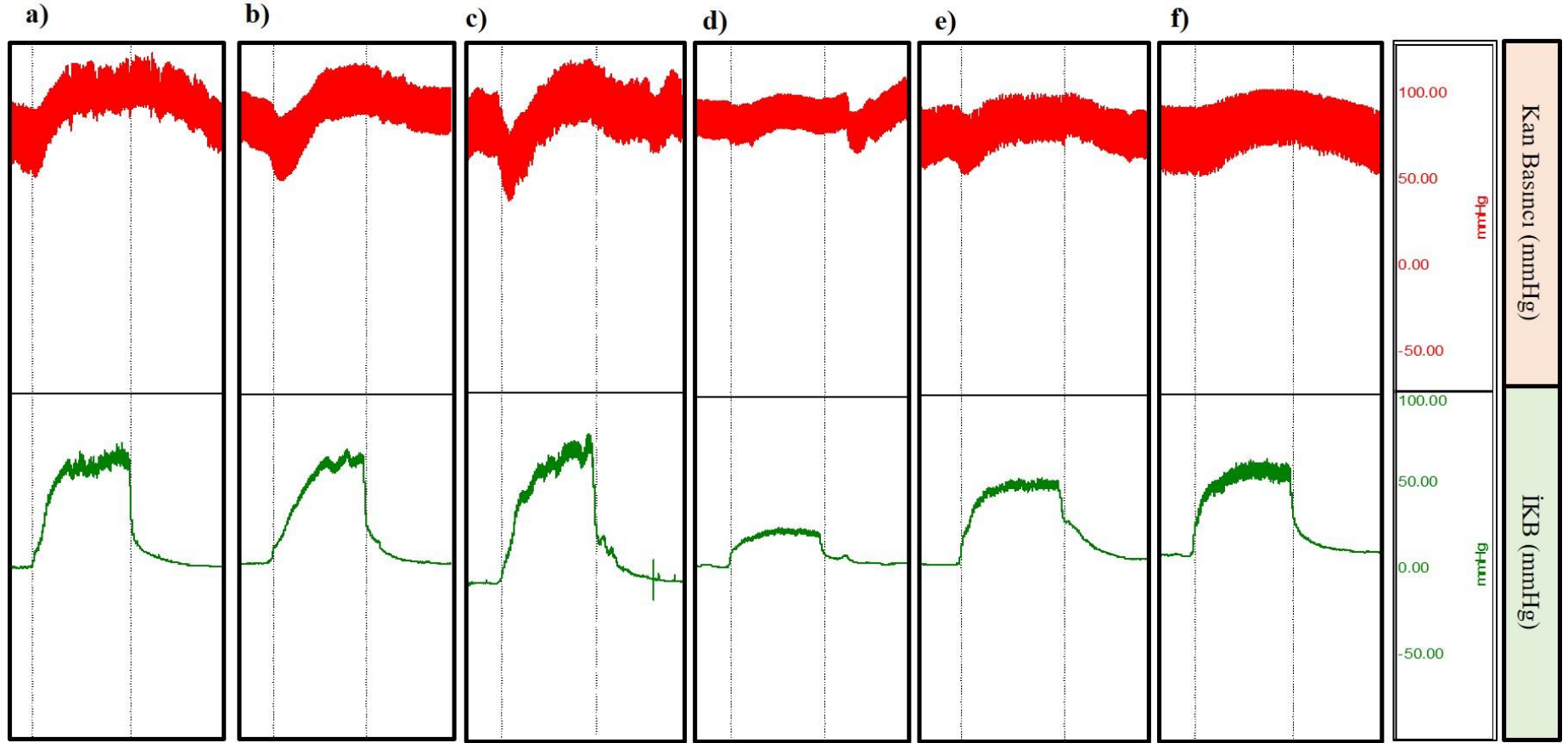
Şekil 18. Deney gruplarının elektriksel stimülasyonlar öncesi bazal İKB (mmHg) değerleri ($p>0.05$).



Şekil 19. Deney gruplarının elektriksel stimülasyonlar öncesindeki OAB (mmHg) değerleri ($p>0.05$).

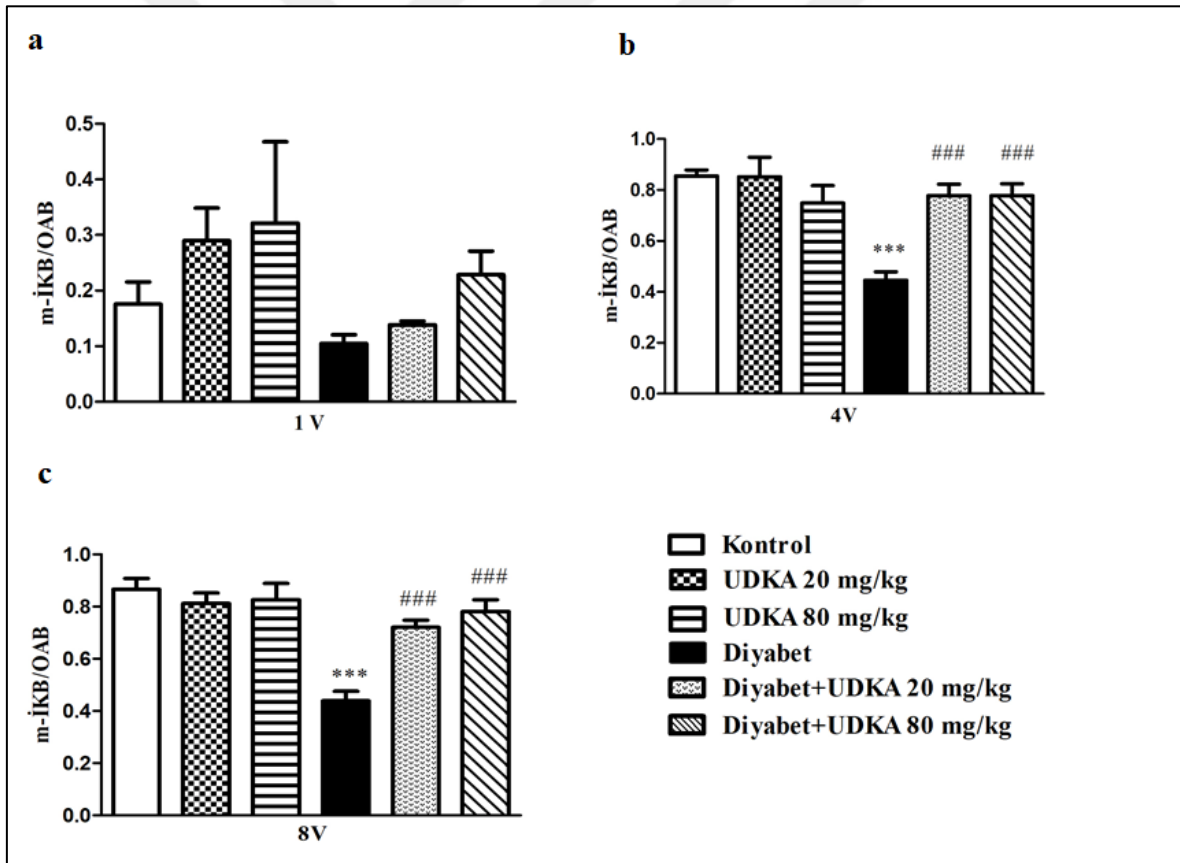
4.2.2. UDKA Tedavisinin STZ ile İndüklenen Diyabete Bağlı Gelişen ED Üzerine Etkisi

STZ ile indüklenen diyabet modelini takiben uygulanan tedavi protokolü ardından ölçülen İKB ve OAB (eş zamanlı) ölçümlerine ait örnek trase görüntüsü Şekil 20’de gösterilmiştir.

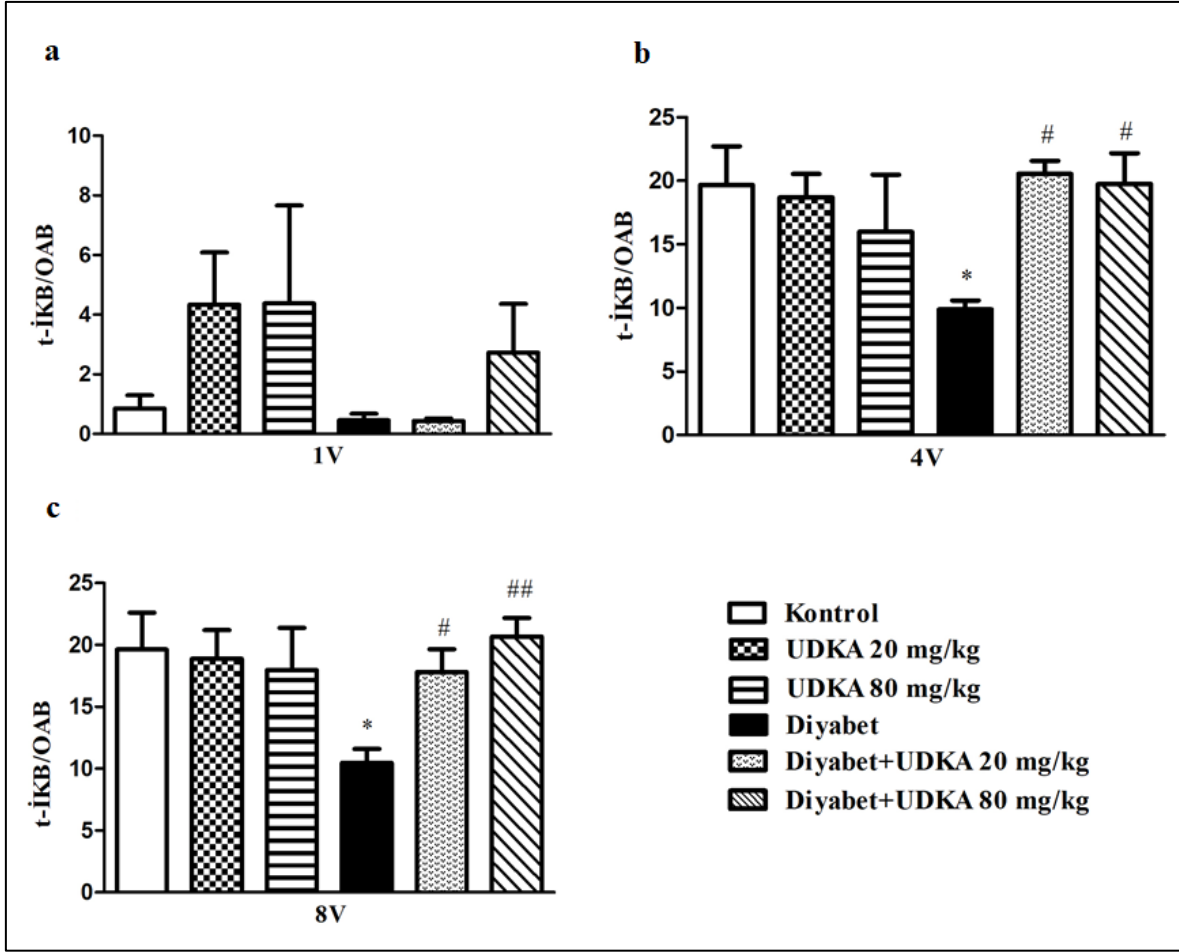


Şekil 20. Kavernöz sinirlerin 1 dk boyunca 8 voltluk stimülasyon sırasında kaydedilen OAB (kırmızı) ve İKB (yeşil) değerleri (ölçek aralık 60 sn). **a)** Kontrol **b)** UDKA 20 mg/kg **c)** UDKA 80 mg/kg **d)** Diyabet **e)** Diyabet+UDKA 20 mg/kg **f)** Diyabet+UDKA 80 mg/kg.

8 haftalık deney protokolü sonunda kavernöz sinire uygulanan 1 voltluk elektriksel alan stimülasyonu sonucu elde edilen m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB oranlarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (Şekil 21a ve 22a). 4 ve 8 voltluk stimülasyon sonucu elde edilen m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB oranı ise, diyabet grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (Şekil 21b/c ve 22b/c). UDKA tedavisi alan kontrol gruplarına ait m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerlerinin tedavi almayan kontrol grubu ile istatistiksel olarak benzer olduğu görüldü. Diyabet gruplarında 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi, diyabetle indüklenen m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB oranlarındaki azalmayı anlamlı şekilde önledi. Diyabetik tedavi gruplarında elde edilen m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerleri kontrol grubu ile anlamlı benzerlik gösterdi (Şekil 21 ve 22).



Şekil 21. Kavernöz sinirlere 1'er dk boyunca uygulanan **a)** 1 volt, **b)** 4 volt ve **c)** 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar ile elde edilen m-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması (n=6-8). *** p<0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ### p<0.001 diyabetik grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.



Şekil 22. Kavernöz sinirlere 1'er dk boyunca uygulanan **a)** 1 volt, **b)** 4 volt ve **c)** 8 volt şiddetindeki elektriksel stimülasyonlar ile elde edilen t-İKB/OAB oranlarının karşılaştırılması (n=6-8). *p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, # p<0.05 ve ## p<0.01 diyabet grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

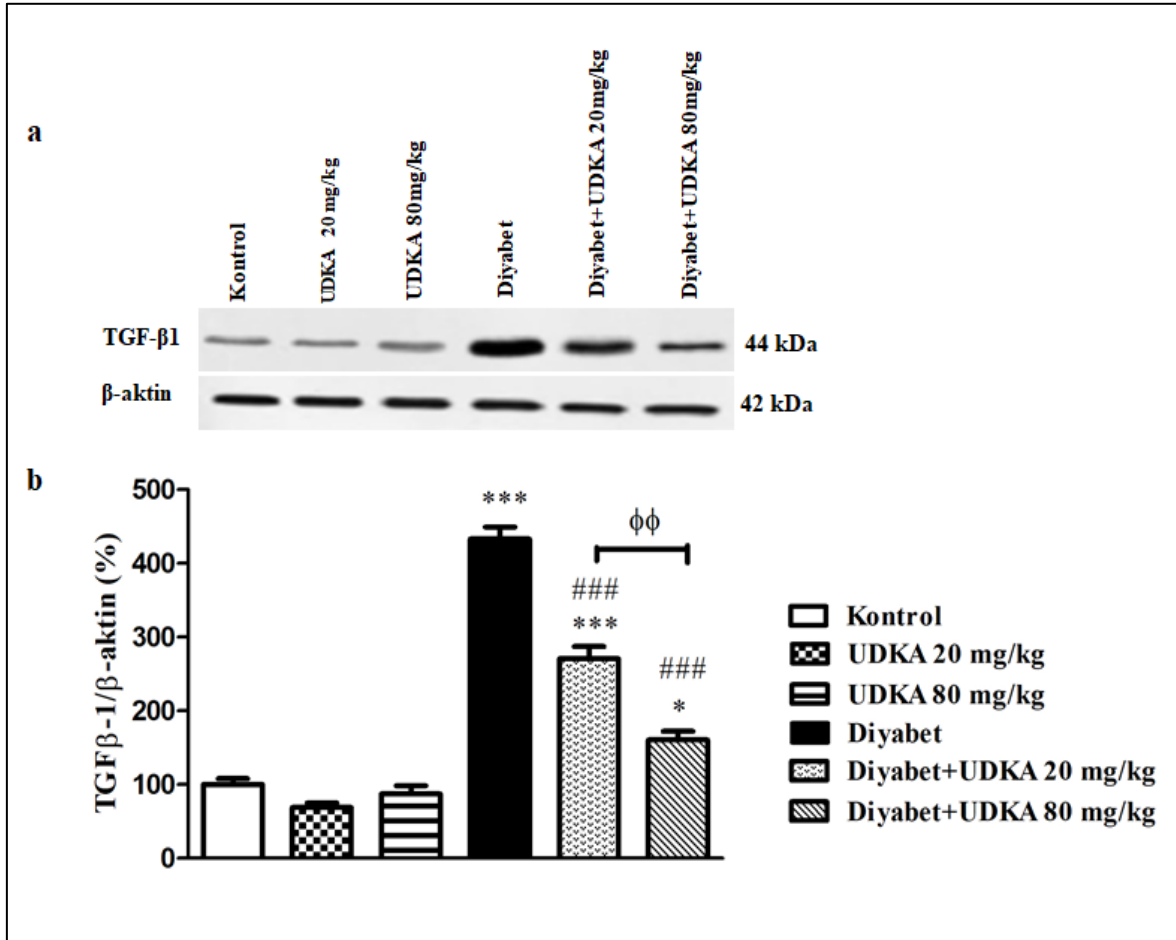
4.3. Kavernozal Dokudaki Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Deney boyunca sıçanlara uygulanan taşıyıcı ve UDKA tedavilerinin ardından toplanan penil doku örneklerinde; TGF- β 1/Smad yolağı elemanlarından olan TGF- β 1, Smad2, Smad3, pSmad2(Ser^{465/467}), Smad7 ve yolağın aktivasyonu sonucu artış gösteren fibronektin ile CTGF protein ekspresyon seviyeleri semi-kantitatif olarak değerlendirildi.

4.3.1. UDKA Tedavisinin TGF- β 1 Protein Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkisi

Diyabet grubunun kavernozal dokularındaki TGF- β 1 protein ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde arttı. 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi alan kontrol grupları ile tedavi almayan kontrol grubu arasında TGF- β 1 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. Diyabet ile indüklenen TGF- β 1 protein ekspresyon

seviyelerindeki artış, 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi alan diyabetik gruplarda, tedavi almayan diyabet grubuna kıyasla istatistiksel olarak doz bağımlı şekilde anlamlı önlenirken; azalan TGF- β 1 düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak benzerlik göstermedi (Şekil 23).

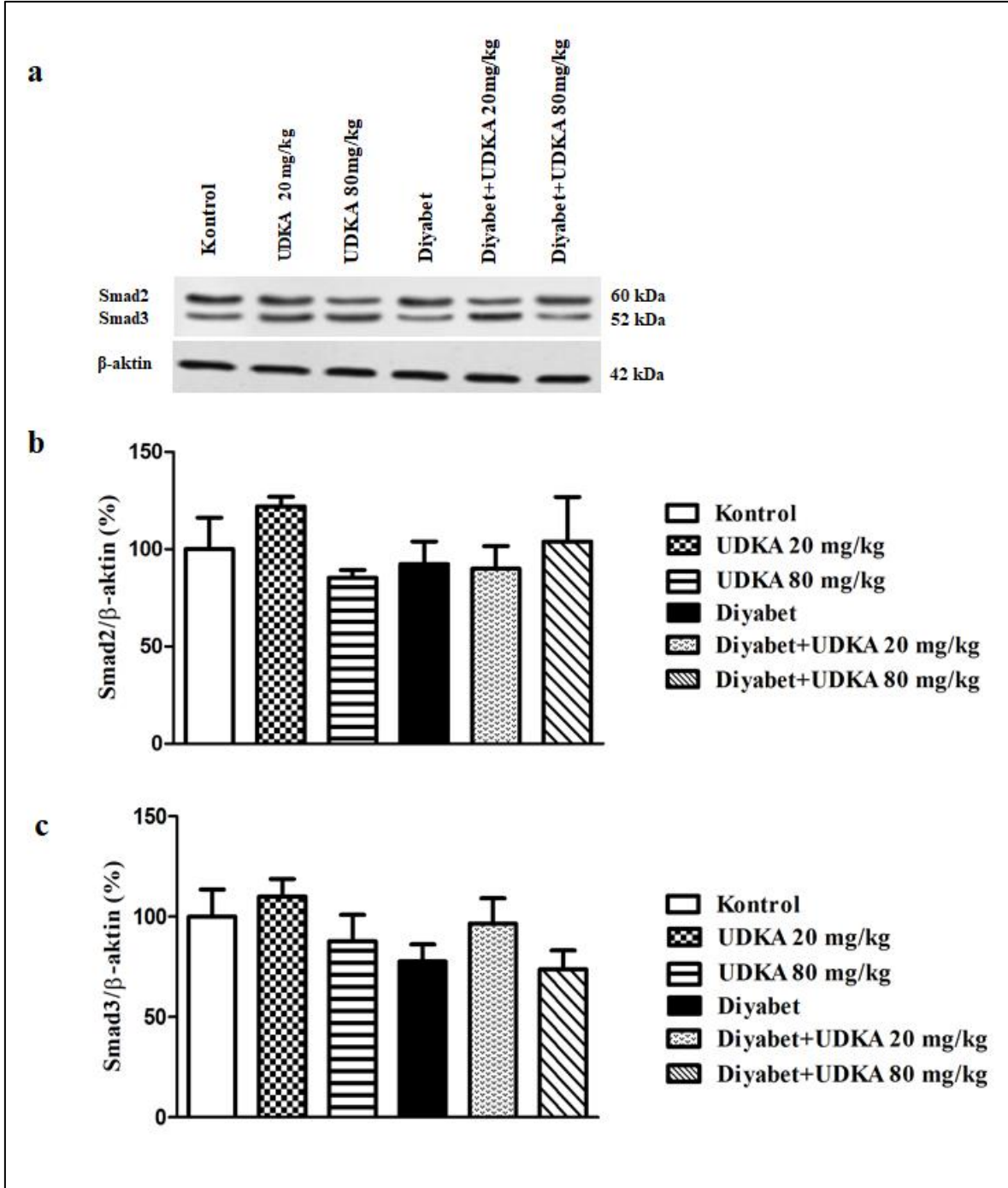


Şekil 23. Deney gruplarına ait **a)** TGF- β 1 & β -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; **b)** TGF- β 1 protein ekspresyonu için yapılan densitometrik analiz sonuçları (n=5). ***p<0.001, *p<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ###p<0.001 diyabet grubuyla karşılaştırıldığında, $\phi\phi$ p<0.01 diyabetik tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

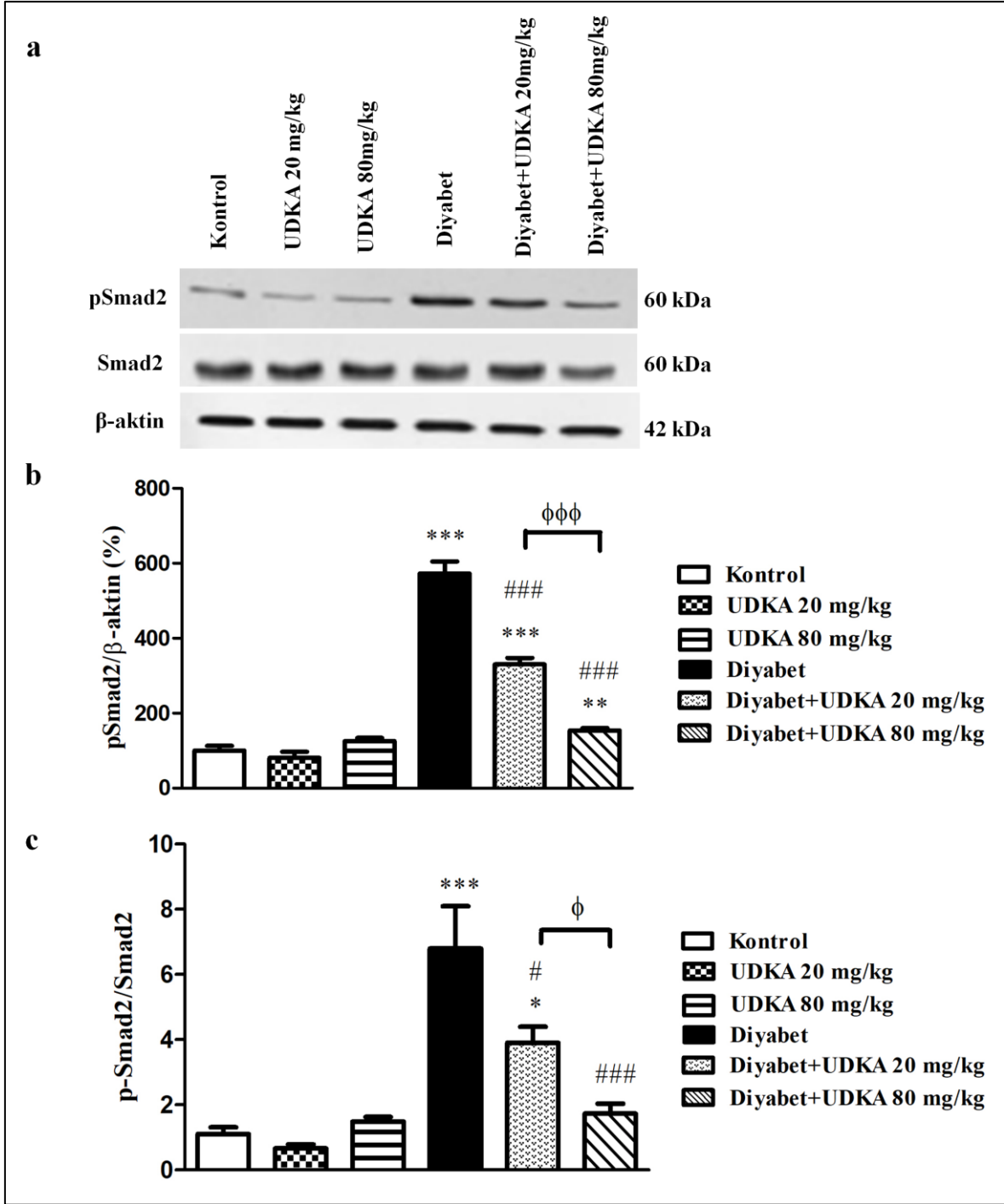
4.3.2. UDKA Tedavisinin pSmad2, Smad2 ve Smad3 Protein Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

Taşıyıcı ve UDKA uygulamalarından sonraki 56. günde, deney grupları arasında Smad2 ve Smad3 protein ekspresyon seviyeleri açısından anlamlı fark bulunmadı (Şekil 24). Smad2 proteininin aktif formu olan pSmad2(Ser^{465/467}) düzeyi diyabet ve diyabetik tedavi

gruplarında kontrol gruplarına göre anlamlı arttı. 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi uygulanan kontrol gruplarına ait pSmad2(Ser^{465/467}) düzeyleri tedavi almayan kontrol grubuna benzer bulundu. 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi, diyabetle indüklenen pSmad2(Ser^{465/467}) seviyelerindeki artışı diyabet grubuyla karşılaştırıldığında doz bağımlı şekilde anlamlı önledi. Ancak, diyabetik tedavi gruplarında azalan pSmad2(Ser^{465/467}) seviyeleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı benzerlik göstermedi (Şekil 25a ve 25b). pSmad2(Ser^{465/467})'nin fosforilasyon derecesini gösteren pSmad2/Smad2 oranı diyabet grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı arttı. Diyabetle artan pSmad2/Smad2 oranı, 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi uygulanan her iki diyabetik grupta da tedavi almayan diyabet grubuna göre anlamlı düşük bulundu. 20 mg/kg UDKA tedavisi alan diyabetik grupta elde edilen pSmad2/Smad2 oranı kontrol grubu ile anlamlı fark gösterirken, 80 mg/kg UDKA tedavisi, diyabetle artan pSmad2/Smad2 oranını istatistiksel olarak anlamlı derecede kontrol düzeyine yakın geri çevirdi (Şekil 25a ve 25c).



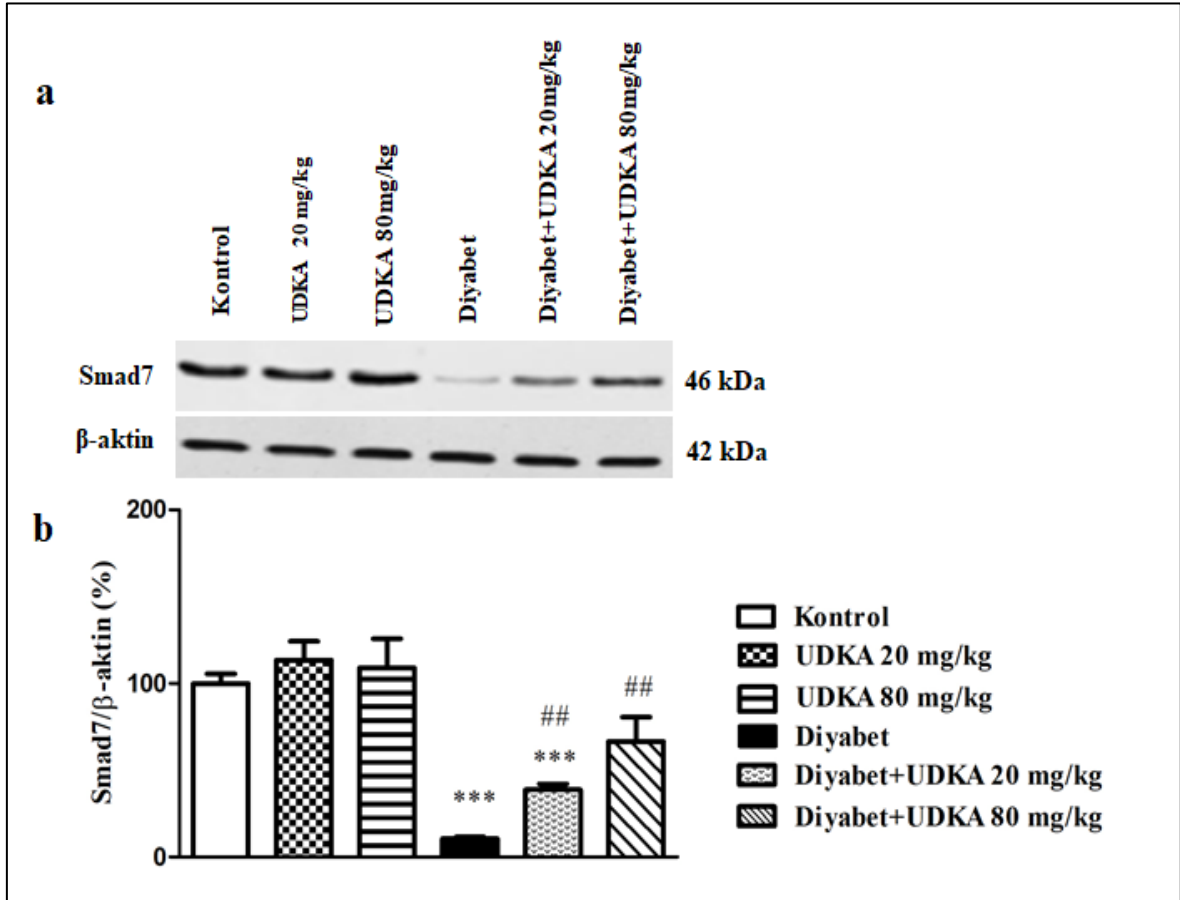
Şekil 24. Deney gruplarında **a)** Smad2, Smad3 ve β -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; **b)** Smad2 ve **c)** Smad3 protein ekspresyonları için yapılan dansitometrik analiz sonuçları ($n=5$, $p>0.05$).



Şekil 25. Deney gruplarında **a)** pSmad2 (Ser465/467) ve β-aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; **b)** pSmad2 protein ekspresyon seviyeleri ve **c)** pSmad2/Smad2 oranları için yapılan dansitometrik analiz sonuçları (n=5). ***p<0.001, **p<0.01 ve *p<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; #p<0.05, ve ###p<0.001 diyabet grubuyla karşılaştırıldığında; ϕp<0.05 ve ϕϕϕp<0.001 diyabetik tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

4.3.3. UDKA Tedavisinin Smad7 Protein Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkisi

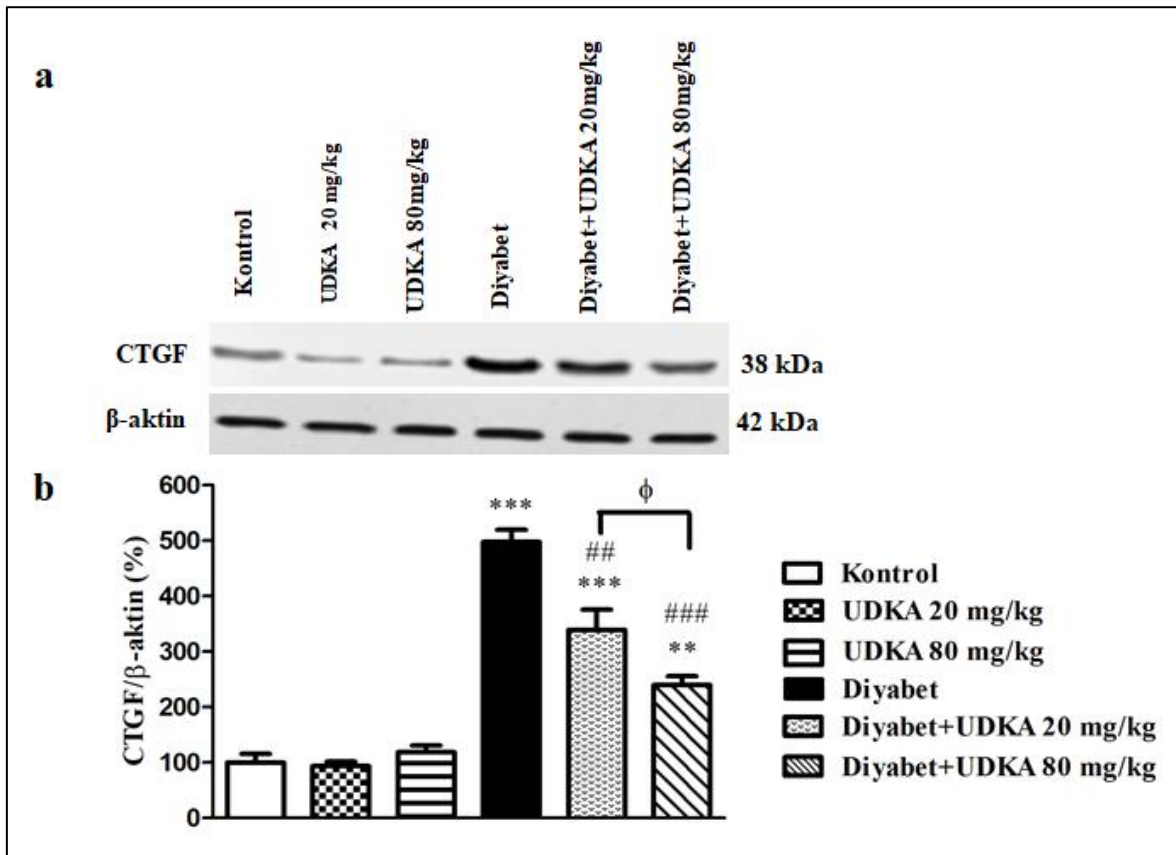
Yolağın inhibitörü gibi davranan Smad7 protein ekspresyon seviyesi diyabet grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azaldı. Smad7 protein ekspresyon seviyelerindeki bu azalma, 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi alan diyabetik gruplarda tedavi almayan diyabet grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde önlenirken; elde edilen Smad7 seviyeleri 80 mg/kg UDKA tedavisi alan diyabetik grupta kontrol grubu ile anlamlı benzerlik gösterdi (Şekil 26).



Şekil 26. Deney gruplarında **a)** Smad7 & β-aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; **b)** Smad7 protein ekspresyonu için yapılan dansitometrik analiz sonuçları (n=5). ***p<0.001 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ##p<0.01 diyabet grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı farkı ifade etmektedir.

4.3.4. UDKA Tedavisinin CTGF Protein Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkisi

Diyabet grubunun korpus kavernozum dokularındaki CTGF protein ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde arttı. CTGF protein ekspresyon seviyelerindeki bu artış, 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi uygulanan diyabetik gruplarda, tedavi almayan diyabet grubuna kıyasla doz bağımlı şekilde anlamlı önlenildi. Tedavi ile elde edilen CTGF seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı fark gösterdi (Şekil 27).

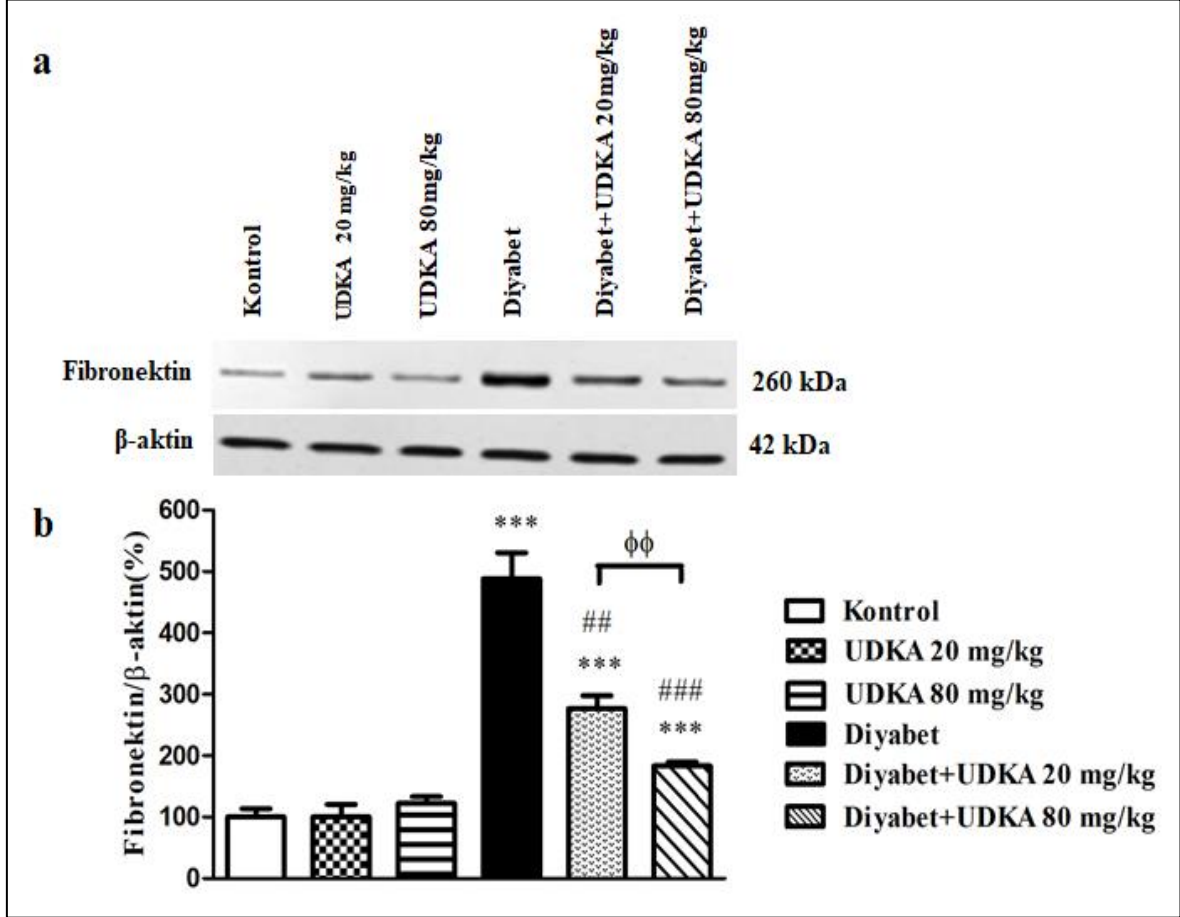


Şekil 27. Deney gruplarında **a)** CTGF & β -aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; **b)** CTGF protein ekspresyonu için yapılan dansitometrik analiz sonuçları (n=5). ***p<0.001 ve **p<0.01 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ###p<0.001 ve ##p<0.01 diyabet grubuyla karşılaştırıldığında, ϕ p<0.05 ise diyabetik tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

4.3.5. UDKA Tedavisinin Fibronektin Protein Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkisi

Sonuçlarımız, diyabet grubunun korpus kavernozum dokularındaki fibronektin protein ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı arttığını gösterdi. Fibronektin seviyelerindeki bu artış, 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi uygulanan diyabetik

gruplarda, tedavi almayan diyabet grubuna kıyasla doz bağımlı şekilde anlamlı önlenirken, mevcut fibronektin seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı benzerlik göstermedi (Şekil 28).



Şekil 28. Deney gruplarında **a)** Fibronektin & β-aktin protein ekspresyon seviyelerini gösteren temsili membran bantları; **b)** Fibronektin protein ekspresyonu için yapılan dansitometrik analiz sonuçları (n=5). ***p<0.001 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ##p<0.01 ve ###p<0.001 diyabet grubuyla karşılaştırıldığında, φφp<0.01 diyabetik tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

4.4. Histopatolojik Değerlendirme

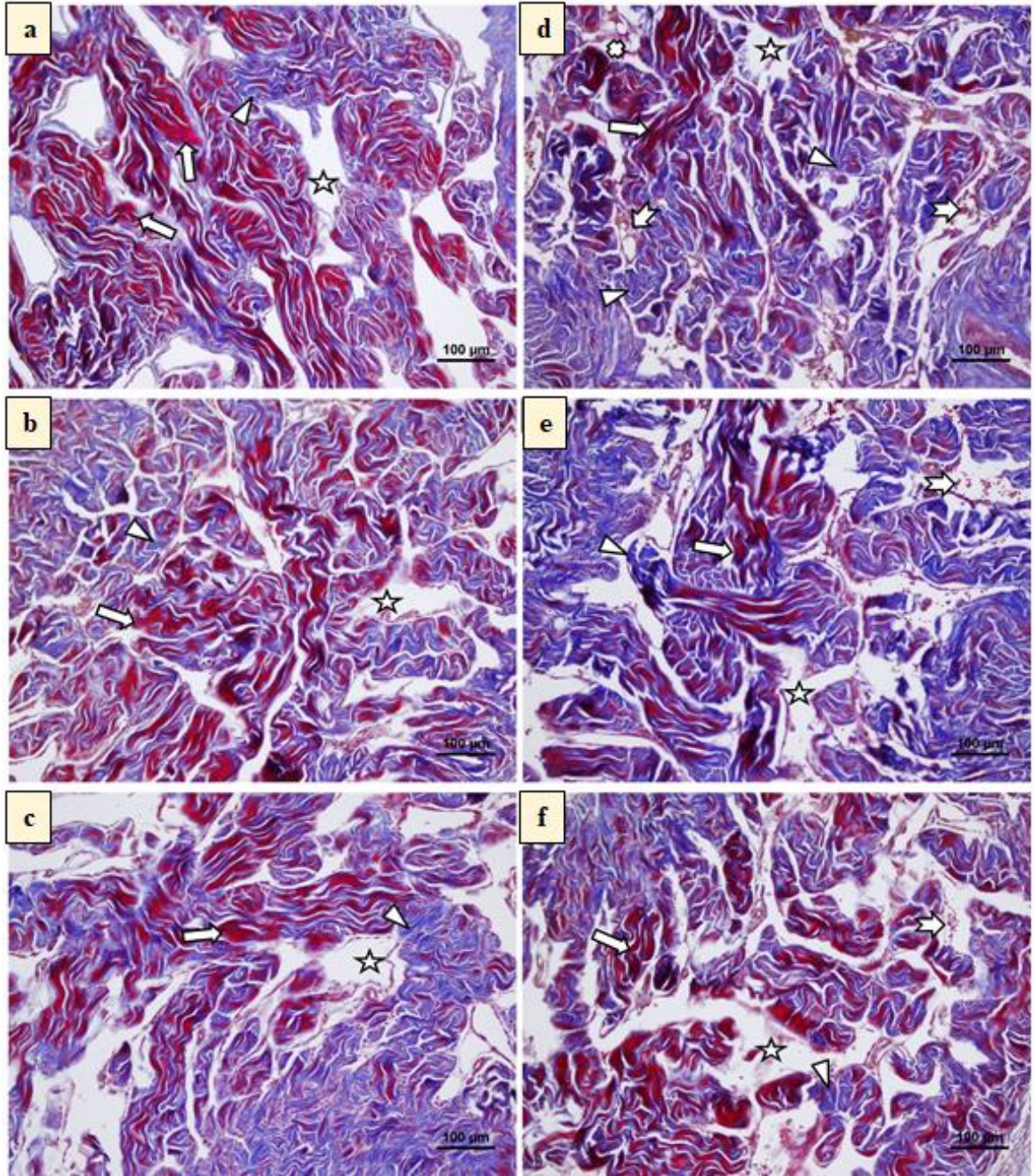
Penil doku kesitleri MTB kiti ile muamele edildikten sonra bağ doku/kolajen ve düz kas içeriği ile sinüzoidal doku bütünlüğü yönünden mikroskobik olarak incelendi. Ardından boyalı kesitlerdeki düz kas kaybı ve bağ doku/kolajen artışı skorlanarak semi-kantitatif değerlendirme yapıldı.

4.4.1. UDKA Tedavisinin Kavernozal Doku Morfolojisi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

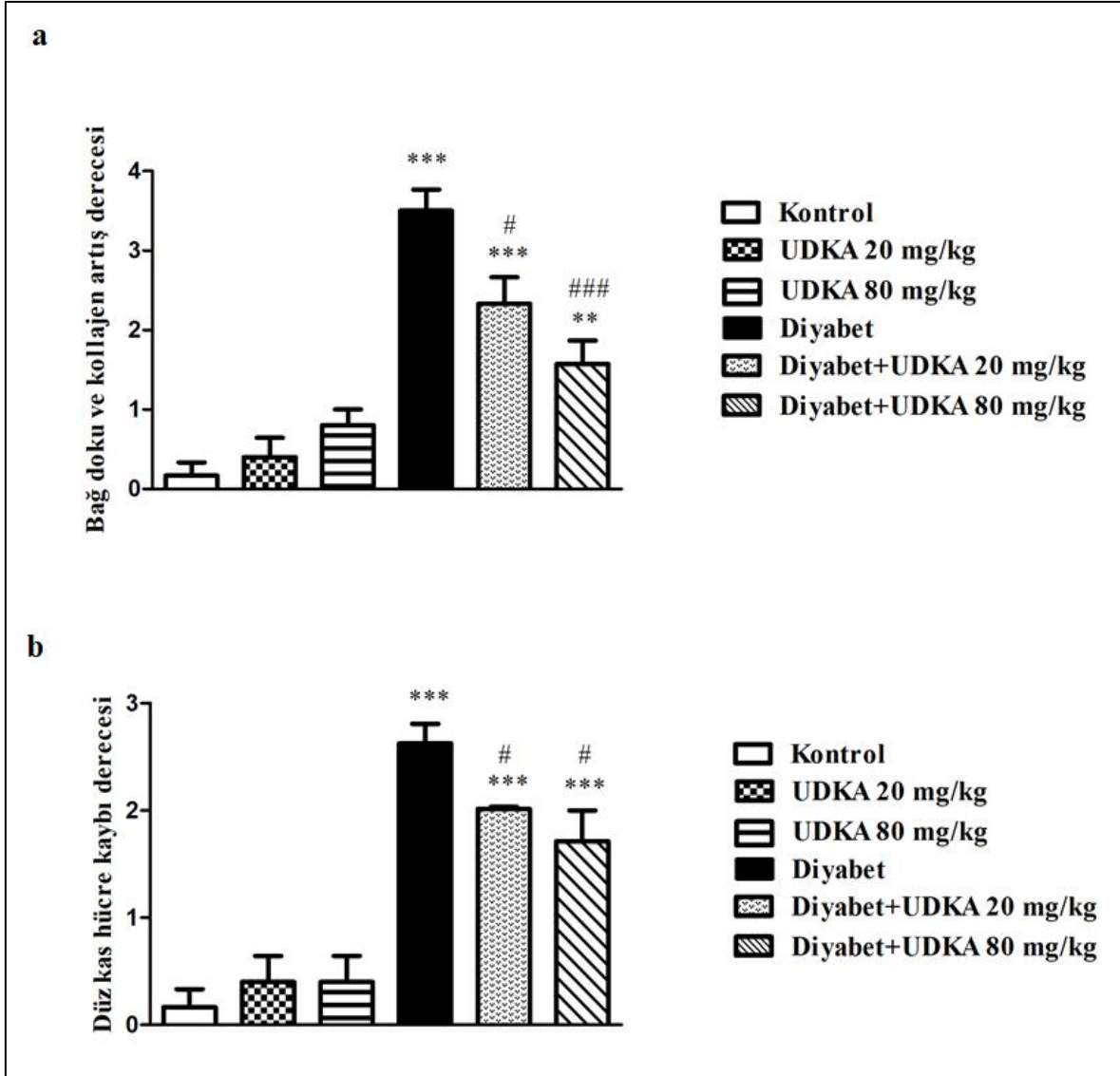
Kontrol grubuna (Resim 3a) ait penis dokusunda; normal yapıdaki sağ ve sol korpus kavernozumların, birbirleriyle bağlantılı endotelle çevrili geniş lümenli sinüzoidlere ve onları çevreleyen kırmızı renkli düz kas ve mavi renkli bağ doku/kolajen içeriğine sahip olduğu görüldü. UDKA tedavisi alan kontrol grupları (Resim 3b ve 3c) tedavi almayan kontrol grubu ile benzer morfolojik özellikler sergiledi. Diyabet grubunda (Resim 3d) ise kontrol grubuyla kıyaslandığında kavernozal doku düz kas içeriğinin azalmış olduğu, bağ doku/kolajen içeriğinin ileri derecede arttığı gözlemlendi. Diyabet grubunda sinüzoidlerde konjesyon ve interstisyel dokuda yer yer ödem izlendi. Diyabetik tedavi gruplarında (Resim 3e ve 3f) ise kontrol grubundaki görünüme ulaşılmasa da tedavi almayan diyabetik grubuyla kıyaslandığında konjesyon/ödem ve bağ doku/kolajen içeriğinin azaldığı; düz kas içeriğinin arttığı görüldü.

4.4.2. UDKA Tedavisinin Kavernöz Dokuda Diyabet ile İndüklenen Histopatolojik Değişiklikler Üzerine Etkisi

Kavernozal doku fibrozis derecesinin ifade edilmesi amacıyla bağ doku/kolajen artış skoru ile düz kas kaybı skoru kullanıldı. Buna göre, diyabet grubunda bağ doku/kolajen artış ve düz kas kaybı skorunun kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı arttığı gözlemlendi. 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi uygulanan diyabet gruplarında bağ doku/kolajen artış ve düz kas hücre kaybı skorunun tedavi almayan diyabet grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı gösterilirken diyabetik tedavi grupları arasında anlamlı fark tespit edilmedi (Şekil 29a ve 29b).



Resim 3. Deney gruplarındaki sıçanlara ait kavernöz doku kesitlerinin mikroskop altındaki histopatolojik görünümü. **a)** Kontrol, **b)** UDKA 20 mg/kg, **c)** UDKA 80 mg/kg, **d)** Diyabet, **e)** Diyabet+UDKA 20 mg/kg, **f)** Diyabet+UDKA 80 mg/kg. Düz kas (kırmızı renk/ ok ile), kolajen lifler ve bağ doku (mavi renk/ok başı ile), sinüzoid (yıldız ile), intravasküler konjesyon (çentikli ok ile) (Masson Trikrom; X200; ölçek çubuk 100 µm).



Şekil 29. Deney gruplarındaki sıçanların kavernoöz dokularındaki **a)** bağ doku ve kolajen artışı ile **b)** düz kas hücre kaybının değerlendirilmesi (n=6-8). Bağ doku ve kolajen artışı; 0: Normal, 1: Hafif artış 2: Orta derecede ve 3: şiddetli artış şeklinde skorlandı. b) Düz kas kaybının değerlendirilmesi (n=6-8). Düz kas kaybı; 0: Normal (Azalma yok), 1: Hafif derecede, 2: Orta derecede, 3: İleri derecede azalma şeklinde skorlandı. **p<0.01 ve ***p<0.001 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, #p<0.05 ve ###p<0.001 diyabet grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Diyabetle ilişkili ED'nin multifaktöriyel fizyopatolojisini ortaya koymakta kullanılan STZ modeli, diğer modellere göre uygulanabilirliği daha kolay, daha ekonomik, tekrarlanabilir olması ve fibrotik değişimleri daha çok yansıtması nedeniyle diyabete bağlı fibrozis çalışmalarında geçerliliği kabul edilen bir modeldir (81, 116, 117). Bu çalışmada oral yolla uygulanan UDKA'nın, sıçanlarda kronik hiperglisemiye bağlı gelişen penil fibrozis üzerindeki potansiyel antifibrotik etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanların 0, 28 ve 56. günlerde ölçülen açlık kan şekeri seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı arttığı, vücut ağırlıklarının ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı azaldığı gösterildi. Yapılan farklı çalışmalarda da, STZ ile indüklenen sıçan diyabet modellerinde açlık kan şekeri düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı arttığı, vücut ağırlığının ise anlamlı azaldığı gösterilmiştir (118, 119). Mevcut bulgularımızın literatürdeki verilerle tutarlılık göstermesi kullandığımız STZ modeli ile diyabetin indüklendiğini doğrular niteliktedir.

Çalışmamızda uygulanan UDKA tedavisinin diyabetle azalan vücut ağırlığı üzerine herhangi anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü. Literatürde UDKA'nın vücut ağırlık değişimleri üzerinde farklı etkilerinin olduğunu gösteren deneysel çalışmalar yer almaktadır. C57BL/6J sağlıklı farelere 21 gün boyunca 50 ve 450 mg/kg/gün dozlarında uygulanan UDKA tedavisinin ardından anlamlı kilo kaybı gözlenmiştir (120). Benzer bir çalışmada, aynı tür sağlıklı erkek ve dişi farelerin diyetlerine 25 hafta boyunca eklenen %0.3 (ağırlık/ağırlık) UDKA'nın yaşla ilişkili kilo alımını ve adipoziteyi anlamlı azalttığı gösterilmiştir (121). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan 27 kadın hastada yapılan klinik bir çalışmada 1200 mg/gün UDKA tedavisi alan grubun vücut ağırlığı indeksinin, tedaviden 6 hafta sonra plasebo grubuna kıyasla anlamlı azaldığı gösterilmiştir (122). Galan ve ark. tarafından STZ ile indüklenen diyabetik farelerde yapılan preklinik bir çalışmada, TUDKA tedavisi alan grubun vücut ağırlığı; diyabetik fare grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuşken, kontrol grubu ile benzer olmadığı gösterilmiştir (123). 180 primer biliyer siroz hastasının yer aldığı klinik bir çalışmada ise, UDKA uygulamasının ilk 12 ayında meydana gelen ve tedavi süresince devam eden anlamlı bir kilo artışı olduğu raporlanmıştır (124). Bizim çalışmamızda UDKA'nın kullanıldığı doz ve sürede anlamlı kilo alımı veya kaybına yol açmadığı gözlenmiştir. Literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında

çalışmamızda kullandığımız hayvan cinsi ve ilaç uygulama dozu ile uygulama süresinin farklılığı, elde ettiğimiz bulgunun nedenini açıklayabilmektedir.

Çalışmamızda UDKA tedavisi alan gruplarda, STZ ile indüklenen hipergliseminin anlamlı şekilde azaldığı gösterildi. Marin ve ark. tarafından yapılan klinik bir çalışmada, UDKA tedavisinin non-alkolik steatohepatit veya primer biliyer siroz ile ilişkili metabolik sendromlu hastalarda bozulan glisemik kontrol ve insülin duyarlılığını iyileştirici etkileri gösterilmiştir (125). Murakami ve ark. tarafından, Tip 2 diyabet hastalarında UDKA'nın Takeda G protein kenetli reseptör 5 (TGR5) sinyalizasyonu aracılığıyla glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1)'i uyararak kan glukoz düzeylerinin düşmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir (126). Obez fare modelinin kullanıldığı farklı çalışmalarda, TUDKA tedavisinin, açlık kan şekeri düzeylerini azalttığı ve insülin duyarlılığını regüle ettiği bildirilmiştir (127, 128). Fang ve ark. tarafından STZ ile indüklenen diyabetik fare modelinde, TUDKA ile tedavi edilen grubun açlık kan şekeri seviyesinin, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna kıyasla azalma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (129). Galan ve ark. STZ ile indüklenen diyabetik farelerde yaptıkları çalışmada, TUDKA tedavisinin ardından açlık kan glukoz seviyelerinin diyabet grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığını ancak kontrol grubu seviyelerine inemediğini belirtmişlerdir (123). Bizim çalışmamızda UDKA'nın kan şekeri üzerindeki olumlu etkisi literatürdeki çalışmalarla benzer bulunmuştur. Klinikte safra ile ilgili hastalıklarda kullanılan UDKA'nın, bilinen etkisi dışında başka bir mekanizma aracılığıyla kan şekerini de düşürdüğü literatürde hem insan hem hayvanlarda, çalışmamızda ise sıçanlarda gösterilmiştir.

Çalışmamızda UDKA'nın erektile fonksiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla kavernoöz sinire uygulanan elektriksel stimülasyonlar sonucu elde ettiğimiz fonksiyonel verilerimize göre, 4 ve 8 voltluk elektriksel uyarı sonucu kontrol grubuna göre diyabet grubunda m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerlerinin anlamlı azaldığı gösterildi. Ruan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, sıçanlarda STZ (tek doz, 60 mg/kg i.p.) uygulaması ile indüklenen Tip 1 diyabet modelinde, kavernoöz sinirin 7.5 voltluk elektriksel stimülasyonu ile elde edilen m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerlerinin diyabet grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı gösterilmiştir (118). Zhou ve ark. tarafından STZ (tek doz, 60 mg/kg i.p.) ile indüklenen sıçan diyabet modelinde, kavernoöz sinirin 1, 2.5 ve 5 voltluk elektriksel stimülasyonu ile elde edilen m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerlerinin diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı azaldığını göstermişlerdir (18). Yuan ve ark. tarafından

yapılan çalışmada, sıçanlarda STZ (tek doz, 60 mg/kg i.p.) uygulaması ile indüklenen Tip 1 diyabet modelinde, 5 voltluk elektriksel stimülasyon ile elde edilen m-İKB/OAB değerlerinin diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı gösterilmiştir (119). Hu ve ark. tarafından sıçanlarda STZ (tek doz, 60 mg/kg i.p.) uygulanmasının ardından kavernoöz sinire uygulanan elektriksel uyarı sonucu diyabetik grupların m-İKB/OAB değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı gösterilmiştir (130). Cui ve ark. sıçanlarda STZ (tek doz, 60 mg/kg i.p.) uygulaması ile indükledikleri Tip 1 diyabet modelinde, kavernoöz sinire uyguladıkları 2.5 ve 5 voltluk elektriksel stimülasyon sonrasında diyabet grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerleri elde etmişlerdir (77). Lin ve ark. tarafından sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada, STZ (tek doz, 65 mg/kg i.p.) uygulaması ile indüklenen diyabet modelinde, kavernoöz sinirin 5 voltluk elektriksel uyarısı ile elde edilen m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerleri diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur (131). Literatürdeki çalışmalara benzer şekilde çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda hiperglisemiye bağlı olarak hem erektıl yanıtlarda hem de hemodinamik yanıtlarda bozulma meydana geldiğini gözlemledik. Bu da bize hipergliseminin yol açtığı vaskülopati ve nöropatiye bağlı olarak ED gelişebileceğini güçlü bir şekilde düşündürmüştür.

Çalışmamızın en önemli bulgusu, 20 ve 80 mg/kg UDKA tedavisi alan diyabetik sıçanlarda 4 ve 8 voltluk elektriksel uyarı ile elde ettiğimiz m-İKB/OAB ve t-İKB/OAB değerlerinin diyabet grubuna kıyasla anlamlı artması ve bu değerlerin kontrol grubu ile benzer olmasıdır. Bomzon ve ark. tarafından yayımlanan bir raporda, safra asitlerinin membran akışkanlığında meydana getirdiği artışın, yüzey membran reseptörlerinde konformasyonel değişiklik oluşturarak voltaj bağımlı kalsiyum kanal fonksiyonunun azalmasına ve kısıtlı kalsiyum girişine yol açtığı; bu sayede vazorelaksasyona neden olduğu öne sürülmüştür (132). Safra asitlerinin vasküler düz kas hücreleri ile endotel hücrelerde, kalsiyumla aktive edilen yüksek kondüktanslı K^+ ($BKCa^{+2}$) kanallarını aktive ederek arteriyel tonusu düzenlediği bilinmektedir. $BKCa^{+2}$ kanallarının yanı sıra, TGR5 olarak da bilinen G protein kenetli safra asidi reseptörü 1 (G-protein-coupled bile acid receptor 1, GPBAR1), farnesoid X reseptörü (farnesoid X receptor, FXR) ve muskarinik 3 reseptör aktivasyonları da safra asitlerinin vazodilatör etkilerine aracılık etmektedir (133). Sinisalo ve ark., UDKA'nın, kalp yetmezliği olan hastalarda endotelial NO bağımsız vazodilatasyonu iyileştirerek arteriyel kan akışını koruduğunu göstermişlerdir (134). Sunagane ve ark., izole kobay safra kesesinde UDKA ve deoksikolik asitin kalsiyum

efluksunu hızlandırarak gevşetici etki gösterdiğini belirtmişlerdir (135). Literatürde çeşitli çalışmalarda UDKA'nın endotelial NO'den bağımsız BKCa²⁺, TGR5, FXR ve muskarinik 3 reseptörleri aracılığıyla vazodilatör etkileri ortaya koyulmuştur. Bizim çalışmamızda UDKA'nın benzer etkisi hiperglisemik sıçan korpus kavernozum dokusunda ilk kez gösterildi. UDKA'nın erektil fonksiyon üzerindeki etkisine yukarıdaki mekanizmaların aracılık edebileceği veya kronik kullanımı sonucu fibrozis gelişimini önleyerek erektil fonksiyonun korunmasına katkı sağladığı düşünülmektedir.

Çalışmamızdaki diğer önemli bulgular, korporal dokuda Western Blot analiz yöntemi ile elde edilen TGF- β 1, Smad2/3, pSmad2(Ser^{465/467}), Smad7, CTGF ve fibronectin protein ekspresyon seviyeleridir. Western blot ile elde ettiğimiz birinci bulguya göre, penil dokudaki TGF- β 1 protein ekspresyonları diyabet grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Smad2 ve Smad3 seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Diyabet grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında pSmad2(Ser^{465/467}) ekspresyonu ve pSmad2(Ser^{465/467})/Smad2 oranında anlamlı artış saptandı. Zhang ve ark. tarafından sıçanlarda STZ ile indüklenmiş diyabetik ED'de TGF- β 1/Smad sinyal yolağı bileşenlerinin penil ekspresyon seviyelerinin incelendiği bir çalışmada, TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aktivasyonunun penil dokudaki yapısal değişikliklerde ve erektil fonksiyonun bozulmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir (93). Zhou ve ark. sıçanlarda STZ ile indükledikleri diyabet modelinde, diyabetik grupta TGF- β 1, pSmad2 protein ekspresyonu ve pSmad2/Smad2 oranında kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış meydana geldiğini ve bu artışın korpus kavernozumdaki fibromusküler değişimlerden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (18). Wu ve ark. Tip 1 diyabette meydana gelen penil fibrozis üzerinde pankreatik islet hücre transplantasyonunun etkilerini inceledikleri bir çalışmada, diyabetik grupta TGF- β 1 protein ekspresyonu ve pSmad2/Smad2 oranını kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (3). Çalışmamızda sıçan penis dokularında hiperglisemiye bağlı TGF- β 1/Smad2/3 sinyal yolağı upregülasyonunu gösteren bulgularımız, literatürde yer alan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Elde ettiğimiz ikinci önemli bulguya göre, UDKA tedavisi, diyabetle artan TGF- β 1 protein ekspresyon düzeylerini doz bağımlı şekilde azalttı. Diyabet grubuyla karşılaştırıldığında UDKA uygulanan diyabet gruplarında pSmad2(Ser^{465/467}) ekspresyon düzeyi ve pSmad2/Smad2 oranı doz bağımlı şekilde anlamlı azalma gösterdi. pSmad2/Smad2 oranındaki mevcut iyileşme 80 mg/kg UDKA tedavisi alan diyabetik grupta

kontrol grubuna yakın bulundu. Pathil ve ark. tarafından farelerde karaciğer fibrozisi üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada, UDKA'nın TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aktivasyonunu TGF- β 1, pSmad2 ve pSmad3 protein ekspresyonlarındaki artışı önleyerek inhibe ettiği ve böylece hepatik fibrozisi önlediği gösterilmiştir (23). Li ve ark. farelerde izoproterenol ile indüklenmiş miyokardiyal fibrozis modelinde, UDKA'nın miyokard dokusundaki TGF β -1 protein ekspresyonunu azaltarak antifibrotik etki gösterdiğini bildirilmişlerdir (24). Liang ve ark.nın yaptığı *in vitro* bir çalışmada, hepatik hücre hattında orta ve yüksek doz UDKA uygulamasının TGF- β 1 protein ekspresyonunu anlamlı olarak inhibe ettiği, T β RI protein ekspresyonu üzerinde herhangi anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı, Smad3 proteinini ve Smad3 mRNA ekspresyonunu inhibe ettiği, Smad4 üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığı, Smad7 proteinini ve Smad7 mRNA ekspresyonunu artırdığı ve cAMP cevap elementi (CREB) bağlayıcı proteini (CBP) mRNA ekspresyonunu doza bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada, UDKA'nın TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki etkileri aracılığıyla hepatik fibrozis gelişimini önleyebileceği belirtilmiştir (26). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz veriler literatürdeki çalışmalarla benzer olup; uygulanan UDKA tedavisinin, penil dokuda hiperglisemi ile indüklenen TGF- β 1/Smad sinyalizasyonunu TGF- β 1 protein ekspresyonu ve ardından Smad2 protein aktivasyonu düzeyinde doz bağımlı şekilde inhibe ettiğini göstermektedir.

Western blot yöntemiyle elde ettiğimiz üçüncü bulguya göre, diyabet grubundaki CTGF protein ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu. James ve ark. tarafından yüksek glikoz seviyelerinde CTGF'nin rolünün araştırıldığı bir çalışmada, STZ ile diyabet indüklenmesinden 4 ay sonra farelerin böbrek kortekslerinde aşırı CTGF protein ekspresyonu gösterilmiş ve aynı zamanda CTGF indüksiyonunun diyabetik böbrekte ESM proteinlerinin ekspresyon artışına aracılık ettiği bildirilmiştir (136). Makino ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, STZ ile indüklenen diyabetik sıçan böbrek glomerülusunda, TGF β -1 ve CTGF mRNA ekspresyonlarının, diyabet indüklemesinden 3 gün sonra başlayıp sırasıyla 14 ve 28. günlerde pik yaparak kademeli şekilde upregüle edildiği gösterilmiştir (137). Zhao ve ark. tarafından kardiyak fibrozis ile ilgili yapılan bir çalışmada, 45 mg/kg STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda CTGF protein ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla 2.67 kat arttığı gösterilmiştir (138). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgunun, literatürdeki çalışmalarla benzer olduğu görülmektedir.

Dördüncü önemli bulgumuz ise, diyabetik sıçanların penil dokularında artan CTGF protein ekspresyon seviyelerinin, UDKA tedavisi uygulanan diyabetik gruplarda doz bağımlı şekilde anlamlı azaldığının gösterilmesidir. Literatürde, UDKA'nın CTGF protein ekspresyonu üzerindeki mevcut etkisini destekleyen tek bir çalışma bulunmaktadır. Munoz-Garrido ve ark. tarafından yapılan bu preklinik çalışmada, polikistik sıçanların karaciğer dokularındaki yüksek CTGF mRNA seviyelerinin, 5 ay boyunca 25 mg/kg UDKA ile tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir (139). Literatürde yer alan farklı bir çalışmada ise UDKA'nın farelerde izoprenalin ile indüklenen miyokardiyal fibrozis modelinde, TGF- β 1 protein ekspresyon seviyesini anlamlı olarak azaltmasına rağmen, CTGF protein ekspresyon seviyelerinde herhangi anlamlı bir değişiklik yapmadığı gösterilmiştir (24). Bu durum UDKA'nın mevcut antifibrotik etkisini TGF- β 1 ile aktive edilen başka bir efektör molekül üzerinden de gösterebileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda uygulanan UDKA tedavisinin TGF- β 1, pSmad2, pSmad2/Smad2 ve CTGF protein ekspresyon seviyelerindeki artışı önlenmesi, UDKA'nın hiperglisemi ile indüklenen fibroziste önemli rolü olan TGF- β 1/Smad/CTGF sinyal aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir.

Western blot yöntemi ile elde ettiğimiz beşinci önemli bulgu, diyabet grubunda Smad7 protein ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı düşük bulunmasıdır. Farelerde farklı modellemelerle indüklenen renal fibrozis çalışmalarında, Smad7 ekspresyonunun negatif regülasyonunun oluşan fibrozisi ilerlettiği gösterilmiştir (140, 141). Chung ve ark. tarafından farelerde yapılan başka bir çalışmada, Smad7'nin mikroRNA-21 (miR-21), miR-192 ve miR-29b aracılı TGF- β 1/Smad3 inhibisyonu ile renal fibrozisi önlediği gösterilmiştir (142). Sıçan renal tübüler epitel hücrelerinde ve sıçan unilateral üretal obstrüksiyon modelinde yapılan çalışmalarda, Smad7'nin aşırı ekspresyonunun Smad2 aktivasyonunu azaltarak fibrotik etkiyi inhibe ettiği raporlanmıştır (143, 144). Sıçanlarda hiperglisemiye bağlı gelişen ED modelinde kavernoza dokudaki Smad7 protein ekspresyon downregülasyonu ilk defa bizim çalışmamızda gösterilmiş olup bu anlamda literatüre önemli bir katkı sağlanmıştır. Smad7 seviyelerindeki bu değişim, hiperglisemi aracılı TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aktivasyonunu doğrular niteliktedir.

STZ ile indüklenen Smad7 seviyelerindeki azalma hem 20 mg/kg hem de 80 mg/kg UDKA tedavisi ile anlamlı önlenirken, 80 mg/kg dozunda tedavi uygulanan diyabetik gruptaki Smad7 seviyeleri kontrol grubuna yakın bulundu. Literatürde, UDKA'nın Smad7 protein ekspresyonu üzerindeki mevcut etkisini destekler nitelikte tek bir çalışma

bulunmaktadır. Liang ve ark.nın yaptığı bu *in vitro* çalışmada, UDKA uygulamasının hepatik hücrelerde TGF- β 1 ve Smad3 protein ekspresyonunu azaltarak, Smad7 protein ekspresyonunu ise artırarak TGF- β 1/Smad sinyal transdüksiyonunu düzenlediği ve bu sayede hepatik fibrozis gelişimini önleyebileceği belirtilmiştir (26). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgu, UDKA tedavisinin literatürdeki çalışmaya benzer şekilde Smad7 downregülasyonunu engelleyerek TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aktivasyonunu inhibe edebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda Western blot yöntemi ile incelenen fibronectin seviyeleri değerlendirildiğinde, diyabet grubunda kontrol grubuna göre penil fibronectin protein ekspresyonu anlamlı artış gösterdi. Roy ve ark. tarafından yüksek glikoz seviyelerinin fibronectin ekspresyonu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanların böbrek korteksi ile kalp dokularında aşırı fibronectin ekspresyonu gösterilmiştir (145). Ren ve ark. tarafından sıçanlarda diyabetik renal fibrozis ile ilgili yapılan bir çalışmada, STZ ile indüklenen diyabet modelinde oluşan yüksek glikoz seviyelerinin fibronectin sentezini artırdığı farklı yöntemlerle gösterilmiştir (146). Zhang ve ark. STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlarda, TGF β 1/Smad sinyal aktivasyonuna bağlı kavernoza fibronectin ve kolajen-IV seviyelerinde anlamlı artış tespit etmişlerdir (93). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgu, literatürdeki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. TGF- β 1/Smad sinyal aktivasyonu sonucu ekspresyonu arttığı bilinen ve farklı dokularda da fibrozis belirteci olarak kullanılan fibronectin ile ilgili elde ettiğimiz bulgu, korporal dokuda hiperglisemiye bağlı gelişen fibrozisi işaret etmektedir.

Çalışmamızda, STZ ile indüklenen diyabetik sıçanların penil dokularında artan fibronectin protein ekspresyon seviyelerinin, UDKA tedavisi uygulanan diyabetik gruplarda doz bağımlı şekilde anlamlı azaldığı gösterildi. Literatürde, UDKA'nın fibronectin ekspresyonu üzerindeki mevcut etkisini farklı bir dokudaki fibrozis modeli ile destekleyen tek bir çalışma bulunmaktadır. Canbolat ve ark.nın yaptığı bu çalışmada, STZ ile indüklenmiş diyabetik fare modelinde, UDKA'nın, TGF- β ve fibronectin düzeylerini azaltarak kardiyak dokuda antifibrotik etki gösterdiği raporlanmıştır (25). Çalışmamızda UDKA'nın TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aktivasyonu ile indüklenen fibronectin seviyelerindeki artışı önlemesi, mevcut tedavinin korporal dokuda TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aracılı antifibrotik etkisini destekler niteliktedir. İnsan fetal kalbi üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada, UDKA'nın K_{ATP} kanal stimülasyonu aracılığıyla fibroblastların

miyofibroblastlara farklılaşmasını ve miyofibroblastların hiperpolarizasyonunu azaltarak miyokardiyal fibrozisi engelleyebileceği gösterilmiştir (147). Shen ve ark. yaptıkları *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, UDKA'nın potansiyel bir TGF- β inhibitörü olarak antitümöral bağışıklığı artırdığını göstermişlerdir (148). Roslan ve ark. tarafından yapılan *in vitro* bir çalışmada, TGF- β 1 uygulamasının insan tenon fibroblast hücrelerinde ERK1/2 ve NF- κ B1 aracılı α -SMA ve F-aktin ekspresyonunu artırarak fibrozisi indüklediği; UDKA tedavisinin ise bu durumu önlediği gösterilmiştir (149).

Çalışmamızın diğer bir adımı olan histopatolojik incelemelerde elde ettiğimiz bulgulara göre, kontrol grubuna kıyasla diyabet grubunda bağ doku ve kolajen lif içeriğinin artışı ile birlikte kavernozaal düz kas içeriğinin azaldığı gözlemlendi. Literatürde sağlıklı erkeklerde kavernozaal düz kas oranı %42 ile %50 arasında değişirken, diyabetli erkeklerde artan bağ doku/kolajen lifleri sebebiyle bu oranın azaldığı bildirilmiştir (98, 150). Mingfang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada sıçanlarda STZ ile indüklenmiş diyabetin ardından yaklaşık 9 hafta sonra penis morfolojisinde anlamlı değişiklikler (kavernozaal düz kas atrofisi) meydana geldiği gösterilmiştir (8). Zhou ve ark. tarafından sıçanlarda STZ ile indüklenmiş diyabet modelinde, kontrol grubuna kıyasla diyabetik sıçanların korporal dokusunda düz kas/kolajen oranı ile kolajen I/kolajen III oranının anlamlı azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, elastik lif morfolojisine bakıldığında iki grup arasında anlamlı fark gösterilmiş olup, kontrol grubundaki elastik lifler uzun, iyi organize olmuş ve kas demetlerine sıkıca bağlı iken, diyabetik grupta elastik lif içeriğinin azalmış ve parçalanmış olduğu bildirilmiştir (18). Ruan ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada, STZ ile diyabet indüklemesinden 12 hafta sonra, kontrol grubuna kıyasla diyabetik sıçanların korporal dokularında düz kas/kolajen oranının anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir (118). STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanların kavernoza dokusundaki sinüzoidal endotel tabakasında gösterilen anlamlı kayıp Young ve ark. tarafından yapılan deneysel çalışmayla desteklenmiştir (70). Literatürde, yukarıda sunulan çalışmalar ve çalışmamıza ait sonuçlar ile tutarlılık göstermeyen ve paradoksal bulgular içeren bir çalışma yer almaktadır. Bu çalışmaya göre alloxan ile indüklenen diyabetik tavşanların TA tabakasında kolajen döngüsü ve elastik lif içeriğinde artış meydana geldiği; korpus kavernoza dokusunda kolajenin organize hale gelerek azaldığı ve düz kas içeriğinin arttığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, korporal düz kaslarda meydana gelen hipertrofi sonucu sinüzoidal boşlukların küçüldüğünü ve dolayısıyla bu boşluklardan geçen kan miktarının azalarak ED'ye yol açabileceğini belirtmişlerdir (9). Bu çalışmada kullanılan hayvan cinsinin

(tavşan) farklı olması, diyabet indüklemesinin tavşanların STZ'ye daha dirençli olmaları nedeniyle alloxan ile yapılması, elde edilen paradoksal bulguların nedenini açıklayabilmektedir (151-153). Bizim çalışmamız, histopatolojik açıdan daha önce yapılan birçok çalışma ile benzer olup; çalışmamızda hiperglisemiden 8 hafta sonra korporal dokuda fibromüsküler değişimler gösterilmiştir. Hiperglisemiye bağlı gelişen histopatolojik bulgularımız, moleküler analiz sonuçlarımız ile tutarlılık göstermektedir. Birçok deneysel çalışmada artan TGF- β 1 oranları ile azalan kavernozaal düz kas içeriği ve artan kolajen miktarı arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (98). Tavşanlarda yapılan *in situ* bir çalışmada, intrakavernozaal TGF- β 1 enjeksiyonunun korporal düz kas yüzdesinde azalmaya yol açarak, bağ doku sentezini ve dolayısıyla korpus kavernozaal yapısını değiştirerek fibrozisi indüklediği gösterilmiştir (154). Literatürde diyabetik sıçan penisindeki yapısal fibromüsküler değişikliklerin indüklenmesinde TGF- β 1/Smad/CTGF sinyal yolağı upregülasyonunun önemli rolü olduğunu bildiren birden fazla çalışma yer almaktadır (18, 155). Bu da bize korpus kavernozaal gözlemlediğimiz fibrotik değişimlerde TGF- β 1/Smad/CTGF sinyal aktivasyonunun rolü olduğunu düşündürmüştür.

Histopatolojik verilerimiz uygulanan UDKA tedavisinin STZ ile indüklenen kavernozaal fibrozisi doz bağımsız şekilde önleyebileceğini gösterdi. Literatürde, UDKA'nın farklı dokularda çeşitli modellerle indüklenen fibrozisi iyileştirdiğine dair veriler mevcut iken, penil fibrozis modeli ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Sıçanlarda, UDKA ve onun homoloğu olan 24-norursodeoksikolik asit (norUDKA) ile yapılan bir çalışmada, tiyoasetamid ile indüklenen karaciğer fibrozisinde, fibrozis oluşuktan sonra uygulanan UDKA tedavisinin fibrozis üzerinde anlamlı bir değişiklik yapmadığı gösterilmişken, ilerleyici fibrozis modelinde, fibrozis oluşumu devam ederken profilaktik amaçla uygulanan UDKA ve norUDKA tedavisinin karaciğerdeki histolojik değişiklikleri anlamlı ölçüde değiştirdiği gösterilmiştir. Modelle indüklenen bağ dokusu artışı norUDKA uygulaması ile anlamlı azalırken UDKA uygulaması ile kısmi bir azalma göstermiştir (108). Zhang ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, sıçan karaciğer fibrozisi modelinde, UDKA tedavisi uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda tip I ve tip III kolajen mRNA ve protein ekspresyonlarının anlamlı azaldığı ve fibrozis gelişiminin önlendiği gösterilmiştir (156). Li ve ark.nın yaptığı farelerde izoprenalin ile indüklenmiş miyokardiyal fibrozis modelinde, UDKA'nın kolajen I ve III miktarlarını doz bağımlı şekilde azaltarak antifibrotik etki gösterdiği bildirilmiştir (24). Literatür incelendiğinde, STZ uygulaması ile kavernoza dokuda artan bağ doku/kolajen içeriği ve düz kas atrofisinin önlenmesinde UDKA tedavisinin etkili

olduğu ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Mevcut bulgularımız UDKA'nın literatürde yer alan karaciğer ve miyokardiyal fibrozis modelleri üzerindeki etkileri ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda tedavi ile elde ettiğimiz histopatolojik veriler, moleküler analiz sonuçlarımız ile büyük oranda tutarlılık göstermektedir. Bu durum, kronik UDKA tedavisinin, diyabetin neden olduğu kavernoza yapısal değişikliklere karşı TGF- β 1/Smad/CTGF sinyal inhibisyonu aracılı koruyucu etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Hiperglisemiye bağlı gelişen penil fibrozis modelinde UDKA'nın etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada özetle aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- Korporal dokuda hiperglisemiye bağlı meydana gelen fibromusküler değişimlerde TGF- β 1/Smad/CTGF yolağının upregülasyonunun rol oynadığı ve tüm bu değişikliklerin erektile fonksiyonu bozduğu ortaya konulmuştur.
- Hipergliseminin neden olduğu kavernoza basınç artışı UDKA tarafından normale çevrilmiştir.
- UDKA'nın, penil fibrozisten sorumlu olan TGF- β 1/Smad/CTGF yolağını inhibe ederek fibrozis gelişimini önlediği gösterilmiştir.
- Hiperglisemiye bağlı gelişen düz kas atrofisi ve bağ doku/kolajen artışının UDKA tedavisi ile engellendiği gösterilmiştir.

Diyabetik ED patofizyolojisinde rol oynayan vasküler, yapısal ve nörojenik birçok mekanizma nedeniyle mevcut oral tedaviler kavernoza dokunun yanıt verebilirliğinde etkili bir artış gösterememektedir. Dolayısıyla diyabetik ED tedavisinde daha etkin ve güvenilir yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Tez çalışmamızda, STZ modeli ile indüklenen diyabete bağlı gelişen penil fibrozis üzerinde UDKA'nın doz bağımlı koruyucu etkisi fonksiyonel, histopatolojik ve moleküler düzeyde incelenmiştir. Sonuçta; STZ ile indüklenen hiperglisemiye bağlı gelişen ED modelinde, korporal fibrozis oluşumunu erken dönemde önlemesi için antifibrotik özellikleri bir arada bulunduran ve bu sayede kavernoza düz kas kontraktilesini modüle edebileceği düşünülen UDKA'nın koruyucu etkisi ilk defa raporlanmıştır. UDKA'nın erektile fonksiyon kaybı ve bozulan kavernoza doku mimarisi üzerindeki koruyuculuğu, TGF- β 1, pSmad2, Smad7 ve CTGF protein ekspresyon seviyelerini regüle ederek gösterdiği TGF- β 1/Smad/CTGF sinyal inhibisyonu aracılı antifibrotik etkisi ile ilişkilendirilmiştir. Diyabete bağlı gelişen korporal fibrozis ve ED'de daha önce etkinliği gösterilmiş olan TGF- β 1/Smad/CTGF yolağının UDKA tarafından inhibe edildiğinin gösterilmesi, diyabetik ED tedavisinde UDKA'nın koruyucu etki

sağlayabilecek potansiyel yeni terapötik bir ajan olarak düşünülebileceğini göstermektedir. Ancak, bu alanda daha geniş kapsamlı prelinik ve klinik çalışmalara gereksinim vardır. Sonuç olarak, TGF- β 1/Smad/CTGF yolağına etkili olduğu gösterilen UDKA, ilaçta yeniden hedeflendirme kapsamında ED tedavisinde tek başına veya diğer ilaçlarla kombine şeklinde kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır.



6. KAYNAKLAR

1. Kim S, Cho MC, Cho SY, Chung H, Rajasekaran MR (2021). Novel emerging therapies for erectile dysfunction. *World J Mens Health* 39(1): 48-64.
2. Matsui H, Sopko NA, Hannan JL, Bivalacqua TJ (2015). Mini review: Pathophysiology of erectile dysfunction. *Curr Drug Targets*.
3. 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.
4. Zhang KQ, Chen D, Sun DQ, Zhang H, Li B, Fu Q (2016). Probucol improves erectile function by restoring endothelial function and preventing cavernous fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Urol* 91: 241 e249-241 e216.
5. Jangir RN, Jain GC (2014). Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: A review. *Curr Diabetes Rev* 10(3): 147-157.
6. Corriere M, Rooparinesingh N, Kalyani RR (2013). Epidemiology of diabetes and diabetes complications in the elderly: An emerging public health burden. *Curr Diab Rep* 13(6): 805-813.
7. Lasker GF, Maley JH, Kadowitz PJ (2010). A review of the pathophysiology and novel treatments for erectile dysfunction. *Adv Pharmacol Sci* 2010.
8. Tao M, Tasdemir C, Tasdemir S, Shahabi A, Liu G (2017). Penile alterations at early stage of type 1 diabetes in rats. *Int Braz J Urol* 43(4): 753-761.
9. Abidu-Figueiredo M, Ribeiro IC, Chagas MA, Cardoso LE, Costa WS, Sampaio FJ (2011). The penis in diabetes: Structural analysis of connective tissue and smooth muscle alterations in a rabbit model. *BJU Int* 108(3): 400-404.
10. Dean RC, Lue TF (2005). Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* 32(4): 379-395.
11. Malavige LS, Levy JC (2009). Erectile dysfunction in diabetes mellitus. *J Sex Med* 6(5): 1232-1247.
12. Hatzimouratidis K, Hatzichristou D (2014). How to treat erectile dysfunction in men with diabetes: From pathophysiology to treatment. *Curr Diab Rep* 14(11): 545.
13. El-Sakka AI, Yassin AA (2010). Amelioration of penile fibrosis: Myth or reality. *J Androl* 31(4): 324-335.
14. Milenkovic U, Albersen M, Castiglione F (2019). The mechanisms and potential of stem cell therapy for penile fibrosis. *Nat Rev Urol* 16(2): 79-97.

15. Thorve VS, Kshirsagar AD, Vyawahare NS, Joshi VS, Ingale KG, Mohite RJ (2011). Diabetes-induced erectile dysfunction: Epidemiology, pathophysiology and management. *J Diabetes Complications* 25(2): 129-136.
16. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG (2011). Tgf-beta signaling in fibrosis. *Growth Factors* 29(5): 196-202.
17. Verrecchia F, Mauviel A (2007). Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* 13(22): 3056-3062.
18. Zhou F, Li GY, Gao ZZ, Liu J, Liu T, Li WR, Cui WS, Bai GY, Xin ZC (2012). The tgf-beta1/smad/ctgf pathway and corpus cavernosum fibrous-muscular alterations in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Androl* 33(4): 651-659.
19. Maiorino MI, Bellastella G, Esposito K (2014). Diabetes and sexual dysfunction: Current perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7: 95-105.
20. Gur S, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ (2009). A critical appraisal of erectile function in animal models of diabetes mellitus. *Int J Androl* 32(2): 93-114.
21. Jourdan JP, Bureau R, Rochais C, Dallemagne P (2020). Drug repositioning: A brief overview. *J Pharm Pharmacol* 72(9): 1145-1151.
22. El-Sakka AI (2011). Reversion of penile fibrosis: Current information and a new horizon. *Arab J Urol* 9(1): 49-55.
23. Pathil A, Mueller J, Ludwig JM, Wang J, Warth A, Chamulitrat W, Stremmel W (2014). Ursodeoxycholyt lysophosphatidylethanolamide attenuates hepatofibrogenesis by impairment of tgf-beta1/smad2/3 signalling. *Br J Pharmacol* 171(22): 5113-5126.
24. Li X, Han KQ, Shi YN, Men SZ, Li S, Sun MH, Dong H, Lu JJ, Ma LJ, Zhao M, Li D, Liu W (2017). [effects and mechanisms of ursodeoxycholic acid on isoprenaline-induced myocardial fibrosis in mice]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 97(5): 387-391.
25. Canbolat İP, Yiğittürk G, Erbaş O (2020). Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of ursodeoxycholic acid in streptozocin-induced diabetic rats. *Kocaeli Med J* 9(1): 83-88.
26. Liang TJ, Yuan JH, Tan YR, Ren WH, Han GQ, Zhang J, Wang LC, Qin CY (2009). Effect of ursodeoxycholic acid on tgf beta1/smad signaling pathway in rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 122(10): 1209-1213.
27. Reporters and participants of the 1st Latin American Dysfunction Consensus Meeting (2003). Anatomy and physiology of erection: Pathophysiology of erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 15 Suppl 7: S5-8.

28. Benson CB (2019). Duplex Ultrasound Evaluation of the Male Genitalia. *Introduction to Vascular Ultrasonography*, 30, 678-704. <https://www.elsevier.com/books/introduction-to-vascular-ultrasonography/978-0-323-42882-8>.
29. Çelik S, Kılıç KD, Yiğittürk G, Çavuşoğlu T, Erbaş O, Uyanıkgil Y, Bilge O (2017). Penis naklinde güncel durum; morfolojik bir değerlendirme. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2(1): 034-044.
30. Sidhu PS, Wilkins CJ (2013). Disorders of erectile function. In: Hamm B, Ros PR (Eds.), *Abdominal imaging*. Springer, Berlin, Heidelberg, Berlin, Heidelberg, Pages: 1911-1924.
31. Fazio L, Brock G (2004). Erectile dysfunction: Management update. *CMAJ* 170(9): 1429-1437.
32. Bhasin S, Basson R (2020). Sexual Dysfunction in Men and Women. *Williams Textbook of Endocrinology*, 20; 756-795.e18. <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323555968000206>.
33. Ralph DJ (2005). Normal erectile function. *Clin Cornerstone* 7(1): 13-18.
34. Miller TA (2000). Diagnostic evaluation of erectile dysfunction. *Am Fam Physician* 61(1): 95-110.
35. Morelli A, Filippi S, Vignozzi L, Mancina R, Maggi M (2006). Physiology of Erectile Function: An Update on intracellular molecular processes. *EAU-EBU Update Series* 4 (3): 96-108.
36. Stief CG (2003). Central mechanisms of erectile dysfunction: What a clinician may want to know. *Int J Impot Res* 15 Suppl 2: S3-6.
37. MacDonald SM, Burnett AL (2021). Physiology of erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* 48(4): 513-525.
38. Gratzke C, Angulo J, Chitale K, Dai YT, Kim NN, Paick JS, Simonsen U, Uckert S, Wespes E, Andersson KE, Lue TF, Stief CG (2010). Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med* 7(1 Pt 2): 445-475.
39. Shindel AW, Lue TF (2020). Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. *Campbell-Walsh-Wein Urology*, 68, 1485-1512.e11. <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323546423000689>.
40. Lue TF (2000). Erectile dysfunction. *N Engl J Med* 342(24): 1802-1813.

41. Yafi FA, Jenkins L, Albersen M, Corona G, Isidori AM, Goldfarb S, Maggi M, Nelson CJ, Parish S, Salonia A, Tan R, Mulhall JP, Hellstrom WJ (2016). Erectile dysfunction. *Nat Rev Dis Primers* 4; 2: 16003.
42. Hawksworth DJ, Burnett AL (2015). Pharmacotherapeutic management of erectile dysfunction. *Clin Pharmacol Ther* 98(6): 602-610.
43. Andersson KE (2011). Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction. *Pharmacol Rev* 63(4): 811-859.
44. Nunes KP, Webb RC (2012). Mechanisms in erectile function and dysfunction: An overview. In: Nunes KP (Ed.), *Erectile dysfunction - disease-associated mechanisms and novel insights into therapy*. <https://www.intechopen.com/chapters/30215>.
45. Liu MC, Chang ML, Wang YC, Chen WH, Wu CC, Yeh SD (2020). Revisiting the Regenerative Therapeutic Advances Towards Erectile Dysfunction. *Cells* 19; 9(5): 1250.
46. Sangiorgi G, Cereda A, Benedetto D, Bonanni M, Chiricolo G, Cota L, Martuscelli E, Greco F (2021). Anatomy, Pathophysiology, Molecular Mechanisms, and Clinical Management of Erectile Dysfunction in Patients Affected by Coronary Artery Disease: A Review. *Biomedicines* 16; 9(4): 432.
47. Akkus E, Kadioglu A, Esen A, Doran S, Ergen A, Anafarta K, Hattat H, Turkish Erectile Dysfunction Prevalence Study G (2002). Prevalence and correlates of erectile dysfunction in turkey: A population-based study. *Eur Urol* 41(3): 298-304.
48. Ayta IA, McKinlay JB, Krane RJ (1999). The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int* 84(1): 50-56.
49. Phe V, Roupret M (2012). Erectile dysfunction and diabetes: A review of the current evidence-based medicine and a synthesis of the main available therapies. *Diabetes Metab* 38(1): 1-13.
50. Shamloul R, Ghanem H (2013). Erectile dysfunction. *Lancet* 381(9861): 153-165.
51. Luthra A, Misra A (2008). Erectile dysfunction in diabetic males: Plausible mechanisms and management strategies. *Diabetes Metab Syndr* 2(1): 81-86.
52. Cignarelli A, Genchi VA, D'Oria R, Giordano F, Caruso I, Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, Giorgino F (2021). Role of glucose-lowering medications in erectile dysfunction. *J Clin Med* 10(11).
53. McMahon CG (2014). Erectile dysfunction. *Intern Med J* 44(1): 18-26.

54. Defeudis G, Gianfrilli D, Di Emidio C, Pofi R, Tuccinardi D, Palermo A, Lenzi A, Pozzilli P (2015). Erectile dysfunction and its management in patients with diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord*. doi: 10.1007/s11154-015-9321-4. [Epub ahead of print]
55. Mobley DF, Khera M, Baum N (2017). Recent advances in the treatment of erectile dysfunction. *Postgrad Med J* 93(1105): 679-685.
56. Gonzalez-Cadavid NF (2009). Mechanisms of penile fibrosis. *J Sex Med* 6 Suppl 3: 353-362.
57. Raheem OA, Ghali F, Rajasekaran MR (2018). Penile fibrogenesis affecting men's reproductive and sexual health: Role of age and environmental factors. Sikka SC, Hellstrom WJG (Eds). *Bioenvironmental issues affecting men's reproductive and sexual health*, Pages: 423-437. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012994000268>
58. Ferrini MG, Moon J, Rivera S, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF (2012). Amelioration of diabetes-induced cavernosal fibrosis by antioxidant and anti-transforming growth factor-beta1 therapies in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *BJU Int* 109(4): 586-593.
59. Beckman JA, Paneni F, Cosentino F, Creager MA (2013). Diabetes and vascular disease: Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part ii. *Eur Heart J* 34(31): 2444-2452.
60. Musicki B, Burnett AL (2007). Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 19(2): 129-138.
61. Hatzimouratidis K, Hatzichristou D (2009). Erectile dysfunction and diabetes mellitus. *Insulin* 4(2): 114-122.
62. Keene LC, Davies PH (1999). Drug-related erectile dysfunction. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 18(1): 5-24.
63. Moore CR, Wang R (2006). Pathophysiology and treatment of diabetic erectile dysfunction. *Asian J Androl* 8(6): 675-684.
64. Aydın M., Sakallı E., Şenkul T. (2004) Diyabet ve erektil disfonksiyon patofizyolojisi, *Androloji Bülteni*, Kasım, Sayı 19, 289-292.
65. Agarwal A, Nandipati KC, Sharma RK, Zippe CD, Raina R (2006). Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. *J Androl* 27(3): 335-347.

66. Sanchez A, Martinez P, Munoz M, Benedito S, Garcia-Sacristan A, Hernandez M, Prieto D (2014). Endothelin-1 contributes to endothelial dysfunction and enhanced vasoconstriction through augmented superoxide production in penile arteries from insulin-resistant obese rats: Role of ET(A) and ET(B) receptors. *Br J Pharmacol* 171(24): 5682-5695.
67. Alkan E, Ugan RA, Basar MM, Halici Z, Karakus E, Balbay MD, Un H (2017). Role of endothelin receptors and relationship with nitric oxide synthase in impaired erectile response in diabetic rats. *Andrologia* 49(2).
68. Bleustein CB, Arezzo JC, Eckholdt H, Melman A (2002). The neuropathy of erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 14(6): 433-439.
69. Kamenov ZA (2015). A comprehensive review of erectile dysfunction in men with diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 123(3): 141-158.
70. De Young LX, Domes T, Lim K, Carson J, Brock GB (2008). Endothelial rehabilitation: The impact of chronic pde5 inhibitors on erectile function and protein alterations in cavernous tissue of diabetic rats. *Eur Urol* 54(1): 213-220.
71. Rew KT, Heidelbaugh JJ (2016). Erectile dysfunction. *Am Fam Physician* 94(10): 820-827.
72. Chrysant SG, Chrysant GS (2012). The pleiotropic effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on function and safety in patients with cardiovascular disease and hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 14(9): 644-649.
73. Gumus B, Vatansever HS, Muezzinoglu T, Muftuoglu S, Kaymaz F, Buyuksu C (2004). Histopathological effects of sildenafil citrate on rat corpus cavernosum. *Acta Histochem* 106(1): 37-45.
74. Kim J, Drury R, Morenas R, Raheem O (2022). Pathophysiology and grayscale ultrasonography of penile corporal fibrosis. *Sex Med Rev* 10(1): 99-107.
75. Ismail EA, Younis SE, Ismail IY, El-Wazir YM, El-Sakka AI (2020). Early administration of phosphodiesterase 5 inhibitors after induction of diabetes in a rat model may prevent erectile dysfunction. *Andrology* 8(1): 241-248.
76. Chen Y, Zhou B, Yu Z, Yuan P, Sun T, Gong J, Zhang Y, Wang T, Wang S, Liu K, Liu J (2020). Baicalein alleviates erectile dysfunction associated with streptozotocin-induced type i diabetes by ameliorating endothelial nitric oxide synthase dysfunction, inhibiting oxidative stress and fibrosis. *J Sex Med* 17(8): 1434-1447.

77. Cui K, Tang Z, Li CC, Wang T, Rao K, Wang SG, Liu JH, Chen Z (2018). Lipoxin a4 improves erectile dysfunction in rats with type i diabetes by inhibiting oxidative stress and corporal fibrosis. *Asian J Androl* 20(2): 166-172.
78. Francis SH, Corbin JD (2011). Pde5 inhibitors: Targeting erectile dysfunction in diabetics. *Curr Opin Pharmacol* 11(6): 683-688.
79. Qabazard B, Yousif M, Mousa A, Phillips OA (2021). Gyy4137 attenuates functional impairment of corpus cavernosum and reduces fibrosis in rats with stz-induced diabetes by inhibiting the tgf-beta1/smad/ctgf pathway. *Biomed Pharmacother* 138: 111486.
80. Ban CR, Twigg SM (2008). Fibrosis in diabetes complications: Pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vasc Health Risk Manag* 4(3): 575-596.
81. Tuleta I, Frangogiannis NG (2021). Diabetic fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1867(4): 166044.
82. Singh VP, Baker KM, Kumar R (2008). Activation of the intracellular renin-angiotensin system in cardiac fibroblasts by high glucose: Role in extracellular matrix production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(4): H1675-1684.
83. Muona P, Jaakkola S, Zhang RZ, Pan TC, Pelliniemi L, Risteli L, Chu ML, Uitto J, Peltonen J (1993). Hyperglycemic glucose concentrations up-regulate the expression of type vi collagen in vitro. Relevance to alterations of peripheral nerves in diabetes mellitus. *Am J Pathol* 142(5): 1586-1597.
84. Muona P, Peltonen J, Jaakkola S, Uitto J (1991). Increased matrix gene expression by glucose in rat neural connective tissue cells in culture. *Diabetes* 40(5): 605-611.
85. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY (2016). Tgf-beta: The master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 12(6): 325-338.
86. Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 30; 329(14): 977-86.
87. Hamaguchi E, Takamura T, Sakurai M, Mizukoshi E, Zen Y, Takeshita Y, Kurita S, Arai K, Yamashita T, Sasaki M, Nakanuma Y, Kaneko S (2010). Histological course of nonalcoholic fatty liver disease in japanese patients: Tight glycemic control, rather than weight reduction, ameliorates liver fibrosis. *Diabetes Care* 33(2): 284-286.
88. Shi X, Young CD, Zhou H, Wang X (2020). Transforming growth factor-beta signaling in fibrotic diseases and cancer-associated fibroblasts. *Biomolecules* 10(12).

89. Peng D, Fu M, Wang M, Wei Y, Wei X (2022). Targeting tgf-beta signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Mol Cancer* 21(1): 104.
90. Liu T, Feng XH (2010). Regulation of tgf-beta signalling by protein phosphatases. *Biochem J* 430(2): 191-198.
91. Kim SI, Choi ME (2012). Tgf-beta-activated kinase-1: New insights into the mechanism of tgf-beta signaling and kidney disease. *Kidney Res Clin Pract* 31(2): 94-105.
92. Walton KL, Johnson KE, Harrison CA (2017). Targeting tgf-beta mediated smad signaling for the prevention of fibrosis. *Front Pharmacol* 8: 461.
93. Zhang LW, Piao S, Choi MJ, Shin HY, Jin HR, Kim WJ, Song SU, Han JY, Park SH, Mamura M, Kim SJ, Ryu JK, Suh JK (2008). Role of increased penile expression of transforming growth factor-beta1 and activation of the smad signaling pathway in erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Sex Med* 5(10): 2318-2329.
94. Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engstrom 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): 28107-28115.
95. Finnson KW, Almadani Y, Philip A (2020). Non-canonical (non-smad2/3) tgf-beta signaling in fibrosis: Mechanisms and targets. *Semin Cell Dev Biol* 101: 115-122.
96. 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): 467-478.
97. Cho MC, Song WH, Paick JS (2018). Suppression of cavernosal fibrosis in a rat model. *Sex Med Rev* 6(4): 572-582.
98. Ryu JK, Han JY, Chu YC, Song SU, Lee KH, Yoon SM, Suh JK, Kim SJ (2004). Expression of cavernous transforming growth factor-beta1 and its type ii receptor in patients with erectile dysfunction. *Int J Androl* 27(1): 42-49.
99. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S (2012). Ctgf is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5(Suppl 1): S24.
100. Trauner M, Graziadei IW (1999). Review article: Mechanisms of action and therapeutic applications of ursodeoxycholic acid in chronic liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 13(8): 979-996.

101. Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD (2001). Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *J Hepatol* 35(1): 134-146.
102. Kotb MA (2012). Molecular mechanisms of ursodeoxycholic acid toxicity & side effects: Ursodeoxycholic acid freezes regeneration & induces hibernation mode. *Int J Mol Sci* 13(7): 8882-8914.
103. Keith BD (2000). Ursodeoxycholic acid to inhibit the growth of hepatic metastases. *Med Hypotheses* 55(5): 379-382.
104. Ikegami T, Matsuzaki Y (2008). Ursodeoxycholic acid: Mechanism of action and novel clinical applications. *Hepatol Res* 38(2): 123-131.
105. Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM (2009). Bile acids: Regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res* 50(9): 1721-1734.
106. Roma MG, Toledo FD, Boaglio AC, Basiglio CL, Crocenzi FA, Sanchez Pozzi EJ (2011). Ursodeoxycholic acid in cholestasis: Linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin Sci (Lond)* 121(12): 523-544.
107. Paumgartner G, Beuers U (2002). Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: Mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 36(3): 525-531.
108. Buko VU, Lukivskaya OY, Naruta EE, Belonovskaya EB, Tauschel HD (2014). Protective effects of norursodeoxycholic acid versus ursodeoxycholic acid on thioacetamide-induced rat liver fibrosis. *J Clin Exp Hepatol* 4(4): 293-301.
109. Buko VU, Kuzmitskaya-Nikolaeva IA, Naruta EE, Lukivskaya OY, Kirko SN, Tauschel HD (2011). Ursodeoxycholic acid dose-dependently improves liver injury in rats fed a methionine- and choline-deficient diet. *Hepatol Res* 41(7): 647-659.
110. Abd-Elhamid TH, Elgamal DA, Ali SS, Ali FEM, Hassanein EHM, El-Shoura EAM, Hemeida RAM (2018). Reno-protective effects of ursodeoxycholic acid against gentamicin-induced nephrotoxicity through modulation of nf-kappab, enos and caspase-3 expressions. *Cell Tissue Res* 374(2): 367-387.
111. Cortez LM, Campeau J, Norman G, Kalayil M, Van der Merwe J, McKenzie D, Sim VL (2015). Bile acids reduce prion conversion, reduce neuronal loss, and prolong male survival in models of prion disease. *J Virol* 89(15): 7660-7672.
112. Grant SM, DeMorrow S (2020). Bile acid signaling in neurodegenerative and neurological disorders. *Int J Mol Sci* 21(17).

113. Yanovsky Y, Schubring SR, Yao Q, Zhao Y, Li S, May A, Haas HL, Lin JS, Sergeeva OA (2012). Waking action of ursodeoxycholic acid (udca) involves histamine and gabaa receptor block. *PLoS One* 7(8): e42512.
114. Kamshoushi A SN, Helal S, Hassaan P, Omar H (2018). A study of the correlation between angiotensin (1-7) and the histopathological changes in the penises of experimentally diabetic rats. *Open J Endocr Metab Dis* 8: 81-92.
115. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Hurst V, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Wurbel H (2020). Reporting animal research: Explanation and elaboration for the arrive guidelines 2.0. *PLoS Biol* 18(7): e3000411.
116. Kapoor MS, Khan SA, Gupta SK, Choudhary R, Bodakhe SH (2015). Animal models of erectile dysfunction. *J Pharmacol Toxicol Methods* 76: 43-54.
117. King AJ (2012). The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* 166(3): 877-894.
118. Ruan Y, Li M, Wang T, Yang J, Rao K, Wang S, Yang W, Liu J, Ye Z (2016). Taurine supplementation improves erectile function in rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes via amelioration of penile fibrosis and endothelial dysfunction. *J Sex Med* 13(5): 778-785.
119. Yuan P, Ma D, Gao X, Wang J, Li R, Liu Z, Wang T, Wang S, Liu J, Liu X (2020). Liraglutide ameliorates erectile dysfunction via regulating oxidative stress, the rhoa/rock pathway and autophagy in diabetes mellitus. *Front Pharmacol* 11: 1257.
120. Winston JA, Rivera A, Cai J, Patterson AD, Theriot CM (2021). Secondary bile acid ursodeoxycholic acid alters weight, the gut microbiota, and the bile acid pool in conventional mice. *PLoS One* 16(2): e0246161.
121. Oh AR, Bae JS, Lee J, Shin E, Oh BC, Park SC, Cha JY (2016). Ursodeoxycholic acid decreases age-related adiposity and inflammation in mice. *BMB Rep* 49(2): 105-110.
122. Mendez-Sanchez N, Gonzalez V, Chavez-Tapia N, Ramos MH, Uribe M (2004). Weight reduction and ursodeoxycholic acid in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Hepatol* 3(3): 108-112.
123. Galan M, Kassan M, Choi SK, Partyka M, Trebak M, Henrion D, Matrougui K (2012). A novel role for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and its downstream

endoplasmic reticulum stress in cardiac damage and microvascular dysfunction in type 1 diabetes mellitus. *Hypertension* 60(1): 71-80.

124. Siegel JL, Jorgensen R, Angulo P, Lindor KD (2003). Treatment with ursodeoxycholic acid is associated with weight gain in patients with primary biliary cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 37(2): 183-185.
125. Marin JJ, Macias RI, Briz O, Banales JM, Monte MJ (2015). Bile acids in physiology, pathology and pharmacology. *Curr Drug Metab* 17(1): 4-29.
126. Murakami M, Une N, Nishizawa M, Suzuki S, Ito H, Horiuchi T (2013). Incretin secretion stimulated by ursodeoxycholic acid in healthy subjects. *Springerplus* 2(1): 20.
127. Zhou L, Zhang J, Fang Q, Liu M, Liu X, Jia W, Dong LQ, Liu F (2009). Autophagy-mediated insulin receptor down-regulation contributes to endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance. *Mol Pharmacol* 76(3): 596-603.
128. Turdi S, Hu N, Ren J (2013). Tauroursodeoxycholic acid mitigates high fat diet-induced cardiomyocyte contractile and intracellular ca^{2+} anomalies. *PLoS One* 8(5): e63615.
129. Fang L, Zhou Y, Cao H, Wen P, Jiang L, He W, Dai C, Yang J (2013). Autophagy attenuates diabetic glomerular damage through protection of hyperglycemia-induced podocyte injury. *PLoS One* 8(4): e60546.
130. Hu LL, Zhang KQ, Tian T, Zhang H, Fu Q (2018). Probucol improves erectile function via activation of nrf2 and coordinates the ho-1 / ddah / ppar-gamma/ enos pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 507(1-4): 9-14.
131. Lin H, Wang T, Ruan Y, Liu K, Li H, Wang S, Li M, Liu J (2018). Rapamycin supplementation may ameliorate erectile function in rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes by inducing autophagy and inhibiting apoptosis, endothelial dysfunction, and corporal fibrosis. *J Sex Med* 15(9): 1246-1259.
132. Bomzon A, Ljubuncic P (1995). Bile acids as endogenous vasodilators? *Biochem Pharmacol* 49(5): 581-589.
133. Fiorucci S, Zampella A, Cirino G, Bucci M, Distrutti E (2017). Decoding the vasoregulatory activities of bile acid-activated receptors in systemic and portal circulation: Role of gaseous mediators. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312(1): H21-H32.
134. Sinisalo J, Vanhanen H, Pajunen P, Vapaatalo H, Nieminen MS (1999). Ursodeoxycholic acid and endothelial-dependent, nitric oxide-independent

- vasodilatation of forearm resistance arteries in patients with coronary heart disease. *Br J Clin Pharmacol* 47(6): 661-665.
135. Sunagane N, Kobori T, Urono T, Kubota K (1990). Possible mechanisms of spasmolytic action of bile salts on the isolated guinea-pig gallbladder. *Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi* 26(3): 143-150.
 136. James LR, Le C, Doherty H, Kim HS, Maeda N (2013). Connective tissue growth factor (ctgf) expression modulates response to high glucose. *PLoS One* 8(8): e70441.
 137. Makino H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Suganami T, Yahata K, Fujinaga Y, Yokoi H, Tanaka I, Nakao K (2003). Roles of connective tissue growth factor and prostanoids in early streptozotocin-induced diabetic rat kidney: The effect of aspirin treatment. *Clin Exp Nephrol* 7(1): 33-40.
 138. Zhao Y, Li S, Quan E, Zhang H, Wu Y, Luo Y, Peng L, Wang J, Zhu J, Liu J (2019). Trimetazidine inhibits cardiac fibrosis by reducing reactive oxygen species and downregulating connective tissue growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Ther Med* 18(2): 1477-1485.
 139. Munoz-Garrido P, Marin JJ, Perugorria MJ, Urribarri AD, Erice O, Saez E, Uriz M, Sarvide S, Portu A, Concepcion AR, Romero MR, Monte MJ, Santos-Laso A, Hijona E, Jimenez-Aguero R, Marzioni M, Beuers U, Masyuk TV, LaRusso NF, Prieto J, Bujanda L, Drenth JP, Banales JM (2015). Ursodeoxycholic acid inhibits hepatic cystogenesis in experimental models of polycystic liver disease. *J Hepatol* 63(4): 952-961.
 140. 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 Transplant* 24(5): 1443-1454.
 141. 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.Kappab-dependent mechanisms in mice. *PLoS One* 8(1): e53573.
 142. Chung AC, Dong Y, Yang W, Zhong X, Li R, Lan HY (2013). Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of tgf-beta/smad3-regulated micrnas. *Mol Ther* 21(2): 388-398.
 143. 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): 1535-1548.

144. 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): 1464-1472.
145. Roy S, Sala R, Cagliero E, Lorenzi M (1990). Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: Phenomenon with a memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(1): 404-408.
146. Ren XJ, Guan GJ, Liu G, Zhang T, Liu GH (2009). Effect of activin a on tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 14(3): 311-320.
147. Schultz F, Hasan A, Alvarez-Laviada A, Miragoli M, Bhogal N, Wells S, Poulet C, Chambers J, Williamson C, Gorelik J (2016). The protective effect of ursodeoxycholic acid in an in vitro model of the human fetal heart occurs via targeting cardiac fibroblasts. *Prog Biophys Mol Biol* 120(1-3): 149-163.
148. Shen Y, Lu C, Song Z, Qiao C, Wang J, Chen J, Zhang C, Zeng X, Ma Z, Chen T, Li X, Lin A, Guo J, Wang J, Cai Z (2022). Ursodeoxycholic acid reduces antitumor immunosuppression by inducing chip-mediated tgf-beta degradation. *Nat Commun* 13(1): 3419.
149. Roslan Z, Hanafi NI, Sheikh ASH, Noh S, Talib F, Subrayan V, Vasudevan S, Latip NA (2021). Hydrophilic Bile Acid, Ursodeoxycholic Acid Attenuates the Effect of TGF On Human Tenon Fibroblast. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* 17: 332-342.
150. Mahran A, Mohammed R, Radwan M, Gaber H (2014). Morphological assessment of corpora cavernosa tissue in diabetic and nondiabetic patients with erectile dysfunction. *Hum Androl* 4(3): 61-65.
151. Rees DA, Alcolado JC (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 22(4): 359-370.
152. Çiçek Z, Koçaklı ZG, Akıllıoğlu K, Doğan A (2018). Diyabetik hayvan modelleri ve önemi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 27(3): 311 - 327.
153. Federiuk IF, Casey HM, Quinn MJ, Wood MD, Ward WK (2004). Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: Route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp Med* 54(3): 252-257.
154. 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 Pt 1): 910-915.

155. Decaluwe 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: 146-157.
156. Zhang LX, Liang TJ, Tan YR, Ren WH, Han GQ, Zhang J, Wang LC, Qin CY (2010). Protective effects of ursodeoxycholic acid against immune-mediated liver fibrosis in rats. *Hepatogastroenterology* 57(102-103): 1196-1202.





EKLER

UZMANLIK ALANI

Sağlık Bilimleri, Eczacılık Meslek Bilimleri, Farmakoloji

BİLİMSEL DERNEK, ORGANİZASYON VE KURULUŞLARDAKİ ÜYELİKLER/GÖREVLER

18. Bölge Trabzon Eczacı Odası, Üye, 2022- Devam ediyor

Türk Farmakoloji Derneği, Üye, 2015-Devam ediyor

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunları Derneği, Üye, 2013- Devam ediyor

ÖDÜLLER VE BURSLAR

1. Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakülte Dördüncüsü-Onur Ödülü-2013

2. Trabzon Tevfik Serdar Anadolu Lisesi Birincilik Ödülü-2007

YAYINLAR

1. Kaya Y, Çavuşoğlu İ. Vitaminler ve Kalsiyum Metabolizmasını Etkileyen İlaçlar. Kalyoncu Nİ, Kadioğlu Duman M, editörler. Gebelik ve Emzirme Döneminde Klinik Farmakoloji. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2018. p.180-5.

PROJELER

1. Kesim SM, Sevgi S, Nalbantoğlu İÇ, Erdoğan G, Yaşar Y, Kerimoğlu G. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Astragaloside IV'ün Bilateral Kavernöz Sinir Hasarı Sonrasında Gelişen Erektile Disfonksiyon Üzerine Etkileri, 2020 - Devam Ediyor
2. Yenilmez E, Alver A, Kaya C, Çavuşoğlu İ, Duman M. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Levotirasetam Maruz Kalan Gebe Sıçanların Yenidoğanlarında Teratojenite ve Gonad Toksisitesi, 2017 - 2018
3. Kesim SM, Duman M, Aykan D, Çavuşoğlu İ, Ayan B, Kurt A. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Glukagon-like peptid-1 (GLP-1) ve Glukagon-like peptid-2 (GLP-2)'nin ağrı ve inflamasyon üzerine olan etkilerinin araştırılması, 2016 – 2017

BİLDİRİLER

1. **Nalbantoğlu İÇ**, Sevgi S, Kerimoğlu G., Duman M, 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.

2. Sevgi S, **Nalbantoglu İC**, Kaya Yasar Y, Kerimoğlu G, Kesim SM (2021). Sıçanda kavernoöz sinir hasarı modelinde Astragalozit IV'ün erektil fonksiyon ve kavernoza fibrozis üzerine etkileri. TFD, 26. Ulusal ve 1. Uluslararası Farmakoloji Kongresi, 4-6 Kasım 2021, **Sözlü Bildiri**, 307-308, Online.
3. Say A, **Cavuşoğlu İ**, Erköseoglu İ., Duman M, Kalyoncu Nİ (2019). Farelerde Oluşturulan DeneySEL Depresyon Modelinde Epigallokateşin-Gallat'in Etkilerinin İncelenmesi. 25. Ulusal Farmakoloji kongresi, Aydın, Türkiye, 4-7 Kasım 2019, ss.182
4. Kadioğlu M, Erköseoglu İ, **Cavuşoğlu İ**, Aran T, Kerimoğlu G, Yarış E, Kalyoncu Nİ, Kalyoncu M (2019). Gebelikte Anjiotensin-II reseptör blokörü kullanımının sonuçları 25. Ulusal Farmakoloji kongresi, Aydın, Türkiye, 4-7 Kasım 2019, ss.251
5. Gün E, Dilaver D, Yıldırım D, **Cavuşoğlu İ**, Erköseoglu İ, Kadioğlu M (2019). Azatioprine maruz kalmış gebe kadınlarda spontan düşükler 25. Ulusal Farmakoloji kongresi, Aydın, Türkiye, 4-7 Kasım 2019, ss.252
6. Erköseoglu İ, Kadioğlu M, **Cavuşoğlu İ**, Şişman M, Osmanağaoğlu MA, Yenilmez E, Yarış E, Kalyoncu Nİ (2019). Gebe kadınlarda gadolinyum bazlı kontrast ajanlar 25. Ulusal Farmakoloji kongresi, Aydın, Türkiye, 4-7 Kasım 2019, ss.253
7. Erköseoglu İ, Kadioğlu M, **Cavuşoğlu İ**, Şişman M, Aran T, Kerimoğlu G, Yarış E, Kalyoncu Nİ (2019). Gebelikte tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) inhibitörü ilaçlara maruz kalma 25. Ulusal Farmakoloji kongresi, Aydın, Türkiye, 4-7 Kasım 2019, ss.254
8. Kalyoncu Nİ, Erköseoglu İ, Kadioğlu M, **Cavuşoğlu İ**, Osmanağaoğlu MA, Kesim M, Yarış A, Yarış E (2019). Mirtazapine maruz kalmış 59 gebe kadında görülen dört konjenital anomali 25. Ulusal Farmakoloji kongresi, Aydın, Türkiye, 4-7 Kasım 2019, ss.255
9. Kalyoncu NI, Erkoseoglu I, Kadioglu M, **Cavusoglu I**, Osmanagaoglu MA, Kesim M, Yaris E (2019). #37 Mirtazapine exposure in pregnancy and four congenital anomalies among 59 cases. Reproductive Toxicology. 88. 145.
10. Erkoseoglu I, Kadioglu M, **Cavusoglu I**, Sisman M, Osmanagaoglu MA, Yenilmez E, Yaris E, Kalyoncu N (2019). #36 Gadolinium-based contrast agents in pregnant women, Reproductive Toxicology, Volume 88, 2019, Pages 144-145.
11. Eroğlu G, Sevgi S, **Cavuşoğlu 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.

12. **Cavuşoğlu İ**, Duman MK, Sezen FS, Teratogenic Potential of Antidepressant Drug Use During Pregnancy: Evaluation of Cases Referred To KTU Teratogenicity Information Service, International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development (DRD 2019), Malatya, Türkiye, 1-3 Temmuz 2019, ss.439-441.
13. Erköseoğlu İ, **Cavuşoğlu İ**, Duman MK, Kalyoncu Nİ (2018). Levetiracetam Exposure During Pregnancy. Tiaft Turkey 3rd Regional Symposium. Drug abuse and crime, 18 - 20 Ekim 2018.
14. Duman MK, Erköseoğlu İ, **Cavuşoğlu İ**, Kalyoncu Nİ (2018). Betahistine Exposure In Pregnant Women. Tiaft Turkey 3rd Regional Symposium. Drug abuse and crime, 18 - 20 Ekim 2018.
15. Duman MK, Erköseoğlu İ, **Cavuşoğlu İ**, Kalyoncu Nİ (2018). Hydroxyzine Exposure In First Trimester. Tiaft Turkey 3rd Regional Symposium. Drug abuse and crime, 18 - 20 Ekim 2018
16. Duman MK, Erköseoğlu İ, **Cavuşoğlu İ**, Kalyoncu Nİ (2018). Medroxyprogesterone Acetate Exposure During Pregnancy. Tiaft Turkey 3rd Regional Symposium. Drug abuse and crime, 18 - 20 Ekim 2018
17. Erkoseoglu, Ilknur & **Cavusoglu, Irem** & Kadioglu, Mine & Aran, Turhan & Koç, Emine & Osmanagaoglu, Mehmet & Yenilmez, Engin & Kesim, Murat & Yaris, Ersin & Kalyoncu, Nuri. (2018). Hair dyes in pregnant women; is it safe?. Reproductive Toxicology. 80. 152.
18. Kalyoncu NI, **Cavusoglu I**, Erkoseoglu I, Kadioglu M, Aran T, Koc EA, Osmanagaoglu MA, Yenilmez E, Kesim M, Yaris E (2018). Pseudoephedrine use in the first trimester, Reproductive Toxicology, Volume 80, 2018, Pages 152-153
19. Kadioglu M, **Cavusoglu I**, Erkoseoglu I, Aran T, Koc EA, Osmanagaoglu MA, Yenilmez E, Kesim M, Yaris E, Kalyoncu NI (2018). The use of passiflora incarnate in pregnant women, Reproductive Toxicology, Volume 80, 2018, Page 152
20. **Cavusoglu I**, Erkoseoglu I, Kadioglu M, Aran T, Koc EA, Osmanagaoglu MA, Yenilmez E, Kesim M, Yaris E, Kalyoncu NI (2018). Bupropion use in the first trimester of pregnancy, Reproductive Toxicology, Volume 80, 2018, Page 153
21. Kaya C, **Cavuşoğlu İ**, Uzun F, Duman M, Kerimoğlu G, Yenilmez E (2018). Teratogenicity And Testis Toxicity On Infants of Pregnant Rats Exposed Levetiracetam, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Türkiye, 26- 28 Haziran 2018, ss.419

22. Sevgi S, **Cavuşoğlu 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), 26-28 Haziran 2018, Poster Bildirisi, 214-215, Ankara.
23. **Cavuşoğlu İ**, Erköseoğlu İ, Duman M, Aran T, Kalyoncu Nİ (2018). Evaluation of Teratogenic Effects of Calcitriol Treatment in Pregnant Women. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Türkiye, 26 - 28 Haziran 2018, ss.116 (Sözlü Bildiri)
24. Sevgi S, **Cavusoglu I**, Kaya Yaşar Y, Renda G, Kadioglu M et al (2017). *Fraxinus angustifolia* metanolik ekstresinin antinosisseptif ve antiinflamatuvar etkileri. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 17-20 Ekim 2017, Poster Bildirisi, 238-238, Trabzon.
25. Sevgi S, **Cavuşoğlu 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.
26. **Cavusoglu I**, Duman MK, Aran T, Osmanagaoglu MA, Yenilmez E, Kesim SM, Yaris E, Kalyoncu NI (2016). Retrospective Evaluation of Pregnant Women Consulted Because of Drug Exposure During Pregnancy. 7th European Congress of Pharmacology (EPHAR2016), 26-30 June 2016, Istanbul, TURKEY Congress Book Version 27.06.2016; Page 361/604.
27. **Cavusoglu I**, Duman MK, Aran T, Yenilmez E, Kesim SM, Yaris E., Kalyoncu NI. Medroxyprogesterone Acetate Use In Pregnancy. 7th European Congress of Pharmacology (EPHAR2016), 26-30 June 2016, Istanbul, TURKEY Congress Book Version 27.06.2016; Page 362/604.
28. **Cavusoglu I**, Kadioglu M, Erkoseoglu I, Aran T, Osmanagaoglu MA, Yenilmez E, Kesim SM, Kalyoncu M, Aykan D, Yaris E, Kalyoncu N (2016). Evaluation of teratogenic effects of ciprofloxacin in pregnant women exposed due to urinary tract infections, Reproductive Toxicology, Volume 60, 2016, Page 178
29. Altıntaş Aykan D, **Cavuşoğlu İ**, Erköseoğlu İ, Osmanağaoğlu MA, Aran T, Yenilmez E, Duman M, Kalyoncu Nİ, Yarış E. Paroksetinin gebelik kategorisindeki değişimlerinin teratojenite risk değerlendirmemiz üzerine etkisi. Türk Farmakoloji Derneği XXIII. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 7-10 Eylül 2015, ss.142

30. Altıntaş Aykan D, **Cavusoğlu İ**, Erköseoğlu İ, Aran T, Yenilmez E, Duman M, Kalyoncu Nİ, Yarış E. Gebelikte ilaç kullanımı: Feniramidol. Türk Farmakoloji Derneği 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 7 Eylül - 10 Aralık 2015, ss.254

