

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL PRİAPİZM SIÇAN MODELİNDE APOPTOZİSİN
ROLÜ VE EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (EGF)'NÜN PRO-
APOPTOTİK BNIP-3 ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Osman BARUT**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İrfan ORHAN**

**ELAZIĞ
2012**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. İrfan ORHAN

Üroloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İrfan ORHAN _____

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Juri Üyeleri

Prof. Dr. İrfan ORHAN _____

Prof. Dr. Rahmi ONUR _____

Prof. Dr. Enver ÖZDEMİR _____

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması aşamasında yardım ve desteklerinden dolayı değerli hocam Prof. Dr. İrfan ORHAN'a teşekkür ederim. Tıpta uzmanlık eğitimim süresince her türlü destek ve yardımlarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Rahmi ONUR'a, Prof. Dr. Enver ÖZDEMİR'e, Yrd. Doç. Dr. Fatih FIRDOLAŞ'a ve Yrd. Doç. Dr. Tunç OZAN'a teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanması aşamasında bana yardımcı olan Prof. Dr. Kazım ŞAHİN'e, Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya, Uzman Dr. Tuncay KULOĞLU'na, Dr. Cemal ORHAN'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte uyum içerisinde çalıştığım tüm uzman doktor ve araştırma görevlilerine, Üroloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak geçmişten bugüne kadar her türlü zorlukta ve sıkıntıda her zaman yanımda olan, hiçbir zaman yardım ve desteklerini benden esirgemeyen aileme sonsuz şükranlarımı sunarım. Ve hayatıma anlam katan, yaşantımı ve sahip olduğum her şeyi güzelleştiren biricik eşim Ayşe ve kızım İpek Serra'ya teşekkür ederim.

ÖZET

Cinsel uyarı olmaksızın uzamış istemsiz ereksiyon olarak tanımlanan priapizm; klinik olarak düşük akımlı, yüksek akımlı ve tekrarlayan tipte olmak üzere üç grupta sınıflandırılır. İskemik priapizm olarak da tanımlanan düşük akımlı priapizmde, kavernozaal düz kas yapısının bozulması nedeniyle erektil disfonksiyon görülebmesinden dolayı, iskemik priapizm ürolojik acil bir patoloji olarak kabul edilmektedir. Etyopatogenezinde iskemik apoptozisin etkin olduğu bu erektil disfonksiyon tablosunda, çeşitli growth faktörlerin rol oynayabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada, deneysel olarak düşük akımlı priapizm fizyopatolojisinde apoptozisi indükleyen Bcl-2/adenovirüs E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP-3) ve antiapoptotik etkiye sahip growth faktörlerden Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)'nün etkinliği araştırıldı.

Deneysel iskemik priapizm modeli oluşturulmak üzere toplam 24 adet erişkin Sprague-Dawley sıçan dört eşit grup olacak şekilde çalışmaya dahil edildi. Grup I kontrol grubu olarak değerlendirilip, Grup II'e 4 saatlik iskemik priapizm uygulandı. Grup III'e, 4 saatlik iskemik priapizm uygulanmadan önce 7 gün boyunca 10 mcg/kg dozda intraperitoneal (i.p.) EGF verildi. Grup IV'e ise, yine 4 saatlik iskemik priapizm uygulanmadan önce 7 gün boyunca 20 mcg/kg (i.p.) dozda EGF verildi. Kontrol grubunda ereksiyonun spontan sonlanmasını takiben ve diğer gruplarda 4 saatlik iskemik priapizm sonrası, tüm ratlar dekapite edilerek en bloc penis eksizyonu uygulandı. Alınan kavernozaal doku örneklerinden Western Blot yöntemi ile BNIP-3 ekspresyon düzeyi ve TUNEL metodu ile apoptozise giden hücreler belirlendi.

Gruplar BNIP-3 ekspresyon düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; en yüksek BNIP-3 düzeyi Grup II'de $120,7 \pm 1,68$ oranında saptanmakla birlikte, çalışma grupları içerisinde en düşük BNIP-3 düzeyi 7 gün boyunca 20 mcg/kg (i.p.) EGF verilen Grup IV'de $102,9 \pm 1,56$ oranında tesbit edildi. Her üç çalışma grubunda da, BNIP-3 ekspresyon düzeylerindeki artış kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmasına rağmen, EGF uygulanan gruplardaki BNIP-3 düzeyleri Grup II'e göre anlamlı olarak düşük düzeylerde belirlendi ($p < 0,05$). Apoptozis yaygınlık derecesi açısından çalışma gruplarının değerlendirilmesinde, en düşük apoptozis oranının Grup IV'de olduğu belirlendi.

Uzama süresine göre değişik oranlarda erektil disfonksiyon gelişebilecek olan iskemik priapizmde, kavernoza! düz kas bütünlüğünü korumaya yönelik antiapoptotik tedavi yöntemleri yeni araştırma konularıdır. Apoptotik etkisi olan BNIP-3'ün, EGF ile antagonize edilmesi sonucu kavernoza! dokularda görülen apoptozisdeki azalma, bu yolaklar üzerinden konservatif yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayabilecektir.

Anahtar Kelimeler: İskemik priapizm, Apoptozis, BNIP-3, EGF

ABSTRACT

THE ROLE OF APOPTOSIS AND THE EFFECT OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) ON PRO-APOPTOTIC BNIP-3 IN THE EXPERIMENTAL PRIAPISM RAT MODEL

Priapism, which is described as prolonged erection without any sexual stimulus is clinically classified in three groups as low-flow, high-flow and stuttering priapism. By low flow priapism which is also described as ischemic priapism, irreversible erectile dysfunction may result due to impairment of the cavernous smooth muscle therefore it is accepted as a urological emergency. It is reported that various types of growth factors could play a role in this ischemic apoptosis induced erectile dysfunction. In this experimental study the efficacy of apoptosis inducing Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP-3) and Epidermal Growth Factor (EGF) with its antiapoptotic effect in the pathophysiology of low-flow priapism is researched.

Twenty-four adult Sprague-Dawley rats divided into 4 equal groups were included to the study in order to realize the experimental ischemic priapism model. Group I is accepted as the control group, ischemic priapism is achieved and maintained for 4 hours in the group II. In the group III and IV EGF was intraperitoneally admitted during 7 days in 10 mcg/kg and 20 mcg/kg doses respectively before achieving the 4 hours lasting priapism status. After spontaneous regression of erection in the control and 4 hours of priapism in the other groups the rats were decapitated and en-bloc penis excision was performed. BNIP-3 expression level and the cells in the apoptotic phase were determined respectively by using Western Blot and TUNEL method in the cavernous tissue samples.

By comparing the groups in regard to the BNIP-3 expression levels it was detected that Group II had the highest and Group IV with intraperitoneal 20 mcg/kg EGF application for 7 days the lowest level with $120,7 \pm 1,68$ and $102,9 \pm 1,56$ respectively among all groups. Although the BNIP-3 expression level increase in all three study groups is statistically significant higher than the control group it was detected that BNIP-3 expression level was statistical significantly lower in the study groups with EGF admission than Group II ($p < 0,05$). By the analysis of the study

groups regarding the apoptosis extension level the lowest apoptosis rate was detected by Group IV.

The antiapoptotic therapy methods regarding the protection of the cavernosal smooth muscle structure in ischemic priapism which may result in various levels of erectile dysfunction due to the duration of the ischemic status, are new aspects of research. The decrease in apoptosis in the cavernosal tissue as a result of the antagonisation of the apoptotic agent BNIP-3 with EGF could lead to development of new therapy methods through these pathways.

Keywords: Ischemic priapism, Apoptosis, BNIP-3, EGF

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
DEKANLIK ONAYI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.2. Genel Bilgiler	2
1.2.1. Tarihçe	2
1.2.2. Anatomi	3
1.2.2.1. Korpus Kavernozum	3
1.2.2.2. Korpus Spongiozum	4
1.2.2.3. Arterler	6
1.2.2.4. Venöz Drenaj	6
1.2.2.5. Penisin İnnervasyonu	7
1.2.3. Fizyoloji	8
1.2.4. Priapizm	12
1.2.4.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji	12
1.2.4.2. Priapizm Patofizyolojisi	13
1.2.4.3. Tanı	15
1.2.4.4. Tedavi	16
1.2.5. Apoptozis	18
1.2.5.1 Apoptozisin Düzenlenmesi ve Etki Mekanizması	19
1.2.5.2. BNIP-3	22
1.2.5.3. Apoptozisin Saptanması	23
1.2.6. Priapizm ve Apoptozis	24
1.2.7. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	24

2. GEREÇ ve YÖNTEM	27
2.1. Deney Hayvanları	27
2.2. Deney Sırasında Kullanılan Anestezi	28
2.3. Ereksiyon ve Priapizmin Oluşturulması	29
2.4. İlaçlar	30
2.5. TUNEL Metodu	30
2.6. Western Blot Analizleri	33
2.7. İstatistiksel Analiz	34
3. BULGULAR	35
3.1. TUNEL Bulgular	35
3.2. Western Blot Bulgular	38
4. TARTIŞMA	40
5. KAYNAKLAR	48
6. ÖZGEÇMİŞ	56

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Priapizme neden olan etiyolojik faktörler	12
Tablo 1.2. Düşük ve yüksek akımlı priapizmin ayırıcı tanısında ölçütler	15
Tablo 1.3. Priapizm tedavisinde kullanılabilircek çeşitli ilaçlar, dozları ve uygulama yöntemleri	17
Tablo 2.1. TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi	33
Tablo 3.1. Tüm gruplarda elde edilen TUNEL boyanma indeks değerleri	37
Tablo 3.2. Epidermal Büme Faktörü (EGF)'nün BNIP-3 ekspresyonu üzerine etkisi	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Toprağın bereket tanrısı Priapus	2
Şekil 1.2. A, B Penisin aksiyel kesit anatomisi	4
Şekil 1.3. B. Penisin kesitsel anatomisi	5
Şekil 1.4. Penisin arter ağı	6
Şekil 1.5. Penisin venöz drenajı	7
Şekil 1.6. Penisin innervasyonu	8
Şekil 1.7. Flask durumda korpus kavernozum ve damarlar	9
Şekil 1.8. Ereksiyon sırasında korpus kavernozum ve damarlar	10
Şekil 1.9. NO ve türevlerinin oluşumu	11
Şekil 1.10. Düşük akımlı priapizmde patofizyolojik değişiklikler	14
Şekil 1.11. Priapizmin tedavi algoritması	16
Şekil 1.12. Apoptozis ve nekrozun morfolojik farklılıkları	18
Şekil 2.1. Rat penis anatomisi grafik	28
Şekil 2.2. Mikrocerrahi diseksiyon sonrası rat penis anatomisi	28
Şekil 2.3. Vakum ile ereksiyon oluşturulması	29
Şekil 2.4. Priapizm oluşturulması	29
Şekil 3.1.1. Kontrol grubunun (Grup I) TUNEL ile boyanması	35
Şekil 3.1.2. Priapizm grubunun (Grup II) TUNEL ile boyanması	35
Şekil 3.1.3. Epidermal Büyüme Faktörü (10mcg/kg) verilen grubun (GrupIII) TUNEL ile boyanması	36
Şekil 3.1.4. Epidermal Büyüme Faktörü (20mcg/kg) verilen grubun (GrupIV) TUNEL ile boyanması	36
Şekil 3.1.5. Pozitif kontrol için kullanılan meme dokusu	37
Şekil 3.1.6. Negatif kontrol için kullanılan meme dokusu	37
Şekil 3.2. Deneysel Priapizm Oluşturulan Sıçanlarda EGF'nin BNIP-3 Ekspresyonu Üzerine Etkisi	38

KISALTMALAR LİSTESİ

AC	: Adenilat siklaz
ADA	: Adenozin deaminaz
AR	: Adenozin reseptörü
ATP	: Adenozin trifosfat
AUA	: American Urological Association (Amerikan Üroloji Birliği)
BNIP-3	: Bcl-2/adenovirüs E1B 19 kDa-interacting protein 3
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CGRP	: Kalsitonin gen related peptid
CO	: Karbonmonoksit
DAB	: Diaminobenzodin
DAG	: Diaçil gliserol
DDV	: Derin dorsal ven
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DPA	: Dorsal penil arter
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ENT	: Equilibrative Nükleotit Transporter
ET	: Endotelin
ETA/B	: EndotelinA/B reseptörü
FADD	: Fas Associated protein with Death Domain
GPCR	: G protein coupled reseptör
GTP	: Guanozin trifosfat
HIF	: Hipoksiyle İndüklenen Faktör
HO-1	: Hem Oksijenaz
I.P.	: İtraperitoneal
IP3	: İnositol trifosfat
I/R	: İskemi-Reperfüzyon
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

L-Arg	: L-Arjinin
mNOS	: Mitokondriyal nitrik oksit sentaz
NF-kB	: Nükleer Faktör- kappa B
NANK	: Nonadrenerjik-nonkolinerjik
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
ort±SS	: ortalama±standart sapma
PDE5	: Fosfodiesteraz tip 5
PEG-ADA	: Polyethylene glycol-modified Adenozin deaminaz
pGC	: Partiküler guanilat siklaz
PGI2	: Prostaglandin I2
PIP2	: Fosfotidil inositol bifosfat
PKC	: Proteinkinaz C
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florid
ROS	: Reactive oxidative species (Reaktif oksidatif türler)
sGC	: Solubl guanilat siklaz
TBS	: Tris Buffer Saline
TUNEL	: Terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP Nick and Labeling
VIP	: Vazoaktif intestinal polipeptid

1. GİRİŞ

Priapizm; seksüel uyarı ve orgazm olmaksızın 4 saati aşan tam veya kısmi ereksiyon şeklinde tanımlanmaktadır. Kadınlarda ender olarak görülen priapizm insidansı erkeklerde de çok fazla değildir (1.5/100.000) (1). Priapizm klinikte üç farklı şekilde karşımıza çıkmaktadır. İskemik priapizm en sık görülen şeklidir ve tedavi edilmediğinde kavernoza düz kaslarda nekroz, fibrozis ve erektil disfonksiyona yol açar. Bu durum kompartman sendromunun bir örneğidir ve acil tedavi gerektirmektedir. Non iskemik priapizm ise sıklıkla kavernoza arter yaralanmasının eşlik ettiği , penil veya perineal yaralanmalarda görülür. Bu durum idiyopatik olarak ta görülebilir. Tekrarlayan priapizm ise genellikle orak hücre anemisi gibi bazı kan hastalıklarında görülmektedir (2).

İskemik priapizmde hipoksi, asidoz ve glikopeni nedeniyle 4 saat sonra kavernoza düz kaslarda değişiklikler belirlenmekle birlikte, 12. saatte ultrastrüktürel değişimler belirginleşmektedir (2, 3). İskemik priapizmin 24 saati aştığı hastalarda endotel hücrelerinde irreversibl nekroz ve erektil dokulardaki fibrozis sonucu % 90'lara varan oranlarda erektil disfonksiyon gelişebileceği bildirilmektedir (4).

İskemik priapizmde kavernoza dokuda pO₂ ve pH azalmakta, pCO₂ ise artmaktadır. Ayrıca gikopeni ile birlikte metabolik değerlerde bozulma ortaya çıkmaktadır (5). Metabolik değerlerdeki bozulma kavernoza dokuda oksidatif fosforilasyonu bozmakta ve sonuçta hücre içi adenozin trifosfat (ATP) miktarı hücrenin yaşamını devam ettirebileceği seviyenin altına düşmekte ve apoptotik süreç başlamaktadır. Bu apoptotik süreçte pek çok mediatör rol oynamakla birlikte özellikle growth faktörlerin etkin olduğu belirlenmiştir (6).

Önemli bir pro-apoptotik mediatör olan Bcl-2/adenovirüs E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP-3)'ün de priapizm patofizyolojisinde etkin olabileceği ve BNIP-3'ün inhibisyonunun priapizmde oluşabilecek penil doku patolojilerini önlemede kullanılabileceği yeni araştırma konularıdır.

Çalışmamızda sıçan düşük akımlı priapizm modelinde, kavernoza düz kasta meydana gelen fonksiyonel değişimlerde pro-apoptotik mediatör olan BNIP-3'ün rolü ve Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ile bu değişimlerin önlenebilirliğinin araştırılması amaçlandı.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Tarihçe

Priapizm çok eski zamanlardan beri bilinmekle birlikte, Yunan mitolojisi ve eski Mısır yazıtlarında adı geçmektedir. Priapizm adını antik Yunan kültüründen bilinen erkeklik ve fertilitenin sembolü olan Priapus tanrısından almıştır (Şekil 1.1). Anadolu'da geçen efsaneye göre, Zeus'un Afrodite'den olan gayr-i meşru çocuğuna, Zeus'un eşi Hera kem gözlerini göndermiş ve çocuk (Priapus) penisi kendi boyu kadar ve sürekli ereksiyon halinde doğmuştur. Afrodite çocuğundan utanmış ve onu bugün Lapseki olarak bilinen yerde bir tarlada terk etmiştir. Tarlada büyüyen Priapus, tıpkı kendisi gibi toprakla büyüyen ve yetişen her şeye güç ve bereket vermiştir. Bu onu "Bereket Tanrısı" yapmış ve çok büyük olan penisi de güç sembolü haline gelmiştir (7, 8).



Şekil 1.1. Toprağın bereket tanrısı Priapus (9)

Eski Mısır Ebers papirüslerinde priapizmle ilgili bilgiler ve tedavi için reçeteler bulunmaktadır (10).

Priapizm tanımına ilk kez 1616'da Petraens tarafından yayınlanan "Gonorrhoea, Satyriasis et Priapisme" başlıklı bir makalede rastlanmıştır (12). Priapizm'in ilk tanımlandığı İngilizce literatür ise 1845'te Tripe tarafından yayınlanmıştır (11).

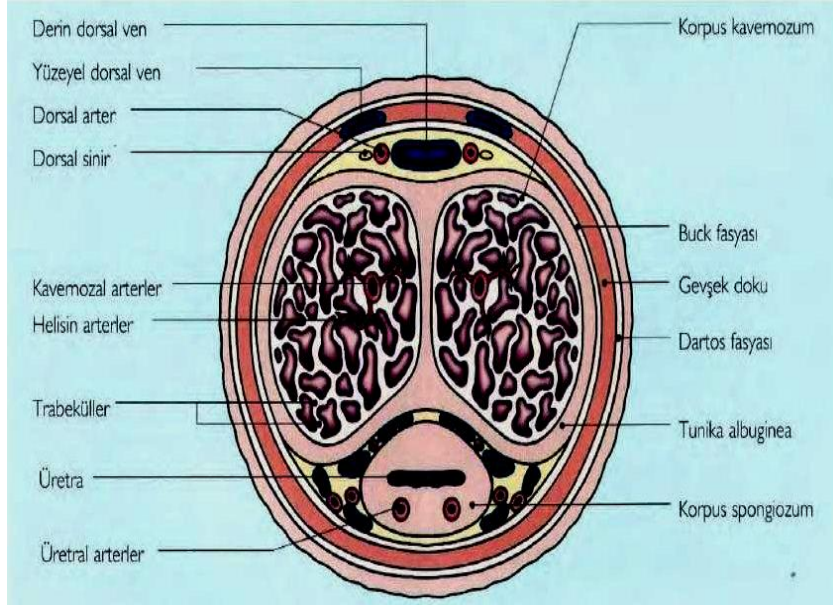
Priapizm patofizyolojisi ile ilgili modern literatürde yayınlanmış ilk makale Hinman'a ait 1914 yılında yayınlanan araştırmadır (12). Hinman priapizmi mekanik (%80) ve nörojenik (%20) olarak iki kategoriye ayırmıştır. Mekanik nedenler arasında hematolojik hastalıklar, pelvik abse, genital travma ve penil tümör, nörojenik sebepler olarak ta sifiliz, beyin tümörü, epilepsi, beyin travması ve entoksikasyonlar bildirilmiştir (12). Daha sonra 1960 yılında Frank Hinman Jr. ışık mikroskopu kullanarak, korporal dokunun günler içerisinde kalınlaşarak, ödematoz ve fibrotik hale geldiğini göstermiştir (13).

1.2.2. Anatomi

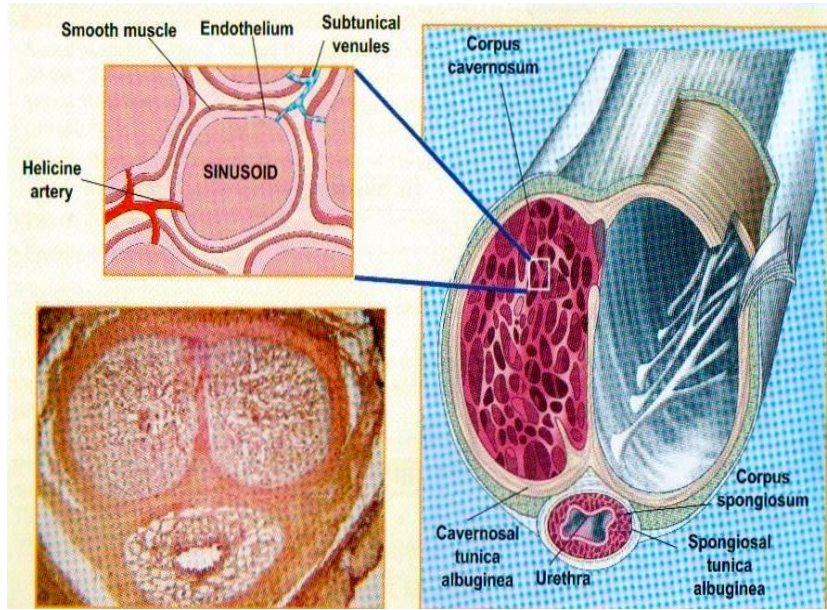
İnsan penisi iki adet kavernöz, bir adet spongioz cisimden ve bu yapıları çevreleyen fasial yapılarından meydana gelmiş kompleks bir yapıdır (14).

1.2.2.1. Korpus Kavernozum

İki tane olup, distalde birbirine yapışık olan kavernöz cisimler simfizis pubis altında birbirlerinden ayrılarak iki krus oluştururlar. Her bir krus, iskion pubis kemiğinin altındaki tuberositas iskiye yapışır. Simfizis pubis ile kavernöz cisimler arasındaki ligamentum suspensoryum, kruslardan sonra ikinci fiksasyon noktasını oluşturur. Tümesans ve rijidite sırasında korpus kavernozumdaki çok sayıda sinüzoid kanla dolar. Korpus kavernozumları ayıran septumdaki fenestrasyonlar iki taraftaki sinüzoidler arasında geçişi sağlar (Şekil 1.2 A, B) (15).



A



B

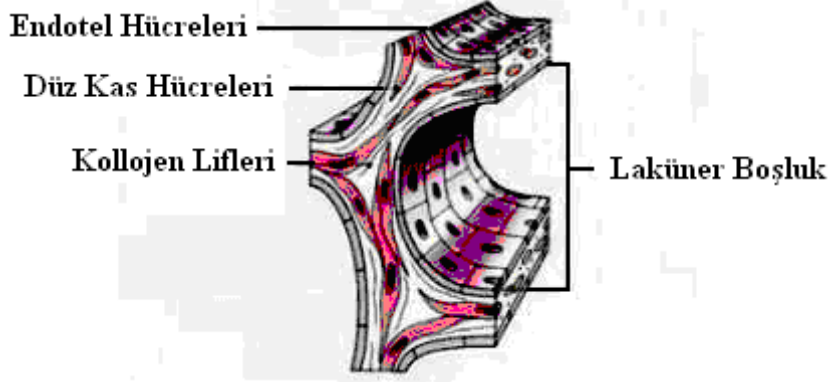
Şekil 1.2. A, B Penisin aksiyel kesit anatomisi (16)

1.2.2.2. Korpus Spongiozum

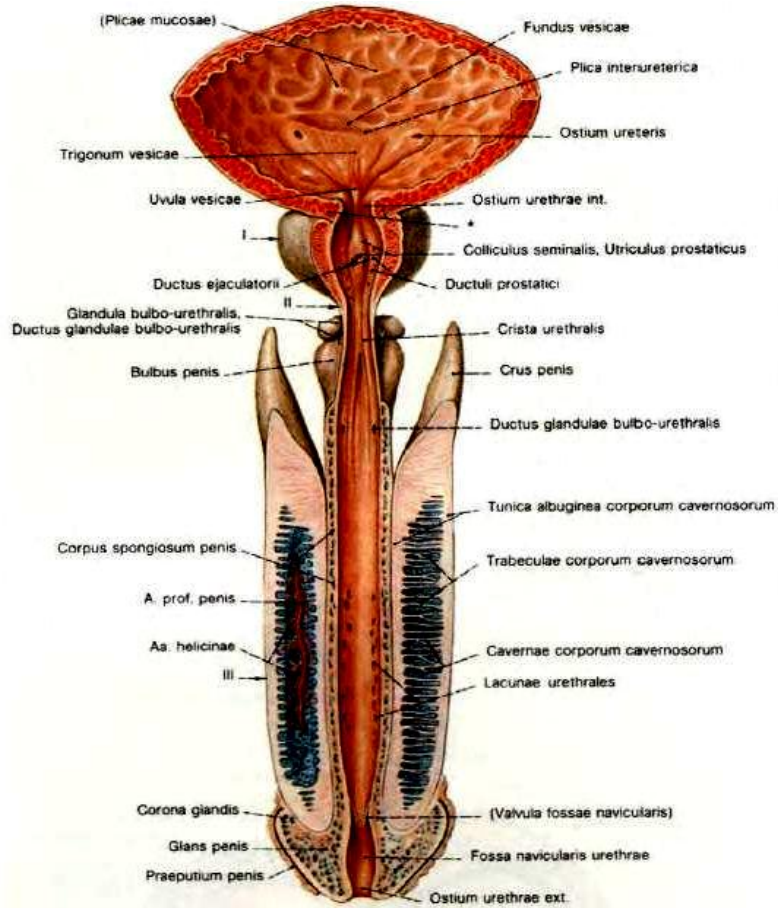
Penisin ventralinde bulunan yapıdır. Üçte ikilik distal üretrayı içerir. Distalde glans penisi oluşturur. Penisin ereksiyonuna önemli katkısı yoktur (14).

Buck fasyası, korpus kavernoza ile korpus spongiozumu sarar. Bu fasyadan oluşan fibröz bir septum kavernoza cisimleri spongiöz cisimden ayırır. Her korpus kavernoza Buck fasyasının altında, tunika albuginea olarak adlandırılan kalın fibröz bir kapsülle sarılıdır. Penis, Buck fasyasının üzerinde içten dışa doğru;

ince bir faysa (Colles fasyası), gevşek cilt altı dokusu ve cilt ile çevrilidir. Sinüzoidler endotel ile döşeli boşluklardır. Bunlar gevşek bağ dokusu ve düz kas trabekülleri ile çevrili, nörojenik uyarılara hassas aktif kontraktıl birimlerdir (Şekil 1.3A, B) (14).



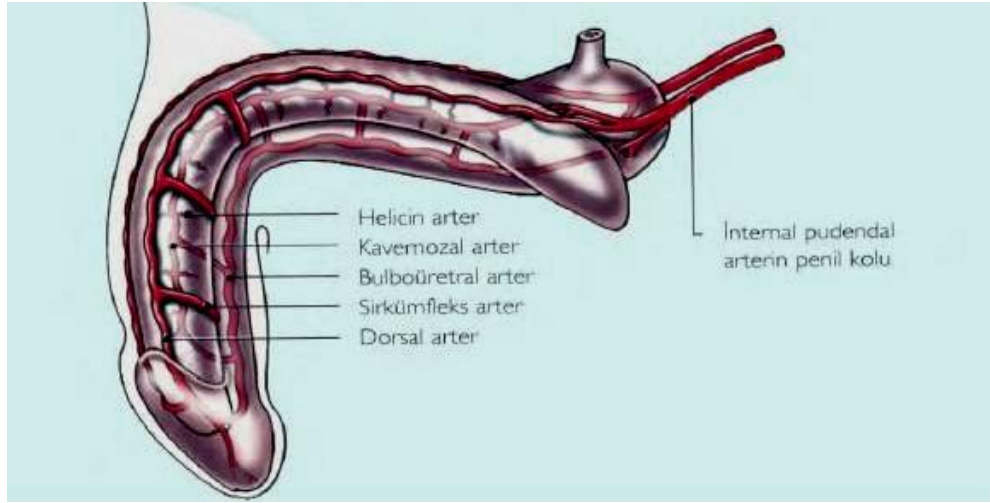
Şekil 1.3. A. Endotel hücreler (16)



Şekil 1.3. B. Penisin kesitsel anatomisi (17)

1.2.2.3. Arterler

Erektile dokunun ana arteri, internal iliak arterin terminal dalı olan internal pudendal arterdir. Her iki tarafta internal pudendal arterler penis köküne girmeden önce birer perineal, bulber ve küçük üretral dal verirler ve penil arter olarak devam ederler. Penil arterler, penis kökünde dorsal penil arter (DPA) ve kavernoöz arter olmak üzere ikiye ayrılır. DPA'ler primer olarak glans ve penis derisini kanlandırırlar. DPA'ler ile kavernoöz arterler arasında sık anastomozlar bulunur. DPA penisin dorsal yüzünde glansa doğru uzanır ve glansta kısa helisin arterler halinde son bulur. Normal durumlarda her kavernoöz cisim kendi kavernoöz arteri ile beslenir. Kavernoöz arterler her bir kavernoöz cismin ortasında ya da mediale doğru hafifçe ekzantrik yerleşim gösterirler ve sinüzoidal boşluklara küçük dallar verirler. Erektile doku kan akımının asıl kaynağı kavernoöz arterlerdir (Şekil 1.4) (14). Bununla birlikte penil arteryel anatomide anlamlı varyasyonlar bulunabilir. Bookstein ve Leng, erektil disfonksiyonlu 25 hastada yaptıkları bir araştırmada, olguların %80'inden fazlasında klasik anatomiden farklı önemli varyasyonlar saptamışlardır (15).

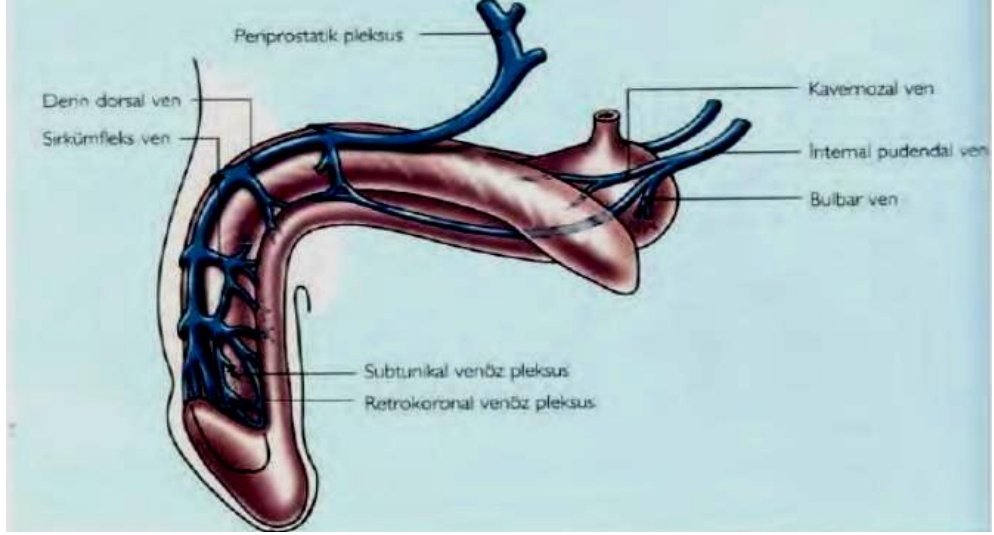


Şekil 1.4. Penisin arter ağı (17)

1.2.2.4. Venöz Drenaj

Kavernoöz cisimlerin venöz drenajı emisser ya da sirkumfleks venler aracılığı ile derin dorsal vene (DDV) olur. DDV retropubik venöz pleksusa dökülür. Kavernoöz cisimlerin proksimal kısmının drenajını sağlayan kavernoöz venler, deri ve deri altı dokusunu drene eden üretral venlerle birleşerek internal pudendal vene; deri ve derialtı dokusunu drene eden süperfisyal dorsal ven ise eksternal pudendal vene

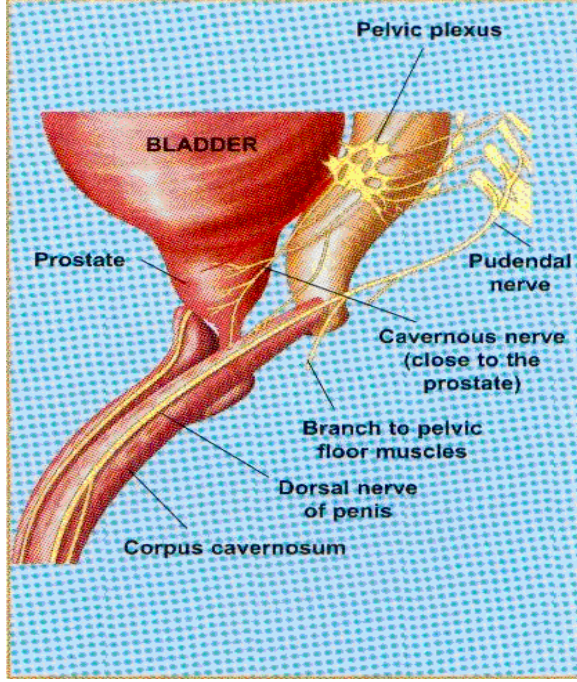
dökülür. Kavernoöz cisimlerin venöz drenajı retropubik pleksus ve internal venler aracılığı ile internal iliak vene olurken, penisin süperfisyal venöz drenajı eksternal pudental venler aracılığı ile eksternal iliak vene olmaktadır (Şekil 1.5) (14).



Şekil 1.5. Penisin venöz drenajı (17)

1.2.2.5. Penisin İnnervasyonu

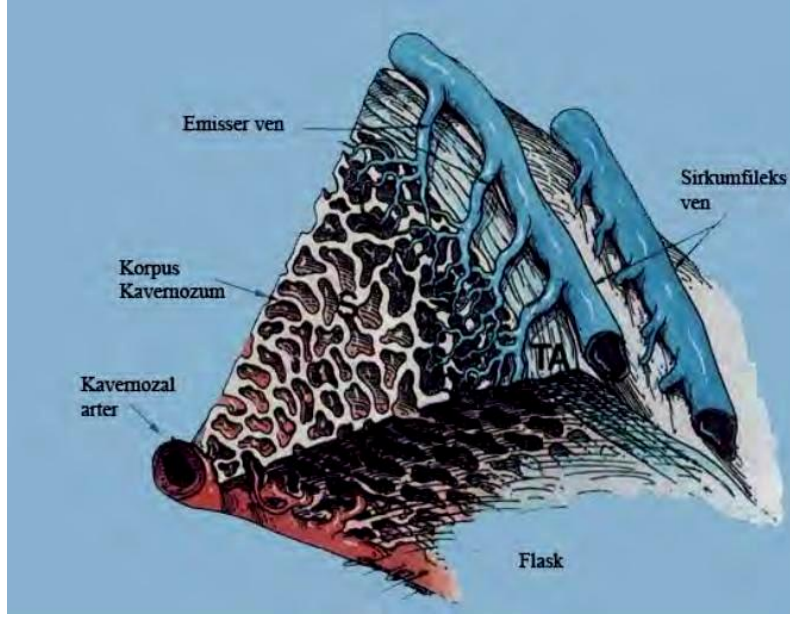
Penis derisi ve glans penisten gelen duyuyu ileten sinir lifleri dorsal penil sinir yolu ile pudental sinire katılırlar. Penisin somatik innervasyonu pudental sinir kanalı ile primer olarak S2, S3 ve S4 spinal sinirlerden kaynaklanır. Glans penisin parasempatik innervasyonunu sağlayan liflerin kökeni S2-4'tür ve nervus erigentes (nervus splanchnici pelvici) aracılığı ile pelvik pleksusa ulaşırlar. Ejakülasyonu sağlayan sempatik liflerin çıkış merkezi ise T11-L2 spinal segmentleridir (Şekil 1.6) (14).



Şekil 1.6. Penisin innervasyonu (16)

1.2.3. Fizyoloji

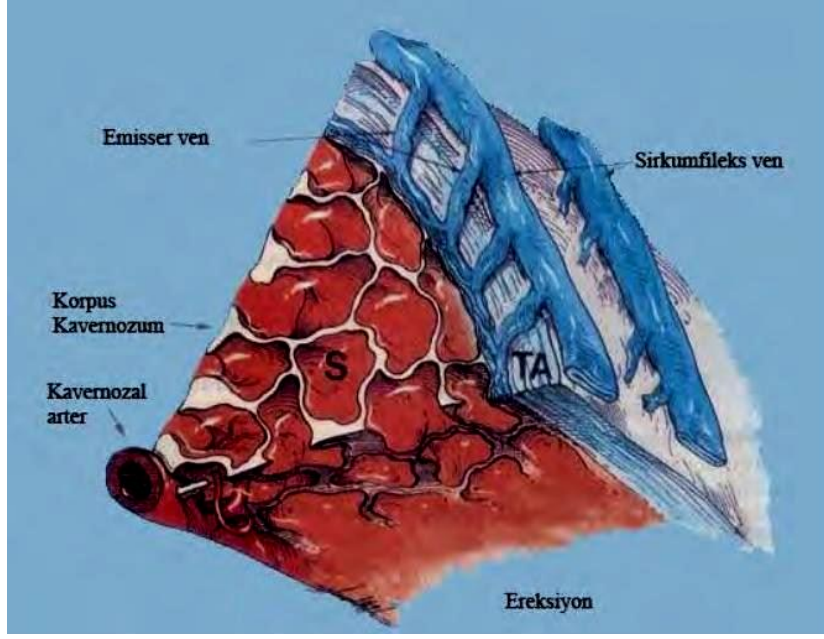
Ereksiyon, kavernöz arteriyoller, venüller ve sinüzoidlerdeki düz kasların tonusu ile düzenlenen kompleks bir hemodinamik olaydır. Flask bir peniste, bazal alfa-adrenerjik stimülasyon, kavernoza arterioller ve korporal sinüzoidlerin düz kaslarını kontrakte durumda tutar. Bu evrede kavernöz cisimlere sadece metabolik faaliyetlere yetecek kadar kan akımı olmaktadır. Sinüzoidler kontrakte durumda iken tunika albuginea ile sinüzoid duvarları arasında seyreden venüller açık olup venöz drenaj serbestçe olmaktadır (Şekil 1.7) (18).



Şekil 1.7. Flask durumunda korpus kavernozum ve damarlar (16)

Penil ereksiyon;

- Seksüel uyarı ile kavernozaal sinirlerden düz kas gevşemesini sağlayacak nörotransmitter salınımı
- Hem sistolik, hem de diastolik fazda artmış kan akımı için arteriyol ve arterlerde dilatasyon
- Genişleyen sinüzoidlere kanın depolanması
- Subtunikaal venlerin, tunika albuginea ve periferik sinüzoidler arasında kompresyonu ile venöz geri dönüşte azalma (Tümesans fazı)
- Tunikanın gerilmesiyle, içteki sirküler ve dıştaki longitudinal tabakalar arasındaki emisser venlerin kapanması ile venöz geri dönüşümün en aza inmesi
- Kavernoza içi basıncın artması (yaklaşık 100 mmHg) ile penisin ereksiyon konumunu alması (Tam ereksiyon fazı)
- İskiyokavernozaal kasların kasılması ile kavernozaal basıncın daha da artması (birkaç yüz mmHg) (rijid ereksiyon fazı) ile gerçekleşir (Şekil 1.8) (18).

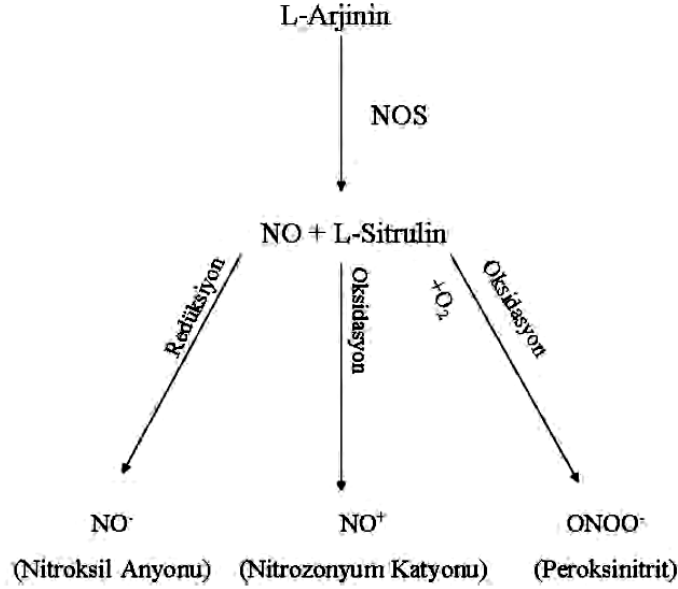


Şekil 1.8. Ereksiyon sırasında korpus kavernozum ve damarlar (16)

Penil ereksiyonu başlatan ve yöneten nöromediyatör nitrik oksittir. Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentetaz (NOS) enziminin katalizörlüğünde L-Arjininin (L-Arg), L-Sitruiline dönüşmesi sırasında meydana gelmektedir (Şekil 1.9). Bu tepkimeden meydana gelen NO, çözünebilir guanilat siklaz enzimini aktive ederek, siklin guanozin monofosfat (cGMP) üretimini arttırmakta ve sonuçta arteriyel ve kavernozaal düz kasta gevşeme meydana gelmektedir (19). NOS'un başlıca 3 farklı izoformu tanımlanmıştır. Bunlar;

- NOS Tip 1 (nöronal NOS veya nNOS)
- NOS Tip 2 (indüklenebilir NOS veya iNOS)
- NOS Tip 3 (endotelyal NOS veya eNOS)

NOS Tip1 ve NOS Tip3, temel NOS (constitutive NOS veya cNOS) olarak adlandırılır. Ayrıca yakın zamanda tanımlanan ve mitokondriyal NOS (mNOS) olarak isimlendirilen yeni formda bulunmaktadır. Tanımlanan NOS izoformları arasında penil ereksiyon mekanizmasında en önemli rolü arteriyel vazodilatasyon oluşturması nedeniyle eNOS oynamaktadır.



Şekil 1.9. NO ve türevlerinin oluşumu (19).

Kavernöz arterdeki basınç ve akım, ereksiyon sürecinin arteryel yeterliliğini belirler. Arteryel akım azalırsa veya kanın geri dönüşümü artarsa detümesans oluşur.

Pudental ve kavernöz arteryel akımların ve intrakorporal basınçların gözlenmesi sonucu ereksiyonun;

- Flask/Latent
- Tümesans
- Tam Ereksiyon
- Rijid Ereksiyon
- Detümesans

olmak üzere 5 faza bölünebileceği gösterilmiştir (20).

Detümesans, penil ereksiyonun sonlanmasını ve tekrar flask duruma geçişi tanımlamaktadır. Detümesans sırasında sırasıyla aşağıdaki olaylar gerçekleşir;

- Kavernöz düz kasın kasılması
- Arteryel akımda azalma
- Venöz geri dönüşün tam olarak ya pasif (intrensek düz kas tonusu ile) ya da aktif (artmış sempatik aktivite ile) veya her ikisi ile sağlanması sonucunda gerçekleşir.

İnsanda ereksiyon sırasında kavernöz düz kastaki elektriksel aktivite azalmakta, detümesans ile normale dönmektedir (21, 22).

1.2.4. Priapizm

Priapizm, cinsel uyarı olmaksızın uzamış istenmeyen ereksiyon halidir (23).

1.2.4.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Priapizm, insidansı bütün yaş guruplarında 1.5/100.000'dir (1). Tipik olarak insidans 5-10 yaş arasında ve 20-50 yaş arasında iki kez pik yapar. Çocukluk çağında en sık neden olarak hücre anemisi iken, erişkinlerde sıklıkla farmakolojik ajanlar nedeni ile priapizm gelişmektedir (10). Ancak priapizm uzamış noktürnal ereksiyonun sonucu olarak veya seksüel ilişki sonrasında da başlayabilmektedir. Etiyolojik faktörlerin ortak noktası ereksiyonun devamlılığında seksüel uyarının veya uyarının mevcut olmamasıdır (24). Priapizme neden olan faktörler Tablo 1.1' de özetlenmiştir.

Priapizmin sınıflandırılması patofizyolojisine göre; Düşük akımlı (iskemik), yüksek akımlı (iskemik olmayan), etiyojiye göre; primer, sekonder, idyopatik veya tekrarlama sıklığına göre; tekrarlayan, tekrarlamayan şeklinde yapılmaktadır. Günümüzde kabul edilen sınıflama ile priapizm 3 grupta incelenmektedir.

- 1- İskemik(düşük akımlı) priapizm,
- 2- Non-iskemik (yüksek akımlı) priapizm,
- 3- Tekrarlayan (rekürren) priapizm.

Tablo 1.1. Priapizme neden olan etiyojik faktörler (24).

İdyopatik

İlaçlar

Antikoagülanlar

- Heparin
- Varfarin

Antihipertansifler

- Dihidralazin
- Guanetidin
- Labetolol
- Nifedipin
- Fenoksibenzamin

Antidepresanlar

- Fenelzin
- Trazodon
- Hipnotikler
- Klozapin
- Diazepam

Alfa adrenerjik reseptör blokerleri

Tamsulosin (25)

Doksazosin (26)

Terazosin (27)
Prazosin (28)
Bağımlılık yapıcı maddeler
Kokain
Etanol
Marihuana
İntrakavernozal enjekte edilebilen ilaçlar
Papaverin
Prostoglandin E1
Sildenafil sitrat (29)
Testosteron (30)

Hematolojik bozukluklar

Orak hücreli anemi
Lösemi
Multiple myelom
Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri
Talasemi
Trombositopeni
Henoch-Schonlein purpurası

Metabolik bozukluklar

Amiloidozis
Fabry Hastalığı
Gut
Diyabet
Nefrotik sendrom
Böbrek yetmezliği
Hemodiyaliz sendromu
Hiperlipidemik total parenteral beslenme sendromu

Travma

Tümörler (primer veya metastatik)

Nörolojik bozukluklar

1.2.4.2. Priapizm Patofizyolojisi

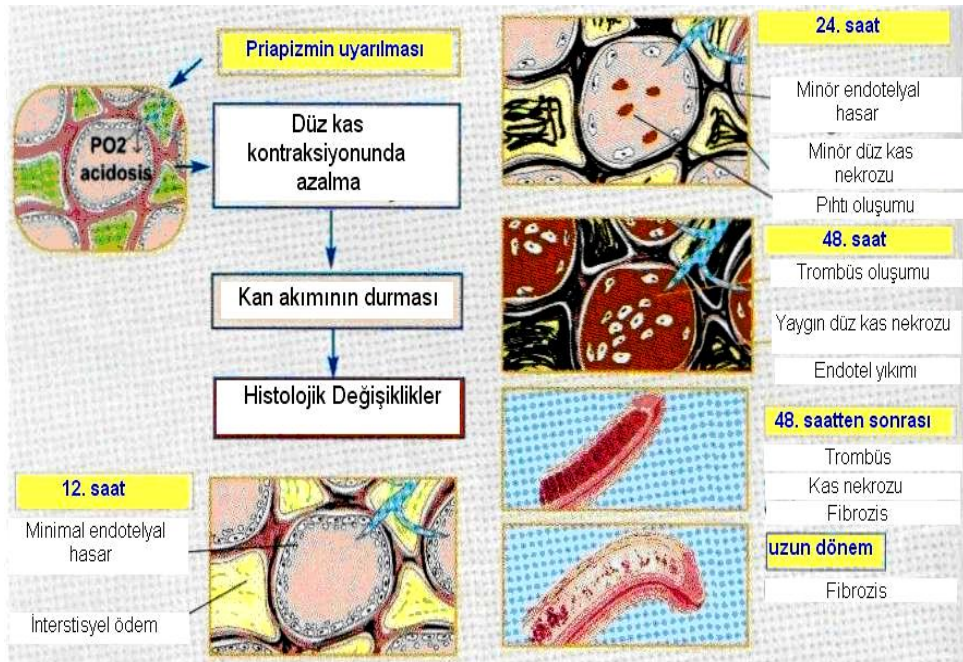
Arteriyel veya veno-oklüzif mekanizmayı etkileyen, penil hemodinamideki uyumsuzluk priapizm ile sonuçlanmaktadır (10). Bu mekanizma her iki tip priapizmi de (düşük ve yüksek akımlı) açıklamaktadır.

Kavernozal dokuların iskemik hasarı erektil disfonksiyona neden olacağından dolayı iskemik priapizmin erken değerlendirilmesi ve tedavisi önemlidir. Bu nedenden dolayı priapizmin tipinin belirlenmesi hayati önem taşımaktadır.

İskemik (veno-oklüzif, düşük akımlı) priapizm en sık görülen tiptir. İskemik priapizmi tanımlamada ereksiyon süresi tartışmalıdır. Bununla birlikte, deneysel ve klinik çalışmalar göstermiştir ki, hipoksi ve asidoz 4 saat sonra kavernoza fibrozise neden olmaktadır ve bu süreden önce priapizmin tedavi edilmesi kavernoza fibrozisi

önleyebilmektedir (31, 32, 33). İskemik priapizm rijid ve ağrılı ereksiyon ile karakterizedir. Kavernoza kan gazı analizlerinde sıklıkla hipoksi, hiperkapni ve asidoz ile bulunmaktadır. İskemik priapizmde, kavernoza düz kasta ultrastrüktürel değişiklikler 12 saat sonra, fokal nekroz 24 saat sonra, son olarak geniş nekroz ve fibroblast benzeri hücrelerin transformasyonu ise 48 saat sonra görülmektedir (34). Tedavi edilmezse veya tedavide geç kalırsa (>24 saat) kavernoza düz kaslarda nekroz, irreversibl korporal fibrozis ve erektil disfonksiyon meydana gelmektedir (Şekil 1.10) (26).

Non-iskemik (arteriyel, yüksek akımlı) tip, priapizmin daha az görülen tipidir ve düzensiz kavernoza kan akımı nedeniyle oluşmaktadır. Bu tip sıklıkla kavernoza arter veya dallarından birinin korpus kavernoza içine rüptürü sonucu meydana gelmektedir (35). Ayrıca intrakavernoza tedavi sırasında kavernoza arterin iğne ile laserasyonunun da yüksek akımlı priapizme neden olduğu rapor edilmiştir (36). Travma sonrası, düzensiz arterial akım, direkt olarak lakunar alanlara girmektedir. Bunun sonucu kavernoza sinüslerde kan göllenmekte ancak subtunika venüllerin kompresyonu tümensanı tamamiyla önlemek için yeterli düzeyde olmamaktadır (37). Bu nedenden dolayı ereksiyon genellikle ağrısızdır ve korpus kavernoza rijit değildir. Kavernoza kan analizi normal arterial oksijen basıncını gösterir; asidoz ve hipoksi yoktur. Aspirasyon kan rengi açık kırmızıdır ve acil tedavi gerekli değildir.



Şekil 1.10. Düşük akımlı priapizmde patofizyolojik değişiklikler (16).

Üçüncü tip olan tekrarlayan priapizm oldukça ender görülmektedir ve istenmeyen ağrılı ereksiyon epizodları arasında detümesans periyotları ile seyretmektedir. Sıklıkla idiopatik olmakla beraber daha fazla iskemik olma eğilimindedir. Özellikle çocuklarda orak hücre anemisi ile ilişkili olabilmektedir (38).

1.2.4.3. Tanı

Priapizm tanısı sıklıkla klinik olarak kolaylıkla konur. Anamnez, fizik muayene ve gerektiğinde yapılacak laboratuvar incelemeler ile etyolojinin saptanması mümkündür. Anamnez sırasında sorgulanması gereken en önemli parametrelerden birisi priapizmin süresidir. Dört saatten daha uzun süren priapizm olgularında kavernoza fibrozis daha sık gelişmekte ve erektil disfonksiyon sıklığı artmaktadır. Sıra dışı vakalarda ise penil nekroz görülebilmektedir (6). Ağrının varlığı düşük akımlı ve yüksek akımlı priapizmin ayırıcı tanısında faydalı olabilir. Yüksek akımlı priapizm sıklıkla ağrısız olmaktadır.

İdiyopatik priapizm ile başvuran hastalarda, mutlaka hematolojik diskrazi, malignensi, yüksek doz antidepresan, psikoaktif ilaç kullanımı araştırılmalıdır.

Düşük akımlı priapizm ile yüksek akımlı priapizmin ayırımını sağlayacak en önemli inceleme intrakorporeal kan gazı analizidir. Düşük akımlı ve yüksek akımlı priapizm ayırımı tablo 1.2'de özetlenmiştir (1, 10, 24).

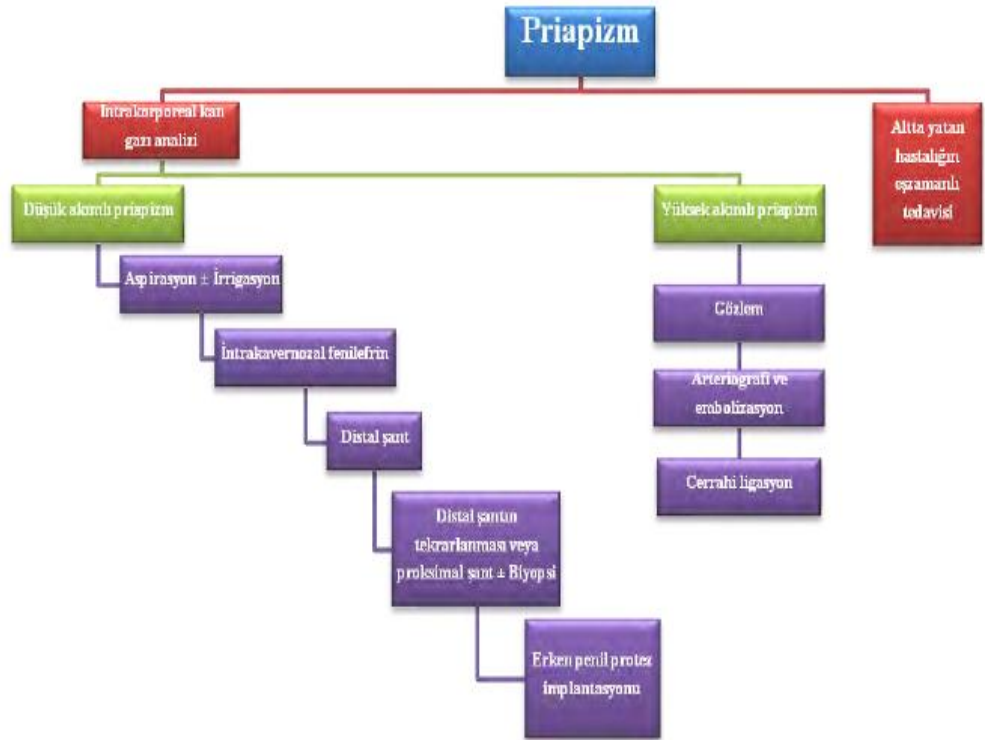
Tablo 1.2. Düşük ve yüksek akımlı priapizmin ayırıcı tanısında ölçütler (1, 10, 24).

	Yüksek akımlı priapizm	Düşük akımlı priapizm
pO₂	>30 mmHg	<30 mmHg
pCO₂	<60 mmHg	>60 mmHg
pH	>7.25	≤7.25
Ağrı	-	++
Pulsasyon	++	-
Palpasyon	Elastik	Rijid
Arteryel akım	Yüksek	Düşük
Venöz akım	Var	Yok
Viskozite	Düşük	Yüksek

1.2.4.4. Tedavi

Düşük ve yüksek akımlı priapizm ayrımı yapıldıktan sonra tedavi seçeneği belirlenmektedir (Şekil 1.11).

Düşük akımlı priapizm kavernoza dokuda iskemi ve buna bağlı erektil disfonksiyona neden olabileceğinden acil müdahale gerektirmektedir. Düşük akımlı priapizm tanısı konar konmaz 19 G kelebek iğne ile korpus kavernoza aspirasyonuna başlanmalıdır. Aspirasyon ile irrigasyon uygulanabilir. Aspirasyon ile ağrı azalır, intrakavernoza basınç düşer ve kavernoza düz kasların yeniden oksijenlenmesi sağlanmış olur. Bu tedavinin yaklaşık %30'luk bir başarı oranı vardır. On dakikalık bir detümesanstan sonra başarılı olunamazsa alfa-adrenerjik bir ajan intrakavernoza olarak uygulanmalıdır. Uygulanabilecek alfa-adrenoreseptör agonistleri ve diğer ilaçların dozları Tablo 1. 3' te özetlenmiştir. Bu tedavi, cerrahi yöntemlere geçmeden önce detümesansı sağlamak için 1 saat boyunca tekrarlanmalıdır (1, 39).



Şekil 1.11. Priapizmin tedavi algoritması (40).

Tablo 1.3. Priapizm tedavisinde kullanılabilecek çeşitli ilaçlar, dozları ve uygulama yöntemleri (1, 39).

İlaç	Doz
İntrakavernozal uygulama	
Alfa-adrenoseptör agonistleri	
Epinefrin	0.03-0.05 mg
Etilnefrin	2-20 mg
Fenilefrin	0.1-1 mg
Norepinefrin	0.01-0.02 mg
Metilen mavisi	50 mg
İntravenöz/oral uygulama	
Dopamin	2-4µg/kg i.v.
Terbütalin sülfat	5 mg oral
Ketamin hidroklorür	1 mg/kg i.v. veya i.m.

Konservatif tedavi ile detümesans sağlanamaz ise cerrahi tedavi uygulanmalıdır. Cerrahi tedavide amaç korpus kavernozum ile glans penis (korpus spongiozum) arasında veya korpus kavernozum ile venöz dolaşım arasında bir şant oluşturmaktır (10). Korpus kavernozum ile glans penis arasında şant oluşturmanın en kolay yöntemi Winter prosedürüdür. Bu uygulamada bir biyopsi iğnesi glans penisten korpus kavernozumuna kadar ilerletilir (41, 42, 43, 44, 45). Başarısız olunan vakalarda daha kesin bir şant oluşturmak gereklidir. Grayhack'ın tanımladığı kavernosafenöz şant veya Quackles tarafından tanımlanan kavernospongioz şantlar uygulanabilir (46, 47). Son olarak 2009 yılında Tom Lue ve arkadaşları tarafından oluşturulan ve diğer tüm distal ve proksimal şantların yerini alma potansiyeli olan T şantları tanımlanmıştır. Bu prosedürde on numara bistüri, glans penisten aynı taraftaki korpus kavernozumuna kadar ilerletilir ve daha sonra üretranın aksi yönüne 90 derece çevrilir (48). Cerrahi dekompresyon tekniklerinin başarı oranları yaklaşık %75'tir (39).

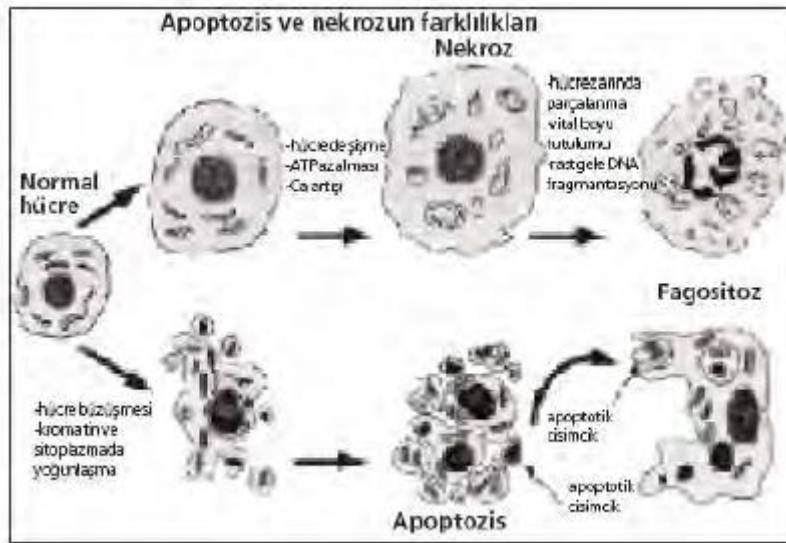
Rees ve arkadaşları, konvansiyonel tedaviye yanıtız priapizm vakalarına acil penil protez implantasyonu uygulamasını önermişlerdir. Hastalarda, erken komplikasyon gözlenmediği, hastaların tamamının sonuçtan memnun olduğu ve

büyük çoğunluğunun seksüel olarak aktif olduğu, penil uzunluğun korunabildiği bildirilmiştir (49).

1.2.5. Apoptozis

Apoptozis; Wyllie, Kerr ve Currie tarafından hücre büzülmesi ve nükleer kondensasyonla seyreden hücre ölümünü tanımlamak için yunanca “dökülen yaprak” anlamına gelen kelimedenden türetilmiştir (50). Apoptozis ya da programlı hücre ölümü bütün çok hücreli canlılarda organ boyutunun sabit kalması için durmadan yenilenen dokularda hücre proliferasyonunun kontrolünü tanımlamaktadır (51). Programlı hücre ölümü sadece apoptozis terimini içermemektedir. Programlı hücre ölümü apoptozis, apoptozis benzeri programlanmış hücre ölümü ve nekroz benzeri programlanmış hücre ölümü olmak üzere 3 başlıkta incelenmektedir.

Apoptozis, nekrozdan oldukça farklıdır (52) (şekil 1.12). Nekrozda akut hücre hasarını takiben hücre ve organellerinin şişip lizise uğradığı pasif ve patolojik bir hücre ölümü söz konusudur.



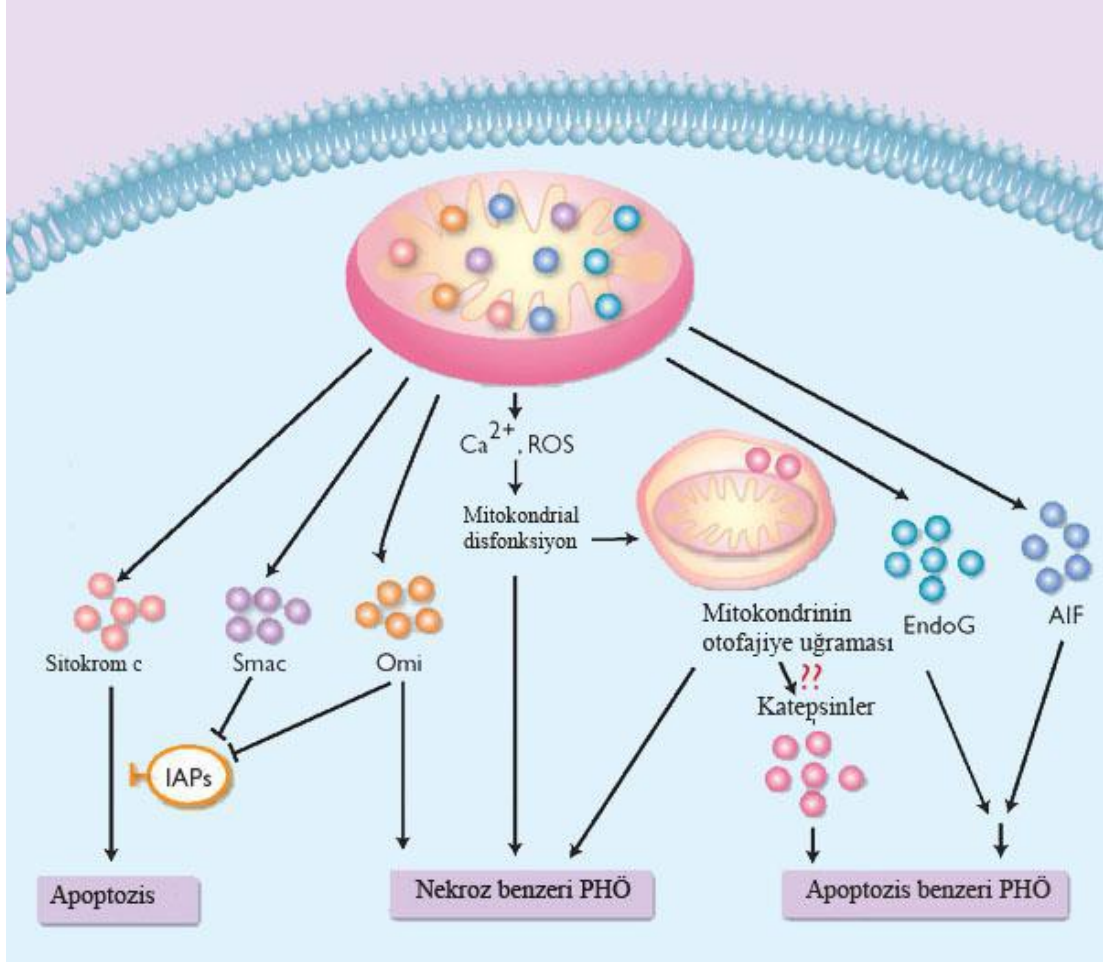
Şekil 1.12. Apoptozis ve nekrozun morfolojik farklılıkları (52).

Nekroz sırasında hücrenin su ile şişerek patlaması sonucunda hücre içeriğindeki moleküllerin ortama çıkması ile inflamatuvar yanıt oluşur. Apoptozis ise nekrozdan farklı olarak aktif işlev gerektiren genetik kontrollü bir süreçtir. Apoptozis sırasında hücre büzülür ve 1 saatten kısa bir sürede hacminin %30'unu kaybeder. Mitokondriyum morfolojik olarak sağlamdır, ancak burada hasarlanan asıl hedef organel hücre çekirdeğidir. Nükleusta kromatin yoğunlaşır ve deoksiribonükleik asit (DNA) parçalanır. Bu DNA parçaları hücre zarı ile kaplıdır (apoptotik cisimcikler)

ve çevredeki hücreler tarafından fagositoz ile uzaklaştırılır. Apoptozis sırasında hücre içeriği membranla kaplı olduğundan inflamatuvar yanıt gelişmez. Apoptozun aşırı olduğu durumlarda ortamdaki makrofajlar apoptotik cisimcikleri yeterli fagositozla temizleyemezlerse bunlar degrade olarak ikincil nekroza uğramakta ve inflamasyona yol açabilmektedirler (53). Programlanmış hücre ölümü, embriyogenezis, organ involüsyonu (örneğin; timus), immünolojik reaksiyonlar ve diferansiye hücrelerin yaşam sürelerinin sonlanması gibi birçok fizyolojik olayda yer almaktadır (54). Ayrıca değişik hücre tiplerinde farklı çevresel uyarılar apoptozisi başlatmaktadır. Hemen tüm hücrelerde iyonizan radyasyon, inflamatuvar sitokinler, oksidatif stres, redoks potansiyelinde değişiklikler, büyüme faktörleri veya trofik faktörlerin ortamdaki kaybolması, mekanik stres apoptozisi başlatabilmektedir (53, 54, 55). Apoptozis reaktif oksijen radikalleri ile uyarılabilir. Antioksidan enzimlerin azalması, apoptozisin uyarılmasından sorumlu hücrel reaktif oksijen radikallerinin artışına neden olmaktadır (53).

1.2.5.1 Apoptozisin Düzenlenmesi ve Etki Mekanizması

Apoptotik süreçte bugüne kadar saptanmış en az 30 protein ve bir o kadar da olası rolü düşünülen protein vardır. Apoptozis Bcl-2 grubu dimerize proteinler tarafından kontrol edilir. Bcl-2 geni, bir proto-onkogendir. Bazı antiapoptotik (bcl-2, bcl-xl) ve pro-apoptotik (bax, bad) proteinler bu grupta yer almaktadır. Apoptozis ile ilgili diğer önemli bir protein de p53 geni ile ilişkilidir. p53 geni, insan malignitelerinde en sık mutasyonu gösterilmiş genidir. Aberran hücre büyümesi ve hücre bölünmesini azaltıcı önemli görevleri olan bu onko-supresör gen, DNA hasarı ile aktive olur ve apoptozisi başlatabilmektedir. Ölüm reseptörü olarak adlandırılan bir membran proteini olan Fas antijeni, apoptozisin diğer bir kilit noktasını oluşturmaktadır. Fas antijeninin hücre yüzeyinde ilgili ligandına bağlanması ile intrasitoplazmik FADD (Fas Associated protein with Death Domain, Fas ile ilişkili hücre ölümü zinciri) kompleksi oluştuğu gösterilmiştir (56). Apoptozis sırasında hücre fragmentasyonunu sağlayan proteolitik enzim ailesine kaspazlar adı verilmektedir (56,57). Sistein proteaz yapıda olan bu enzimler tüm hücrelerde inaktif pro-enzim halinde bulunurlar. Ölüm sinyalinin başlatan enzimler olarak da kabul edilen kaspazlar bir kaskad şeklinde birbirini aktive ederek apoptozis sürecinde rol oynarlar (şekil 1.13) (58). Kaspaz enzimleri apoptotik süreçte çok önemli bir rol



Şekil 1.14. Kaspaz bağımsız apoptozis şeması (59)

IAP: Apoptozis inhibitörü (Inhibitor of apoptosis)

EndoG: Endonükleaz G

AIF: Apoptozisi indükleyen faktör (Apoptosis Inducing Factor)

PHÖ: Programlı hücre ölümü

Smac: Mitokondriden salınan ikinci kaspaz aktivatörü (Second mitochondria derived activator of caspase)

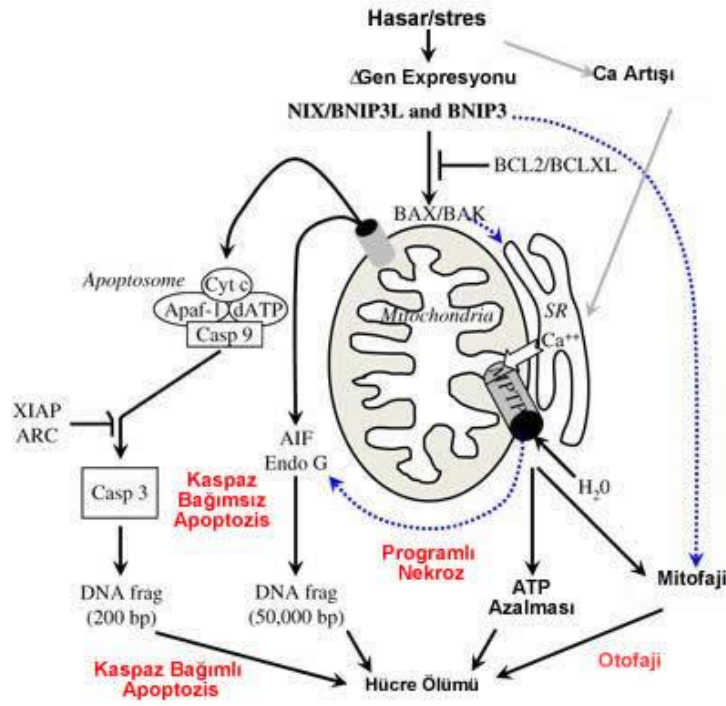
ROS: Reaktif oksidatif türler (Reactive oxidative species)

1.2.5.2. BNIP-3

Bcl-2/adenovirüs E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP-3), hipoksik durumlarda upregüle olan Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinden birisidir (60,61). BNIP-3'ün kuvvetli şekilde aşırı ekspresyonu mitokondride geçirgen transisyon porlarının (permeability transition:PT) açılması, membran potansiyelinin kaybı ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile karakterizedir (62). BNIP-3 ekspresyonu sonrası yaygın sitoplazmik vakuolizasyon ve elektron-dens cisimlerin formasyonu elektron mikroskopisinde (EM) görülebilir. Ayrıca BNIP-3 ile oluşan hücre ölümü, mitokondriden sitokrom c salınımından ve fibroblast ile epitelyal hücrelerdeki kaspaz aktivasyonundan bağımsızdır (62). BNIP-3 yapısı diğer Bcl-2 aile üyelerine benzemektedir. Mitokondri proteinini hedefleyen ve hücre ölümünü indüklemek için gerekli olan C-terminal transmembran (TM) domainini içermektedir (62). BNIP-3 proteini diğer Bcl-2 aile üyelerinde de bulunan ve aynı dizilime sahip Bcl-2 homology 3 (BH3) domainine sahiptir. Ancak diğer Bcl-2 aile üyelerinden farklı olarak BH3 domainindeki delesyon BNIP-3'ün öldürme aktivitesini etkilemez (63). BNIP-3 ile oluşan hücre ölümü Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu ile bloke edilirken, diğer pro-apoptotik Bcl-2 aile üyelerinde bu olay görülmemektedir. Bcl-2, BNIP-3'ün BH3 domaini yerine TM domaini ile birleşmektedir. Bu nedenle BNIP-3'deki BH3'ün fonksiyonu tam olarak anlaşılamamıştır (62).

Hipoxia-inducible factor-1 (HIF-1), hipoksik hücre cevabında gen ekspresyonunun regülasyonunda transkripsiyon faktörü olarak rol oynar. HIF-1 düşük oksijen konsantrasyonlarından etkilenen bir sensöre sahiptir (64). BNIP-3 promotor bölgesi 5'-CGTG-3' dizisine sahip HIF-1 duyarlı element (HRE) içerir ve hipoksiyle ya da HIF-1 alfa ekspresyonunun artmasıyla aktiflenir (65).

Hipokside BNIP-3 ekspresyonu asıl olarak transkripsiyon ile kontrol edilir ve HIF-1 alfa'nın kontrolü altındadır (Şekil 1.15) (66).



Şekil 1.15. BNIP-3 etki mekanizması (66).

1.2.5.3. Apoptozisin Saptanması

Apoptozis ile ilgili çalışmalar hızla artmasına karşın apoptozisi saptamak ve değerlendirmek pek kolay olmamaktadır (67). Özellikle tek bir hücrede apoptozis olayı saatler içerisinde geliştiğinden, apoptotik süreçteki hücreyi morfolojik olarak tanımak ve kantifiye etmek zordur (68). Apoptotik hücredeki morfolojik değişiklikleri saptamak için ışık mikroskobu, elektron mikroskobu ve akım sitometrisi (flowcytometry) kullanılmaktadır. Yine çeşitli sitoplazmik değişikliklerin saptanması (örneğin kaspaz aktivitesinin, hücreye kalsiyum akışının veya mitokondri disfonksiyonun ölçülmesi) membran değişikliklerinin belirlenmesi (örneğin, membran geçirgenliğinin değişmesi) apoptozis sürecinde veya regülasyonunda görevli çeşitli proteinlerin kandaki veya dokudaki düzeyinin ölçülmesi (örneğin, Bcl2/Bax oranı), DNA parçalanmasının çeşitli özel immünohistokimyasal boyalarla saptanması bu yöntemler arasında sayılabilir. Bütün bu yöntemler içinde en sık rastlanan yöntemler DNA'daki değişikliklere dayalı olan DNA agarose gel electrophoresis ve terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP Nick and Labeling

(TUNEL) boyası ile formalinde veya Bouine solüsyonunda fikse edilmiş materyalde yapılan mikroskopik incelemedir (69).

1.2.6. Priapizm ve Apoptozis

Düşük akımlı priapizm sırasında kavernoza dokuda iskemi gelişmektedir. İskemiye bağlı olarak kavernoza dokularda hasar oluşmakta ve bu da fibroze neden olarak erektil fonksiyonu bozmaktadır. Öte yandan konservatif tedavi veya cerrahi ile tedavi edilen olgularda da kavernoza fibrozis gelişmektedir (70). Düşük akımlı priapizmde uygulanan aspirasyon/ α -adrenerjik ajan veya cerrahi girişim ile göreceli yüksek basınçlı oksijen kavernoza dokuya ulaşarak süperoksit radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır. Süperoksit radikalleri oksidatif stres oluşumuna neden olmakta ve yaygın apoptozis gelişimine yol açmaktadır. Yaygın apoptozis, inflamatuvar yanıt ve fibrozis ile sonuçlanmaktadır (70).

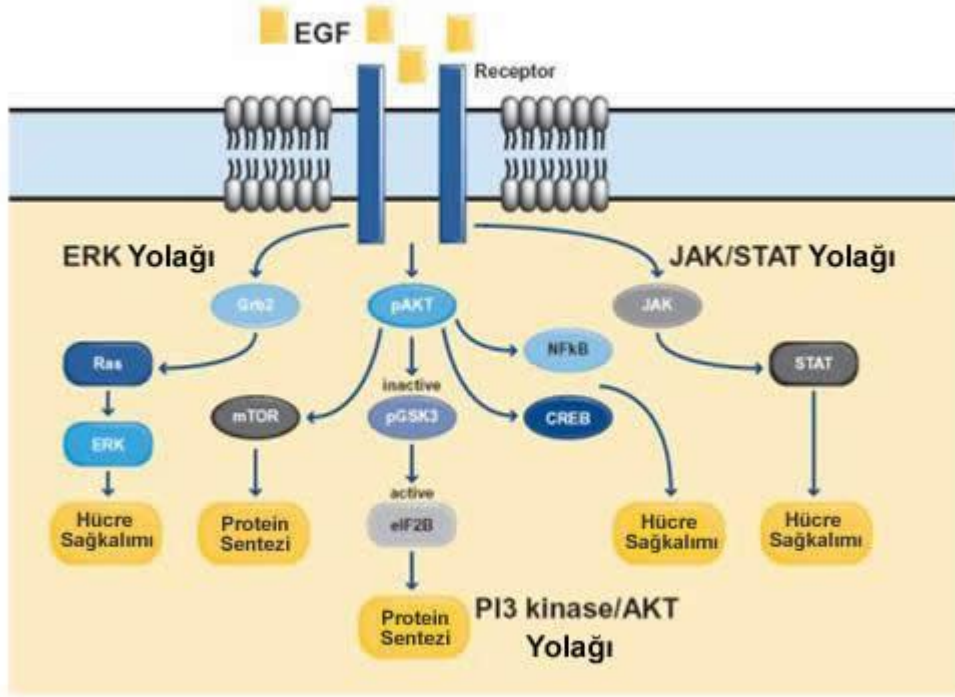
1.2.7. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

EGF ilk kez 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından erkek fare submandibular tükürük bezinden izole edilmiştir (71, 72). Cohen erkek fare submandibular tükürük bezinde Sinir Büyüme Faktörünü (NGF) izole etmeye çalışırken bu bezlerden elde ettiği ekstrenin yeni doğan farelere enjekte edildiğinde erken diş patlaması ve erken göz kapağı açılışına neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve bu maddeye epidermisin gelişimini hızlandırıcı etkisinden dolayı Epidermal Growth Factor (EGF) adını vermiştir (73, 74).

EGF endojen olarak submandibular tükürük bezinden sentezlenerek tübüler kanal hücrelerinde depo edilir. Bu bezin çıkarılması ile plazma EGF düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmaz. Bu durum organizmada ikinci bir sentez yerinin bulunduğunu düşündürmektedir (71, 75, 76). İnsanda EGF'nin asıl kaynağı submandibular bez olmayıp parotis bezidir (77).

EGF trombositlerde de bulunmaktadır (71, 78). Trombositler tarafından bu madde yara iyileşmesinin erken evrelerinde yüksek miktarlarda salgılanmaktadır (71).

EGF benzeri bir faktör insandan da izole edilerek "urogastron" denmiştir (79). EGF'nin pek çok dokuda varlığı gösterilmiştir. Böbrek, tükürük bezleri ve lakrimal bez tarafından da üretildiğinden idrar, tükürük ve gözyaşında bol miktarda bulunur (71). Duodenum brunner bezleri, troid, pankreas, adrenal bez, ovaryum, parotis bezi,



Şekil 1.17. EGF sinyalizasyon yolu (82)

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanları

Ratlarda deneysel düşük akımlı priapizm modeli oluşturmak için Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan onay alındı. Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, ortalama ağırlığı 271.25 ± 26.9 g olan 24 adet yetişkin (3, 5 aylık) Sprague Dawley sıçan kullanıldı. Bütün deney hayvanları vivaryumda 12 saatlik gece/gündüz düzeninde, $20 \pm 2^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında ve $\%50 \pm 10$ nemli ortamda barındırıldı. Sıçanlar standart sıçan yemi ile beslendi. Deney hayvanlarına yem ve su kısıtlaması uygulanmadı, ancak deney günlerinde anestezi uygulamasından önce 2 saat süreyle yem ve su verilmedi.

Sıçanlar rastgele aşağıdaki 4 gruba ayrıldı.

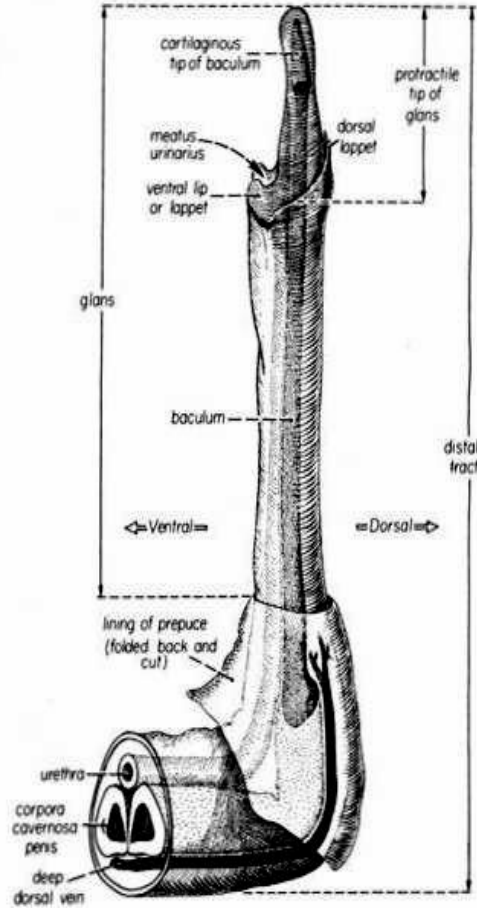
Grup I: Kontrol Grubu

Grup II: Priapizm Grubu

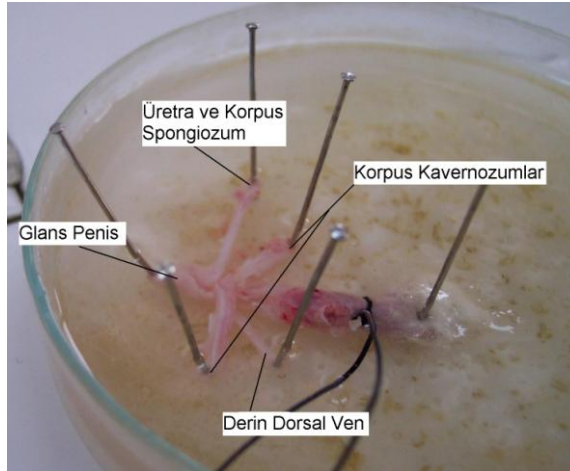
Grup III: Epidermal Büyüme Faktörü (10 mcg/kg) verilen Priapizm Grubu

Grup IV: Epidermal Büyüme Faktörü (20 mcg/kg) verilen Priapizm Grubu

Birinci gruptaki sıçanlarda anestezi altında vakum yöntemi ile ereksiyon oluşturuldu fakat ereksiyonun 10 dakika içinde spontan sonlanması sağlandı. İkinci grup sıçanlara herhangi bir ilaç veya kimyasal madde verilmedi ve penis köküne lastik klemp yerleştirilerek ereksiyonun 4 saat devamlılığı sağlandı. Penis köküne yerleştirilmiş olan lastik klemp 4. saatin sonunda çözüldü ve daha sonra penis rezeke edildi. Üçüncü grup sıçanlara 7 gün boyunca 10 mcg/kg EGF intraperitoneal (i.p.) olarak verildi ve 7. günün sonunda priapizm grubundaki deney hayvanlarındaki gibi priapizm oluşturularak 4 saat sonra penis rezeke edildi. Dördüncü grup sıçanlara ise 7 gün boyunca 20 mcg/kg EGF (i.p.) verildi ve 7. günün sonunda priapizm oluşturularak 4 saat sonra penis rezeke edildi. Diseksiyon plağına alınan penis tesbit edilerek diseksiyon mikroskobu yardımı ile proksimalden üretra tanımlandı. Üretra, korpus spongiosum, glans penis ve derin dorsal ven diseke edilerek korpus kavernozumlar izole edildi (Şekil 2. 1, 2. 2).



Şekil 2.1. Rat penis anatomisi grafik (85).



Şekil 2.2. Mikrocerrahi diseksiyon sonrası rat penis anatomisi

Alınan dokuların yarısı histopatolojik değerlendirme için, diğer yarısı da Western blot değerlendirme için ayrıştırıldı.

2.2. Deney Sırasında Kullanılan Anestezi

Deneyler sırasında her türlü cerrahi girişim anestezi altında uygulandı. Bu amaçla deney hayvanlarının cerrahi anestezi derinliğine ulaşması beklendi. Sedatif

ve düz kas gevşetici olarak ksilazin hidroklorid (Rompun %2, Bayer, Türkiye) 10 mg/kg (i.p.) dozunda uygulandı. Dissosiyatif anestezik olan ketamin hidroklorür (Alfamine %10, Ege Vet, Türkiye) 50-60 mg/kg (i.p.) dozunda uygulandı.

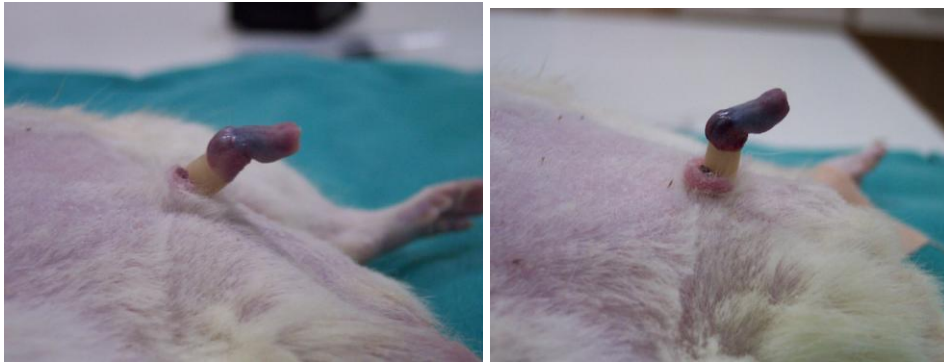
2.3. Ereksiyon ve Priapizmin Oluşturulması

Deney hayvanlarında ereksiyon oluşturma için vakum yöntemi kullanıldı. Vakum oluşturmak için ucu genişletilmiş çam uçlu enjektör kullanıldı. Deney hayvanlarına anestezi uygulandıktan sonra, penis tanımlanarak prepişyum retrakte edildi ve çam uçlu enjektör ucuna yerleştirilip vakum oluşturmak için enjektörün pistonu 20cc çekildi (Şekil 2. 3).



Şekil 2.3. Vakum ile ereksiyon oluşturulması

Ereksiyon oluşturulduktan sonra venöz geri dönüşün engellenmesi ve priapizm gelişmesi için penis proksimaline lastik klemp yerleştirildi. Şekil 2.4'de ereksiyon oluşturulduğunda ve 4 saat sonrası görülmektedir.



A

B

A: Priapizm oluşturulduktan hemen sonra,

B: Priapizm oluşturulduktan 4 saat sonra

Şekil 2.4. Priapizm oluşturulması

2.4. İlaçlar

Epidermal Büyüme faktörü (EGF) (Sigma, E 9644). Serum fizyolojikte çözünerek hazırlandı.

2.5. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

TUNEL boyama metodu:

Lamlar, gece boyu (12saat) 37°C'lik etüvde bekletildikten sonra deparafinizasyona alındı. Bu amaç ile;

Deparafinizasyon ve rehidratasyon:

1. Oda ısısında 15 dakika ksilene daldırıldı. Taze ksilen kullanarak 2. kez 15 dakika inkübe edildi.

2. Oda ısısında 5 dakika %100 etanole daldırıldı. Taze etanol kullanarak 2. kez 5 dakika inkübe edildi.

3. Oda ısısında 5 dakika %90 etanole daldırıldı.

4. Oda ısısında 5 dakika %80 etanole daldırıldı.

5. Oda ısısında 5 dakika %70 etanole daldırıldı.

6. Kısaca 1XTBS (Tris buffer saline) ile durulandı ve spesimenin etrafı dikkatle kurulandı.

Spesimenin geçirgenliğini arttırmak amacıyla:

1. 2 mg/ml proteinaz K 10 mM Tris PH8 içinde 1:100 dilüe edildi. (Lam başına 2mg/ml Protenaz K'nın 1 mikroL 'si 10mM Tris'in 99mikroL'sine eklenerek karıştırıldı.)

2. Spesimenin tamamı 20 mikrog/ml proteinaz K'nın 100mikroL ile kaplandı. Oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin aşılmasına dikkat edildi. Kurumasına izin verilmedi.

3. 1X TBS (Tris buffer saline) ile durulandı.

Endojen Peroksidaz inaktivasyonu aşamasına geçildi:

1. %30 luk H₂O₂ metanol içinde 1:10 dilüe edildi. (Lam başına 10 mikrol %30 H₂O₂ ile 90 mikrol metanol karıştırıldı.)

2. 100mikrol %3 H2O2 ile spesimen kaplandı. 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Bu aşamada da inkübasyon süresine uyuma özen gösterildi.

3. 1X TBS (Tris buffer saline) ile durulandı.

4. Dikkatlice fazla olan sıvı alındı ve spesimen etrafı kurulandı.

Dengeleme ve İşaretleme reaksiyonu için;

1. 5X TdT dengeleyici tampon 1:5 oranında dH2O ile dilüe edildi. (Lam başına 20mikroL 5X tampon ile 80 mikroL dH2O karıştırıldı.)

100mikroL 1X TdT dengeleyici tampon ile spesimen kaplandı. 10-30 dakika oda ısısında inkübe edildi.

Bu esnada işaretleme reaksiyonu karışımı hazırlandı. (Lam başına 57.0mikroL TdT işaretleme reaksiyon karışımı ve 3.0 mikroL TdT enzimi buzdaki mikrofüj tübüne transfer edildi ve hafifçe karıştırıldı.)

Lamların kurumamasına dikkat edildi.

2. Dikkatle spesimendeki 1X TdT dengeleyici tampon kurutma kağıdı ile alındı. Spesimene dokunmamaya dikkat edildi.

3. Hemen 60mikroL TdT işaretleme reaksiyon karışımı (daha önce hazırlanmış olan) spesimene uygulandı.

4. Lamdan daha geniş hazırlanmış olan parafin film ile spesimen kaplandı. Parafin filmin bir köşesi uzun bırakılarak daha sonra kaldırma ve yapıştırma esnasında kolaylık sağlandı.

5. Lamlar nemli ortama alınarak 37°C de 1, 5 saat inkübe edildi.

İşaretleme Reaksiyonunun sonlandırılması için;

2. Parafin film kaldırıldı, slide 1X TBS ile durulandı.

3. Spesimen 100mikroL stop solüsyonu ile kaplandı. Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.

4. 1X TBS (Tris buffer saline) ile durulandı.

5. Dikkatlice fazla olan sıvı alındı ve spesimenin etrafı kurulandı.

Tespit aşamasına geçildi;

1. Spesimen 100 mikroL bloklayıcı tampon ile kaplandı. Oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.

2. 50X konjugat bloklayıcı tampon içinde 1:50 oranında dilüe edildi (Lam başına 2 mikroL 50X konjugat ile 98 mikroL bloklayıcı tampon karıştırıldı).

3. Bloklayıcı tampon kurutma kağıdı ile spesimene dokunmadan dikkatle alındı. Hemen 100mikroL dilue 1X konjugat spesimene uygulandı.

4. Lamlar nemli ortama alınarak oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

5. İnkubasyonun bitmesine 5 dakika kala DAB solüsyonu hazırlandı.

(Her 10 lam için 1 tablet DAB ve 1 tablet H₂O₂/üre, 1ml TAP/FAUCET H₂O içinde çözdürüldü.)

6. 1X TBS (Tris buffer saline) ile durulandı.

7. Fazla olan sıvı alındı ve spesimen etrafı kurulandı.

8. 100 mikroL DAB solüsyonu ile spesimen kaplandı. Oda ısısında 10- 15 dakika inkübe edildi.

9. Lamlar dH₂O ile durulandı.

Zıt boyama için;

1. Hemen spesimen 100 mikroL metil green counterstain solüsyonu ile kaplandı.

2. Oda ısısında 3 dakika inkübe edildi.

3. Lamlar kenarından emici havluya değdirildi ve solüsyon emdirildi. Lam tutucu ile coplin kabına yerleştirildi.

4. Lamlar 2-4 defa %100 etanole daldırıldı.

5. Emici havlu ile kısa süre kurulandı.

6. Tekrar taze %100 etanole 2-4 kez daldırıldı.

7. Emici havlu ile kısa süre kurulandı.

8. Lamlar 2-4 defa %100 ksilene daldırıldı.

9. Lamların arkasında ve spesimenin etrafındaki ksilen temizlendi.

Spesimenlerin üstü entalan ve lamel ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskobunda (Olympus BH-2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Metil green ile yeşile boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi.

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. TUNEL boyamanın yaygınlığı 0'dan +4'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Çok az
+2	Az
+3	Orta
+4	Şiddetli

2.6. Western Blot Analizleri

Sıçan korpus kavernozum dokusu örneklerinin hazırlanmasında homojenizasyon yöntemi kullanıldı. Dokular 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solusyonunda {10mM Tris- HCl (pH=7.4), 0.1 mM NaCl, 0.1mM fenil metil sülfonil florid (PMSF), 5µM soybean (bir tripsin inhibitörü olarak)} mekanik homojenizatör (Ultraturrax, IKA, Almanya) yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde (Hettich, Almanya) +4 °C’de 60 dakika süreyle 60.000 x g’de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar mikrosantrifüj tüplerine alınarak Western blot analizleri için –70 °C’de saklandı.

Western blot prosedürü; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, nitroselüloz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesini kapsar. Blotlama yapılmadan önce çalışılan örneklerdeki proteinler elektriksel ortamda poliakrilamid jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE’de gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla, elde edilen Sıçan korpus kavernozum dokusu homojenatlarındaki protein konsantrasyonu; kit kullanılarak (Abcam, Cambridge, UK) daha önce bildirilen prosedüre göre saptandı (86). Homojenatların Western blot analizi bildirilen metodlara göre yapıldı (87, 88, 89).

Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana (Schleicher and Schuell, Inc., USA), aktarımı (blotlama): SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kâğıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solusyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş tampon solusyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek için 60 dakika

boyunca 150 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama): Blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membran tampon solüsyonla [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)], çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH: 7.2) tamponunda % 1'lik taze sığır serum albumini (BSA) ile 37 °C'de 90 dakikalık inkübasyonla bloklandı.

Primer antikor olarak BNIP-3 (Abcam, Cambridge, UK) kullanıldı. Primer antikor % 0.05 oranında Tween-20 bulunan tamponda 1:1000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membran primer olarak BNIP-3 antikorunu ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membran 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membran % 0.05 oranında Tween-20 bulunan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37 °C'de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membran 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03–0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solüsyonu kullanıldı. DAB'la reaksiyon sonucu nitroselüloz membran üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membran iyice yıkandı. Nitroselüloz membran iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Image Analyses System (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

2.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analiz için SAS (Statistical Analysis System) programı kullanıldı. Bütün değerler; ortalama standart hata ($\text{AO} \pm \text{SH}$) olarak belirlendi. Kontrol grubu ile değerlendirmede Fisher's post hoc testi kullanıldı. Sonuçlar, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

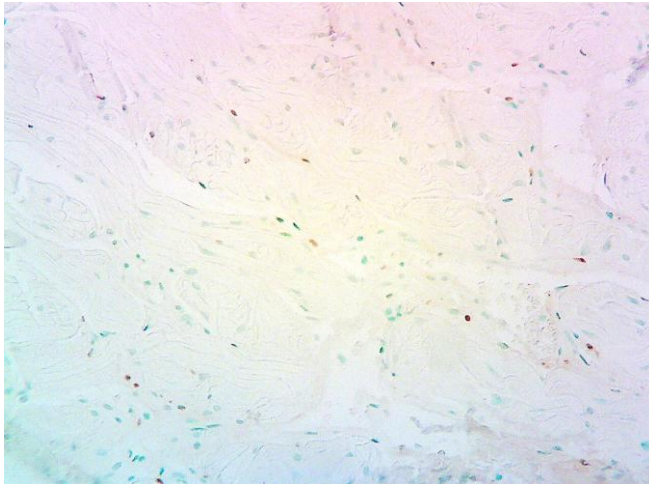
3. BULGULAR

3.1. TUNEL Bulgular

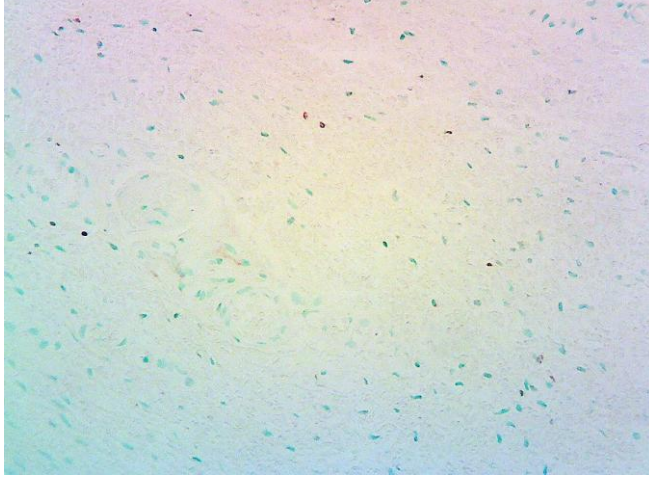
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği kontrol grubunda (Grup I) +1 (Şekil 3.1.1.), priapizm grubunda (Grup II) +3 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil 3.1.2.). Priapizm grubu (Grup II) ile kıyaslandığında tedavi gruplarında (Grup III ve Grup IV) belirgin olarak azalmış TUNEL pozitifliği dikkati çekti. Grup III'de +2 (Şekil 3.1.3.) ve Grup IV'de +1 (Şekil 3.1.4.) yaygınlığında TUNEL pozitifliği azalmış olarak izlendi. Pozitif kontrol için meme dokusu (Şekil 3.1.5.) kullanıldı. Negatif kontrolde TUNEL pozitifliği saptanmadı (Şekil 3.1.6.).



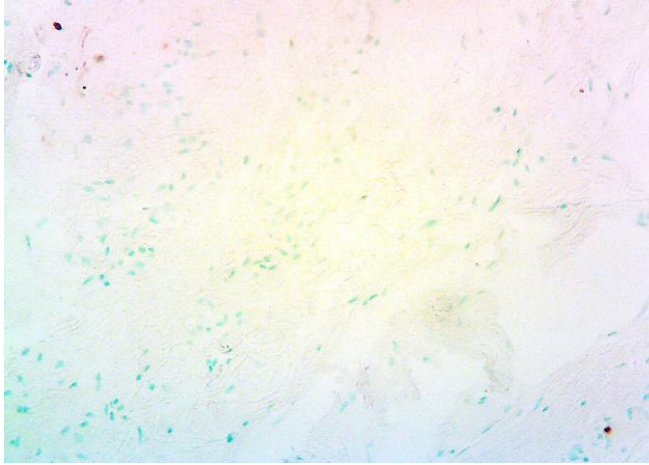
Şekil 3.1.1. Kontrol grubunun (Grup I) TUNEL ile boyanması



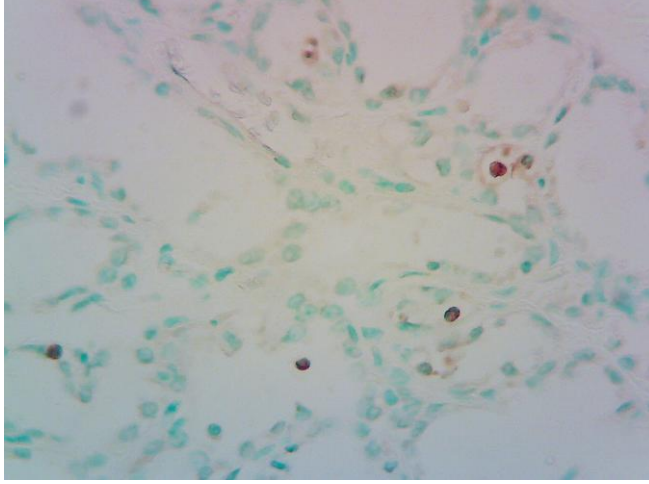
Şekil 3.1.2. Priapizm grubunun (Grup II) TUNEL ile boyanması



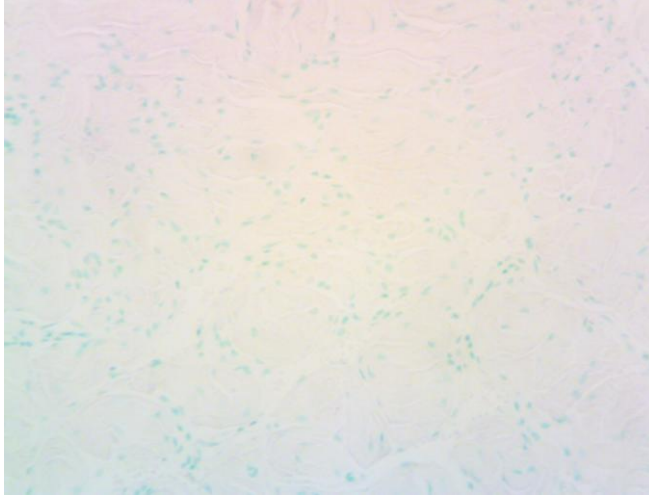
Şekil 3.1.3. Epidermal Büyüme Faktörü (10mcg/kg) verilen grubun (GrupIII) TUNEL ile boyanması



Şekil 3.1.4. Epidermal Büyüme Faktörü (20mcg/kg) verilen grubun (GrupIV) TUNEL ile boyanması



Şekil 3.1.5. Pozitif kontrol için kullanılan meme dokusu



Şekil 3.1.6. Negatif kontrol için kullanılan meme dokusu

Tablo 3.1. Tüm gruplarda elde edilen TUNEL boyanma indeks değerleri

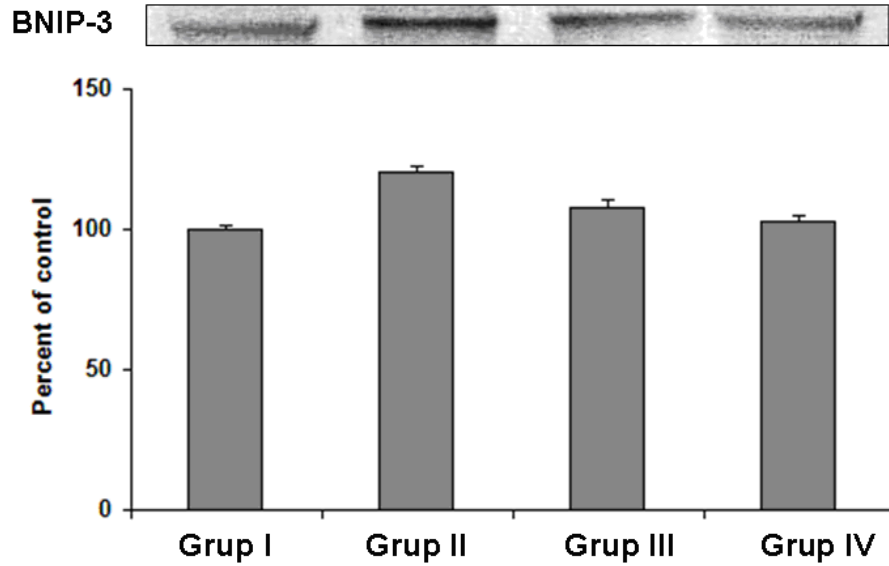
Variables	Groups			
	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Apoptozis indeksi	+1	+3	+2	+1

3.2. Western Blot Bulgular

Hipoksik durumlarda ekspresyon artışı görülen BNIP-3 proteini, proapoptotik aktivite göstermektedir.

Western Blot BNIP-3 ekspresyon düzeyleri, Şekil 3.2.'de sunulmuştur. Çalışmamızda; kontrol grubu ile kıyaslandığında priapizm grubunda (Grup II), korpus kavernozumdaki BNIP-3 ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak saptandı (Şekil 3.2.; $p<0,05$).

Yine çalışmamızda; 7 gün süreyle 10 mcg/kg ve 20 mcg/kg dozda EGF uygulanan tedavi gruplarında (Grup III ve Grup IV), korpus kavernozumdaki BNIP-3 ekspresyon düzeyi priapizm grubuna (Grup II) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak saptandı (Şekil 3.2.; $p<0,05$).



Şekil 3.2. Deneysel Priapizm oluşturulan Sıçanlarda EGF'nin BNIP-3 ekspresyonu üzerine etkisi (BNIP-3 Ekspresyon düzeyleri Western Blot yöntemiyle, kontrolün yüzdesi olarak belirlenmiştir).

Priapizm oluşturulan ratlarda, BNIP-3 düzeylerinin kontrole göre %20,7 düzeyinde artışı tespit edilmiştir. Tedavi gruplarında, BNIP düzeylerinin doza bağımlı olarak lineer azaldığı tespit edilmiştir. 7 gün süreyle 10 mcg/kg EGF uygulanan grupta (Grup II) BNIP-3 ekspresyon düzeyi priapizm grubuna göre %10,7

azalırken, 7 gün süreyle 20 mcg/kg EGF verilen grupta (Grup III) %14,7 oranında azalmıştır (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. EGF'nin BNIP-3 ekspresyonu üzerine etkisi.

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
BNIP-3**	100,0±1,22	120,7±1,68	107,7±3,13	102,9±1,56

*Veriler Fisher's testi ile önemlilik düzeyi $P<0,05$ olacak şekilde değerlendirilmiştir. Veriler ortalama±standart sapma şeklinde sunulmuştur.

**BNIP-3 ekspresyon düzeyleri western blot yöntemiyle kontrolün yüzdesi olarak verilmiştir.

4. TARTIŞMA

Priapizm, seksüel istek veya uyarı olmaksızın gelişen istenmeyen ereksiyon hali olarak tanımlanmaktadır. Priapizm klinikte üç farklı şekilde belirlenmektedir. Düşük akımlı (iskemik) priapizm en sık görülen şeklidir ve tedavi edilmediğinde kavernoza kaslar nekroza gitmekte, sonuçta kavernoza fibrozis ve erektil disfonksiyon gelişmektedir. İskemik priapizm rijid ve ağırlı ereksiyon ile karakterizedir. Aspire edilen kavernoza kan koyu renklidir ve kan gazı analizleri sıklıkla hipoksi ($PO_2 < 30$ mmHg), hiperkapni ($PCO_2 > 60$ mmHg) ve asidoz ($pH < 7.25$) ile karakterizedir. Deneysel ve klinik çalışmalar göstermiştir ki, hipoksi ve asidoz 4 saat sonra kavernoza fibrozise neden olmaktadır ve bu süreden önce priapizmin tedavi edilmesi kavernoza fibrozisi önleyebilmektedir (2, 31, 32). İskemik priapizmde; kavernoza düz kasta ultrastrüktürel değişiklikler 12 saat sonra, fokal nekroz 24 saat sonra, geniş nekroz ve fibroblast benzeri hücrelerin transformasyonu ise 48 saat sonra görülmektedir (10). Tedavi edilmezse veya tedavide geç kalınırsa (>24 saat) kavernoza düz kaslarda nekroz, irreversibl korporal fibrozis ve erektil disfonksiyon meydana gelmektedir (4). Bundan dolayı iskemik priapizmde penil kan akımının optimal şekilde sağlanması, acil tedavinin ana prensibi olmalıdır.

Priapizm patofizyolojisi ile ilgili modern literatürde yayınlanmış ilk makale Hinman'a ait 1914 yılında yayınlanan araştırmadır (12). Daha sonra 1960 yılında Frank Hinman Jr. ışık mikroskopu kullanarak, korporal dokunun günler içerisinde kalınlaşarak ödematoz ve fibrotik hale geldiğini göstermiştir (13). Spycher ve arkadaşları, elektron mikroskopu incelemesinde priapizm oluşun dokuda 12. saatte sinuzoidal epitelde destrüksiyon, 24. saatte trombosit adheransı, 48. saatte sinuzoidal alanda trombüs ve düz kasta nekroz oluştuğunu göstermişlerdir (3). Broderick ve arkadaşları, hayvan (tavşan) deneyinde anoksik koşullarda alfa-adrenerjik agonistlerin çalışmayarak intraselüler kalsiyum artışına ve uzun süren düz kas relaksasyonuna yol açtıklarını kanıtlamışlardır (90).

Vücuttaki tüm düz kaslar istirahatte relaksasyon, fonksiyonel durumda kontraksiyon halinde bulunurlar. Bu durumun tek istisnası penistir. Penil düz kaslar istirahat halinde yani günün yaklaşık 23 saatinde kontrakte şekilde bulunurlar. Ancak penisin fonksiyonel olarak aktif hali olan ereksiyonda, düz kaslar relaksasyona uğramaktadırlar. Dolayısıyla peniste gerek tümesans, gerekse detümesans

oluşmasında penis düz kas fonksiyonu etkin rol oynamaktadır. Pek çok mekanizmalarla regüle edilen penil düz kas tonusunda, kontraksiyona eğilimin artması erektil disfonksiyonla, relaksasyona eğilimin artması priapizmle sonuçlanabilmektedir.

Kavernozal düz kaslarda relaksasyon sağlayan başlıca yollar; nitrik oksit-siklik guanozinmonofosfat (NO-cGMP) yolağı, adenozin yolağı ve hemoksijenaz 1-karbonmonoksit (HO1-CO) yolağıdır. Kontraksiyonu etkileyen olası mekanizmalar ise; fosfodiesteraz tip 5 (PDE5) enzim aktivitesi, norepinefrin (NE), endotelin-1 (ET) ve Rho-kinaz cevabıdır. Penisin anatomik yapısı ve fonksiyonel özelliklerinin optimum olarak korunması için, düz kas tonusunun regülasyonunda etkili olan bu mekanizmaların dengeli bir şekilde fonksiyon göstermesi gerekmektedir. Dolayısıyla priapizm etyopatogenezinde penis düz kas dokusunda kontraksiyonda etkin olan mekanizmalar azalmış, relaksasyonda etkin olan mekanizmalarda ise artmış bir fonksiyon beklenmektedir (10, 32, 33).

İn vitro çalışmalarda, korporal düz kasın çıkarılarak ayıklandıktan sonra hipoksik ortama maruz bırakıldığında anlamlı apoptozis sonuçlarının ortaya çıktığını ve alfa adrenerjik uyarının düz kas kasılmasını tetikleyemediği gösterilmiştir (90, 96). Uzamış anoksi korporal düz kas kasılmasında anlamlı azalma, düz kas nekrozuna ve korpus kavernozumda fibrozise neden olmaktadır. İskemik priapizmin deneysel hayvan modellerinde lipid peroksidasyonunun reaktif oksijen radikalleri tarafından verilen zararın belirleyicisi olduğu, iskemik priapizm süresince ve daha sonrasında hemooksijenaz üretimini arttırdığını göstermişlerdir (70).

Endotel hücreleri, mekanik güçlere ve nörohumoral mediatörlere karşı çeşitli kasılma ve gevşeme faktörleri salarak bazal vasküler tonus ve reaktivitesini düzenlemektedir. Peniste vasküler endotel, damarsal gevşeme faktörleri olan NO ve adenozinin olduğu kadar kasılma faktörleri olan RhoA/Rho-kinazın da kaynağıdır. Son veriler iskemik priapizm esnasında anormal NO ve adenozin sinyalizasyona ek olarak, RhoA/Rho-kinaz sinyalizasyonunda NO/siklik guanozin monofosfat (cGMP) döngüsünü düzenlemede ve patofizyolojisinde rolü olduğunu göstermiştir.(97, 98, 99).

Priapizm gelişikten sonraki ilk 6 saat içinde tedavi edilen olgularda da erektil disfonksiyon gelişebilmektedir (90). Bu paradoks iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı ile

açıklanmaktadır (91). I/R hasarı çok bileşenli ve henüz tamamen aydınlatılmamış bir süreç olmakla birlikte, iskemi sırasında gelişen elektrofizyolojik anormallikler [özellikle, potasyum (K^+) iyonunun hücre içi dengesinin bozulması ve buna ikincil gelişen hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) birikmesi] ve reperfüzyonda gözlenen aşırı serbest radikal üretimi geçerli hipotezler olarak kabul edilmektedir (92). Reaktif oksijen türleri (ROS), I/R hasarının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir (93, 94). Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^-), NO ve peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) vardır. Bu radikaller hücre membranı ve DNA hasarı, proteaz aktivasyonu, mitokondriyal şişme, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümüne neden olmaktadır (92). Bu süreçte NO de önemli rol oynamaktadır. Kardiyak I/R çalışmaları göstermiştir ki hem iskemi, hem de reperfüzyon sırasında endoteliumdaki NO sentezi dalgalanma göstermektedir. Reperfüzyonun geç fazında üretilen NO ve $ONOO^-$ 'in reperfüzyonun erken fazına oranla çok daha fazla olduğu ve bu durumun uyarılabilir NOS (iNOS) upregülasyonu (up-regulation) ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. NO düzeyindeki bu gecikmiş artış, doku hasarının daha da artmasına neden olmaktadır (95).

İskemi kaynaklı fibrozis progresyonunda ek patolojik mekanizmaların, hipoksinin tetiklediği büyüme faktörü üretimini arttırdığı bildirilmektedir. Bunlara örnek olarak bir pleotrofik (çok yönlü etkili) molekül olan ve doku tamirinde hayati önem taşıyan transforming growth faktör beta (TGF-B) verilebilir. Hipoksi ve oksidatif stres sırasında oluşan aşırı miktardaki TGF-B üretimi doku hasarı ve fibrozisi tetikleyebilir (97).

İskemik priapizmin süresine bağlı olarak kavernoza dokuda apoptozis gelişmektedir. Yaygın apoptozis, inflamatuvar yanıt ve fibrozis ile sonuçlanmaktadır (70). Ancak bu apoptotik sürecin kalıcı hasardan ne oranda sorumlu olduğu bilinmemektedir.

İnsanda apoptozisin düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir olaylar zinciridir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53, mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzamaktadır. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, G1'de hücre siklusunun

durmasını uyararak tamir için gerekli zamanı elde eder. Diğer bir taraftan hasar fazlaysa hücreyi apoptozise sevkeder. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2 ve Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği sanılmaktadır (54). Bcl-2/Bax gen ailesi, apoptozisin regülasyonundan sorumludur (54, 55). Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1 gibi apoptozis inhibitörüdür, bazıları ise apoptozisi indükler ve proapoptotik genler olarak adlandırılır (56). Proapoptotik genlerin Bax (Bax, Bak ve Bok) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk, BNIP-3, Bad, Bid gibi) olmak üzere iki alt ailesi vardır (55, 56). Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de bulunurlar ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak işlev görürler (57). Örneğin; Bcl-2'nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması halinde hücre yaşamına devam ederken, Bax'ın daha fazla olması halinde hücre hayatına devam edemez (55, 57). Apoptozis sırasında hücre fragmentasyonunu sağlayan proteolitik enzim ailesi olan kaspazlar tüm hücrelerde inaktif pro-enzim halinde bulunurlar. Ölüm sinyalini başlatan enzimler olarak da kabul edilen kaspazlar bir kaskad şeklinde birbirini aktive ederek apoptozis sürecinde rol oynarlar (58). Kaspaz enzimleri apoptotik süreçte çok önemli bir rol oynamalarına rağmen, kaspazdan bağımsız "Apoptozis benzeri programlı Hücre Ölümü (PHÖ)" olarak tanımlanan bir apoptotik süreç de tanımlanmıştır. Apoptozis benzeri PHÖ'nü apoptozise neden olan olayların tamamı uyarabilmektedir (59).

Bcl-2/adenovirüs E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP-3), hipoksik durumlarda upregüle olan Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinden birisidir (60,61). BNIP-3 yapısı diğer Bcl-2 aile üyelerine benzemektedir. Mitokondri proteinini hedefleyen ve hücre ölümünü indüklemek için gerekli olan C-terminal transmembran (TM) domainini içermektedir (62). BNIP-3 proteini, diğer Bcl-2 aile üyelerinde de bulunan ve aynı dizilime sahip Bcl-2 homology 3 (BH3) domainine sahiptir. Ancak diğer Bcl-2 aile üyelerinden farklı olarak BH3 domainindeki delesyon, BNIP-3'ün hücre nekrozu aktivitesini etkilememektedir (63). BNIP-3 ile oluşan hücre ölümü; Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu ile bloke edilirken, diğer pro-apoptotik Bcl-2 aile üyelerinde bu olay görülmemektedir. Bcl-2, BNIP-3'ün BH3 domaini yerine TM domaini ile birleşmektedir (62).

BNIP-3'ün kuvvetli şekilde aşırı ekspresyonu; mitokondride geçirgen transisyon porların (permeability transition: PT) açılması, membran potansiyelinin kaybı ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile karakterizedir (62). BNIP-3 ekspresyonu sonrası yaygın sitoplazmik vakuolizasyon ve elektron-dens cisimlerin formasyonu, elektron mikroskopisinde (EM) görülmektedir. Ayrıca BNIP-3 ile oluşan hücre ölümü, mitokondriden sitokrom c salınımından ve fibroblast ile epitelyal hücrelerdeki kaspaz aktivasyonundan bağımsızdır (62).

Çoğu canlı organizmada, yapı maddelerindeki ya da oksijendeki eksiklik genellikle hücre ölümünü indükler. Hücrelerin hayatta kalabilmeleri için hipoksiye adaptasyon sağlamaları gerekmektedir. Hipoksik şartlarda hücreler oksidatif fosforilasyondan anaerobik glikolize geçme, glukoz alımını artırma ya da stres proteinlerinin salınımını artırma gibi mekanizmalardan herhangi birini kullanırlar (100, 101). Hipokside, BNIP-3 ekspresyonu asıl olarak transkripsiyon ile kontrol edilir ve Hipoxia-inducible factor-1 alfa (HIF-1 alfa)'nın kontrolü altındadır. HIF-1 alfa, hipoksik hücre cevabında gen ekspresyonunun regülasyonunda transkripsiyon faktörü olarak rol oynar. HIF-1 alfa, düşük oksijen konsantrasyonlarından etkilenen bir sensöre sahiptir. Normal şartlar altında HIF-1 alfa, prolin hidroksilasyonuna maruz kalır ve Von Hippel Lindau proteinine (VHL) bağlanarak yıkılır. Hipoksi sırasında HIF-1 alfa hidroksillenmez, bunun yerine nükleusa transloke olarak burada birikir. Hipoksi regülasyonunu sağlayan promotor elementler yolu ile hedef genler tarafından tekrar aktive edilirler. HIF-1 alfa içeren genlerin hedef noktaları; eritropoezis, anjiogenezis, ATP metabolizması, proliferasyon ve ölümle ilgilidir (64).

BNIP-3 promotor bölgesi, 5'-CGTG-3' dizisine sahip HIF-1 duyarlı element (HRE) içerir ve hipoksiyle ya da HIF-1 alfa ekspresyonunun artmasıyla aktiflenir. Buna karşı; BNIP-3 salınımı, BNIP-3 promotor bölge içerisindeki Nuclear factor-kappa B (NF-kB) duyarlı elementler aracılığıyla NF-kB sinyal yolunun aktive olmasıyla süprese edilebilir. BNIP-3 ekspresyonunun sıkı regülasyonu, hücre devamlılığını sağlamak için oldukça önemlidir (65).

Hipoksik durumlardaki BNIP-3 indüksiyonu, kardiyak miyositlerde sık görülen durumlardan biridir. BNIP-3, myokardial enfarktüs sırasındaki kardiyak miyosit ölümünde merkezi mediatördür. Kronik hipoksi ve nötral PH'da meydana gelen BNIP-3 indüksiyonu, asidik PH'da daha fazla artar. Hipoksik asidoz nedeniyle

kardiyak miyositlerde görülen ölüm olayı kaspaz inhibitörleri tarafından değil, BNIP-3 antisense oligonükleotidleri tarafından bloklanır. Bu bulgular, BNIP-3 ile indüklenen hücre ölüm yolağının kaspazlardan bağımsız olması ile açıklanabilir (102, 103).

Hipoksi ile indüklenen BNIP-3, endotelial hücreler ve makrofajlardaki hipoksik hücre ölümünde rol oynar (102). Sowter ve arkadaşları, BNIP-3'ün aynı zamanda insan solid tümörlerinde yükseldiğini de belirtmişlerdir. BNIP-3, solid tümörlerin hipoksik bölgelerinden üretilir (64). Hipoksik bölgeler, bu hücrelere yeterli ilaç dağılımı sağlanamaması nedeniyle kemoterapiye daha dirençlidirler (104). Apoptozise neden olan ROS formasyonu üzerine dayanan radyasyon, oksidatif fosforilasyonun düşük düzeyde olması nedeniyle hipoksik hücrelerde inefektiftir (105). Hipoksi sonrası BNIP-3 proteininin artmış seviyesi, epitelyal kaynaklı kanser hücrelerini de içeren birçok hücre tipinde mitokondriyal disfonksiyon aracılığıyla hücre ölümüne neden olmaktadır (60). Böylelikle, BNIP-3 gibi hipoksi ile oluşan hücre ölümünü hedefleyen mekanizmalar kanser tedavisinde önemlidir (104). Kothari ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, MCF-7 hücreleri Herceptin ile inkübe edilerek ErbB2 reseptörleri inhibe edilmiş ve hipoksi ile oluşan BNIP-3 ekspresyonu ile hücrelerin apoptozise daha duyarlı oldukları tesbit edilmiştir (106). Bu da; tümörün hipoksik bölgelerinde büyüme faktör sinyalinin blokajının, bu hücrelerde BNIP-3'ün hücre ölümünü indüklemek için yeterli olabileceğini göstermektedir. Yine aynı çalışmada, BNIP-3 indüksiyonunun ve fonksiyonunun bloke edilmesi ile insan epitelyal hücrelerinde hipoksi ile oluşan hücre ölümü miktarının azaldığı saptanmıştır (106).

EGF; amino asit dizisinde lizin, fenilalanin ve alanin buldurmeyen ve 53 amino asitten oluşmuş tek zincirli bir polipeptittir. 6000 Dalton molekül ağırlığına sahip olan EGF'nin birçok dokuda reseptörü olup, epitelyal ve mezotelial kökenli hücreler için mitojenik bir polipeptittir (73, 80). Molekülün bir ucu NH₂ grubu, diğer ucu ise COOH grubu ile sonlanmaktadır. Polipeptit, altı sistein köküne sahiptir ve üç tane disülfid bağı içerir. Bu disülfid bağları, molekülün biyolojik aktivitesi için çok gereklidir (81).

EGF reseptörü, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir (83). EGF reseptör aktivasyonu, hücre replikasyon ve transkripsiyonu ile DNA sentezini başlatır (84).

Fibroblastlarda reseptörü bulunan ve bu hücreler için potent bir gelişme faktörü olan EGF; granülasyon dokusu, kollajen ve glikozaminoglikan düzeyini artırır, sonuçta epitelizasyon hızlanır ve yara gerilim kuvveti artar (74, 107).

EGF, birçok ektodermal ve mezodermal kökenli hücre için mitojenik özelliktedir (71, 74, 108). Korneal endotelial hücreler, fibroblastlar ve sinir sistemi destek dokusu hücreleri üzerinde mitojenik aktiviteye sahip olan EGF; en fazla mezodermal hücreler tarafından salgılanır (71, 109). Etkili olduğu hücrelerde iyon alınımını, glikolizisi, DNA ve RNA ile protein yapımını arttırıcı özellik gösterir (108).

EGF, hücre kültürlerinde normal ve transforme hücrelerde hücre çoğalmasını arttırıcı etki göstermektedir (110). Çeşitli epitel hücre kültürlerinde EGF; büyümeyi, çoğalmayı ve farklılaşmayı arttırmaktadır (111). EGF gibi peptit büyüme faktörleri keratinositlerin ve fibroblastların mitogenezini, keratinositlerin göçünü, doku ve granülasyon gelişimini uyarır (112).

Bir çok tümör, kanser progresyonuna neden olan büyüme faktörlerini ve bunlarla ilgili reseptörleri eksprese eder. Tümör progresyonuna neden olan iki önemli faktör; Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)'dür. Bu faktörler ile tedavi hücreleri değişik apoptotik uyarılardan korumaktadır (113). BNIP-3, epitelyal kaynaklı tümörlerin hipoksik bölgelerinden eksprese edilir ama bu hipoksik hücrelerde hücre ölümüne neden olmaz (64). Kothari ve arkadaşları, EGF ve IGF 'nin mitokondriyal disfonksiyonunu, plazma membran permeabilitesini ve stoplazmik vakuolizasyonunu önleyerek hücreleri BNIP-3 ile oluşan hücre ölümüne karşı koruduğunu tespit etmişlerdir (106). Ancak, tümörlerde hipoksik bölgelerin bulunması ve yüksek derecede büyüme faktörlerinin ve/veya bunların reseptörlerinin ekspresyonu sıklıkla kötü prognozla birlikte (114).

Ürolojik acil bir patoloji olan ve tedavi edilmediğinde irreversibl ereksiyon kaybına sebep olan priapizmde, EGF'nin kaspazdan bağımsız apoptotik süreçte rol oynayan BNIP-3 proteini üzerine olan etkinliği araştırıldı.

Deneyisel iskemik priapizm modelimizde; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında priapizm grubunda, kavernozaal düz kas hücrelerinde BNIP-3 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak saptandı ve yine kavernozaal düz kas hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptozisin

istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu belirlendi. İskemik priapizme bağlı olarak kavernoza dokuda BNIP-3 düzeyinin artışı apoptozisde sadece kaspaz enzimlerinin değil, kaspaz bağımsız yolağında oldukça aktif olduğunu göstermektedir.

Priapizm oluşturulmadan önce EGF uygulanan deney hayvanlarından izole edilen kavernoza dokularında; BNIP-3 ekspresyon düzeyinin, EGF uygulanmayan priapizm grubuyla karşılaştırıldığında doz bağımlı olarak lineer azaldığı ve yine kavernoza düz kas hücrelerinde apoptozisin istatistiksel olarak azaldığı saptandı. EGF'nin koruyucu etkisinin araştırıldığı bu çalışma, Kothari ve arkadaşlarının elde ettiği bulgularla benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla priapizm tedavisinde; kaspaz enzim inhibitörleri ile birlikte, kaspaz bağımsız yolu BNIP-3 proteinini bloke ederek etki eden EGF'nin kullanımı, priapizm tedavisinde yeni tedavi modellerinin gelişimini sağlayacaktır. İskemik priapizmde apoptozisin rolünün aydınlatılabilmesi için biyoaktif olmayan çözücülerle ve daha selektif kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız yol inhibisyonu yapan moleküller ile daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak; iskemik priapizm kavernoza dokunun özellikle gevşeme fazı olmak üzere erektil fonksiyonlarında kalıcı hasara neden olmaktadır. Bu hasardan apoptotik süreç sorumlu olabilir. Apoptozisin, kaspaz inhibisyonu ile birlikte kaspaz bağımsız yolun birlikte önlenmesi erektil fonksiyonun korunabilirliğiyle ilgili umut vermektedir. Çalışmamızda alınan olumlu sonuçlar, yeni araştırmalar doğrultusunda EGF'nin insanlarda priapizm tedavisinde kullanılabilmesi yönünde umut vericidir. İskemik priapizmde, kaspaz-bağımlı/bağımsız apoptotik süreç ve apoptozis inhibitörlerinin etkinliğini aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

5. KAYNAKLAR

1. Pryor J, Akkus E, Alter G, Jordan G, Lebret T, Levine L, Mulhall J, Perovic S, Ralph D, Stackl W. Priapism. *J Sex Med* 2004;1:116-120.
2. Berger R, Billups K, Brock G, Broderick GA, Dhabu-wala CB, Goldstein I, et al. Report of the AFUD Thought Leader Panel for evaluation and treatment of priapism. *Int J Impot Res* 2001;(suppl)5:39-43.
3. Spycher MA, Hauri D. The ultrastructure of the erectile tissue in priapism. *J Urol* 1986;135:142-147.
4. Hashmat AI, Rehman JU. Priapism. In: Hashmat AI, Das S. *The penis*. Philadelphia, Lea-Febriger 1993;219-243
5. Broderick GA, Harkaway R. Pharmacologic erection: time-dependent changes in the corporal environment. *Int J Impot Res* 1994;6:9-16.
6. Muneer A, Celtek S, Doğan A, Kell PD, Ralph DJ, Minhas S. Investigation of cavernosal smooth muscle dysfunction in low flow priapism using an in vitro model. *Int J Impot Res* 2005;17:10-18.
7. Acar O: Anatolia: The land of the father god. In: Kendir-ci M, Kadioğlu A, Miroğlu C, editors. *The history of male-female sexuality and fertility in Asia minor (today's Turkey)*. Istanbul: Turkish Society of Andrology, 2003;89-125.
8. Can Ş. *Klasik Yunan Mitolojisi*. 1. baskı. İstanbul, Remzi Kitabevi, 1970.
9. Papadopoulos I, Kelami A. Priapus and priapism: from mythology to medicine. *Urology* 1988;32:385.
10. Cherian J, Rao AR, Thwaini A, Kapasi F, Shergill IS, Saman R. Medical and surgical management of priapism. *Postgrad Med J* 2006;82:89-94.
11. Bochinski DJ, Deng DY, Lue TF. The treatment of priapism—when and how?. *Int J Impot Res* 2003;15 suppl 86-90.
12. Hinman F. Priapism: report of cases in a clinical study of literature with reference to its pathogenesis and surgical treatments. *Ann Surg*. 1914;60:689.
13. Hinman Jr. Priapism: reasons for failure of therapy. *J Urol* 1960;83:420.
14. Mundy AR HJC. Muscles and fasciae of the perineum: true pelvis, pelvic floor and perineum. *Gray's Anatomy (Standring, S. Ed.) 39th ed*. Philadelphia, 2005;1365-1371.
15. Bookstein JJ, Lang EV. Penile magnification Phamaco-arteriography: Details of intrapenile arterial anatomy. *AJR* 1985;148:883-884.
16. *Clinical Manual of Sexual Medicine: Sexual Dysfunctions in Men*. 2003.

17. From Devine CJ Jr, Angermeier KW: Anatomy of the penis and male perineum. AUA Update Series 1994.
18. Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction and priapism. *Campbell's Urology* (Patrick C. Walsh, ed.). 2002;8th ed. Vol.2, 1589-1618.
19. Burnet A, Tillman SL, Chang TS, Epstein JI, Lowenstein CJ, Bredt DS, Synder SH, Walsh PC. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol* 1993;150:73-76.
20. Ralph DJ. Normal erectile function. *Clin Cornerstone* 2005;7:13-18.
21. Wagner G, Gerstenberg T, Levin R. Electrical activity of corpus cavernosum during flaccidity and erection of the human penis: a new diagnostic method? *J Urol* 1989;3:723-725.
22. Bosch RJ, Benard F, Aboseif SR, Stief CG, Lue TF, Tanagho EA. Penile detumescence: characterization of three phases. *J Urol* 1991;146:867-871.
23. Pryor J, Akkus E, Alter G, Jordan G, Leuret T, Levi-ne L, Mulhall J, Perovic S, Ralph D, Stackl W: Priapism, Peyronie's disease, penile reconstructive surgery. In Lue TF, Basson R, Rosen R, Giliano F, Khoury S, Montorsi F, editors. *Sexual Medicine, Sexual dysfunctions in men and women*, Health publications, Paris, 2004;383-409.
24. Van der HC, Stuebinger H, Seif C, Melchior D, Martinez-Portillo FJ, Juanemann KP. Priapism – etiology, pathophysiology and management. *Int Braz J Urol* 2003;29:391-400.
25. Dodds PR, Batter SJ, Serels SR. Priapism following ingestion of tamsulosin. *J Urol* 2003;169:2302.
26. Avisrorr MU, Fernandez IA, Sanchez AS, Garcia-Pando AC, Arias LM, del Pozo JG. Doxazosin and priapism. *J Urol* 2000;163:238.
27. Vaidyanathan S, Soni BM, Singh G, Sett P, Krishnan KR. Prolonged penile erection association with terazosin in a cervical spinal cord injury patient. *Spinal Cord* 1998;36:805.
28. Banos JE, Bosch F. Prazosin-induced priapism. *Br J Urol* 1989;64:205-206.
29. Sur RL, Kane CJ. Sildenafil citrate-associated priapism. *Urology* 2000;55:950.
30. Shergill IS, Pranesh N, Haid R, Arya M, Anjum I, Testosterone induced priapism in Kallmann's syndrome. *J Urol* 2003;169:1089.
31. Bivalacqua TJ, Burnett AL. Priapism: New concepts in the pathophysiology and new treatment strategies. *Curr Urol Rep* 2006;7:497-502.

32. Ul-Hassan M, et al: Expression of TGF-beta 1 m-RNA and ultrastructural alterations in pharmacologically induced prolonged penile erection in a canine model. *J Urol* 1998;160:2263-2266.
33. Sanli O, Armagan A, Kandirali E, Ozerman B, Ahmedov I, Solakoglu S, Nurten A, Tunc M, Uysal V, Kadioglu A: TGF- β 1 neutralizing antibodies decrease the fibrotic effects of ischemic priapism. *Int J Impot Res* 2004;16:492-497.
34. Spycher MA, Hauri D: The ultrastructure of the erectile tissue in priapism. *J Urol* 1986;135:142-147.
35. Hatzichristou D, Salpiggidis G, Hatzimouratidis K, Apostolidis A, Tzortzis V, Bekos A, Saripoulos D: Management strategy for arterial priapism: Therapeutic dilemmas. *J Urol* 2002;168:2074-2077.
36. McMahon CG: High flow priapism due to an arterial-lacunar fistula complicating initial veno-occlusive priapism. *Int J Impot Res* 2002;14:195-196.
37. Witt MA, Goldstein I, Saenz deTejada I, Greenfield A, Krane R: Traumatic laceration of intracavernosal arteries: The pathophysiology of nonischemic, high flow, arterial priapism. *J Urol* 1990;143:129-132.
38. Rogers ZR: Priapism in sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005;19:917-928.
39. Montague DK, Jarow J, Broderick GA, et al: American Urological Association Guideline on the management of priapism. *J Urol* 2003;170:1318-1324.
40. AUA; 2003, Rees RW ve ark. 2002.
41. Winter CC. Priapism treated by modification of creation of fistulas between glans penis and corpora cavernosa. *J Urol* 1979;121:743-744.
42. Winter CC. Priapism cured by creation of fistulas between glans penis and corpora cavernosa. *J Urol* 1978;119:227-228.
43. Winter CC. Priapism treated by modification of creation of fistulas between glans penis and corpora cavernosa. *Trans Am Assoc Genitourin Surg* 1978;70:88-89.
44. Winter CC. Priapism cured by creation of fistulas between glans penis and corpora cavernosa. *Trans Am Assoc Genitourin Surg* 1977;69:31-32.
45. Winter CC. Cure of idiopathic priapism: new procedure for creating fistula between glans penis and corpora cavernosa. *Urology* 1976;8:389-391.

46. Grayhack JT, McCullough W, O'conor Vj, Jr, Trippel O. Venous bypass to control priapism. *Invest Urol* 1964;1:509-513.
47. Qackels R. Treatment of a case of priapism by cavernospongious anastomosis. *Acta Urol Belg* 1964;32:5-13.
48. Brant WO, Garcia MM, Bella AJ, Chi T, Lue TF. T-Shaped Shunt and intracavernous Tunneling for Prolonged Ischemic Priapism. *J Urol.* 2009;181:1699–1705.
49. Rees RW, Kalsi J, Minhas S, Peters J, Kell P, Ralph DJ. The management of low-flow priapism with the immediate insertion of a penile prosthesis. *BJU Int* 2002;90:893-897.
50. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell Death:the significance of apoptozis. *Int Rev cytol* 1980;68:251-306
51. Gottlieb AR. Apoptozis. *Williams Hematology.* (Lichtman MA, Beutler E, Kipps T, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal , ed.), 7th ed., Newyork 2005;125-130.
52. Cotran RS, Kumar V, Collins T, editors. *Robbins pathology of disease.* Philadelphia: Saunders; 1999.p.18.
53. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;17:229-259.
54. Alles A, Alley K, Barrett JC, Buttyan R, Columbano A, Cope FO, Copelan EA, duke RC, Farel PB, Gershenson LE. Apoptosis: a general comment. *FASEB J* 1991;5:2127-2128.
55. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptozis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999;107:489-506.
56. Park DS, Stefanis L, Greene LA. Ordering the multiple pathways of apoptosis. *Trends in Cardiovascular Medicine* 1997;7:294-301.
57. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269-290.
58. Liu Y, Tergaonkar V, Krishna S, Androphy EJ. Human papillomavirus type 16 E6-enhanced susceptibility of L929 cells to tumor necrosis factor alpha correlates with increased accumulation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999;274:24819-24827.
59. Jaattela M, Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2003;4:416-423.
60. Chen G, Ray R, Dubik D, Shi L, Cizeau J, Bleackley RC, Saxena S, Gietz RD and Greenberg AH. *J. Exp. Med* 1997;186:1975–1983.

61. Cizeau J, Ray R, Chen G, Gietz RD and Greenberg AH. *Oncogene* 2000;19:5453–5463.
62. Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R and Greenberg AH. *Mol. Cell. Biol* 2000;20:5454–5468.
63. Ray R, Chen G, Vande Velde C, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Gietz RD and Greenberg AH. *J. Biol. Chem* 2000;275:1439–1448.
64. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH and Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 2001;61:6669–6673.
65. Baetz D, Regula KM, Ens K, Shaw J, Kothari S, et al. Nuclear factor-kappaB-mediated cell survival involves transcriptional silencing of the mitochondrial death gene BNIP3 in ventricular myocytes. *Circulation* 2005;112:3777–3785.
66. Dorn GW, Kirshenbaum LA. Cardiac reanimation: targeting cardiomyocyte death by BNIP3 and NIX / BNIP3L Targeting cardiomyocyte death. *Oncogene* 2008; 27:158-167.
67. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999;107:489-506.
68. McCarthy NJ, Evan GI. Methods for Detecting and and quantifying apoptosis. *Curr Top Biol Dev Biol* 1998;36:259-278.
69. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A Cautionary note on the use of TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 1995;7:61-64
70. Munnariz R, Park K, Huang YH, Saenz dT, Moreland RB, Goldstein I, Traish AM. Reperfusion of ischemic corporal tissue: physiologic and biochemical changes in an animal model of ischemic priapism. *Urology* 2003;62:760-764.
71. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J.Biol.Chem.* 1990; 265:7709.
72. Pratt RM. “Role of Epidermal Growth Factor In Embryonic Development”, *Current Topics in Developmental Biology* 1987;22(8):175-193.
73. Cohen S. Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-Born Animal. *The Journal Of Biological Chemistry* 1962;237(5):1555-1563.
74. Groff G. *Oncogenes And Growth Factors*. Canada 1987;65-72.

75. Sayan H, Gönül B, Akbulut KG, Türkyılmaz A, Çelebi N. Effects of epidermal growth factor formulations on liver malondialdehyde and reduced glutathione levels in stress ulcer model. *FABAD J. Pharm. Sci* 2001;26:61–66.
76. Perheentupa J, Lakshman J, Hoath SB, Fisher DA. Hormonal Modulation of Mouse Plasma Concentration of Epidermal Growth Factor. *Acta Endocrinologica* 1984;107:571-576.
77. Thesleff I, Viinikka L, Saxen L, Lehtonen E, Perheentupa J. The parotid gland is in he main source of human salivary Epidermal growth factor. *Life Science* 1988;43:13-18.
78. Oka Y, Orth DN. Human Plasma Epidermal Growth Factor/b Urogastrone is Associated with Blood Platelets. *J. Clin. Invest* 1983;72:249-259.
79. Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal grown factor. *Nature* 1975;257:325-327.
80. Das M. Epidermal growth factor: mechanism of action. *Int. Rev. Cytol.* 1982;78: 233-236.
81. Martı U, Burwen SJ, Janes AL. Biological effects of epidermal growth factor with emphasis on the gastrointestinal tract on liver. *Ann. Update, Hepatol* 1989;9(1): 126-138.
82. Steed DL. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clinics in Plastic Surgery* 1998;25:397-405.
83. Canalis E: Clinical Review 35. Growth factors and their potential clinical volue. *J.Clin Endocrinol Metab* 1992;75(1):1-4.
84. Schlessinger J, Ulrich A, Honnegger AM, Moolenean WH. Signal transduction by EGF receptor. *Cold Spring Harbor Symposia an Quantitative Biology, Cold Spring Laboratory, NY LIII* 1998;515-519.
85. Xueling Bai, Li Yu, Jie Zhang, Anan Li, Dao Han, Qingming Luo. A high-resolution anatomical rat atlas. *J Anat.* 2006;209(5):707-708.
86. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randoll RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:165-175.
87. Dogukan A, Tuzcu M, Agca CA, Gencoğlu H, Sahin N, Onderci M, et al. A tomato lycopene complex protects the kidney from cisplatin-induced injury via affecting oxidative stress as well as Bax, Bcl-2 and HSPs expression. *Nutr Cancer.* 2011;63(3):427-434.
88. Tuzcu M, Sahin N, Orhan C, Agca CA, Akdemir F, Tuzcu Z et al. Impact of chromium histidinate on high fat diet induced obesity in rats. *Nutr Metab (lond).* 2011 May3;8:28.

89. Zhao YJ, Zhang WH, Xu CQ, Li HZ, Wang LN, Li H et al. Involvement of the ornithine decarboxylase/polyamine system in precondition-induced cardioprotection through an interaction with PKC in rat hearts. *Mol Cell Biochem*. 2009 Dec;332(1-2):135-144. Epub 2009 Jun 25.
90. Broderick GA, Gordon D, Hypolite J, Levin RM. Anoxia and corporal smooth muscle dysfunction: a model for ischemic priapism. *J Urol* 1994;151:259-262.
91. Munarriz R, Park K, Huang YH, Saenz dT, I, Moreland RB, Goldstein I, Traish AM. Reperfusion of ischemic corporal tissue: physiologic and biochemical changes in an animal model of ischemic priapism. *Urology* 2003;62:760-764.
92. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003;1(58):10-19.
93. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47:446-456.
94. Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* 2000;109:315-323.
95. Sumeray MS, Rees DD, Yellon DM. Infarct size and nitric oxide synthase in murine myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:35-42.
96. Saenz de Tejada I, Kim NN, Daley JT, Royai R, Hypolite J, Broderick GA, et al. Acidosis impairs rabbit trabecular smooth muscle contractility. *J Urol* 1997;157:722-726.
97. Moreland RB, Traish A, McMillin MA, Smith B, Goldstein I, Saenz de Tejada I. PGE1 suppresses the induction of collagen synthesis by transforming growth factor-beta 1 in human corpus cavernosum smooth muscle. *J Urol* 1995;153:826-834.
98. Mi T, Abbasi S, Zhang H, Uray K, Chunn JL, Xia LW, et al. Excess adenosine in murine penile erectile tissues contributes to priapism via A2B adenosine receptor signaling. *J Clin Invest* 2008;118:1491-1501.
99. Champion HC, Bivalacqua TF, Takimoto E, Kass DA, Burnett AL. Phosphodiesterase-5A dysregulation in penile erectile tissue is a mechanism of priapism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1661-1666.
100. Bacon AL, Haris AL. Hypoxia-inducible factors and hypoxic cell death in tumour physiology. *Ann. Med* 2004;36:530-539.
101. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem. Pharmacol* 2002;64:889-892.

102. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:9082–9087.
103. Crow MT. Hypoxia, BNip3 proteins, and the mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ. Res* 2002;91:183–185.
104. Giatromanolaki A, Harris AL. *Anticancer Res* 2001;21:4317–4324.
105. Koukourakis MI. *Anticancer Res* 2001;21:4285–4300.
106. Kothari S, Cizeau J, McMillan-Ward E, et al. BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene* 2003;22:4734-4744.
107. Nanney LB, Magid M, Stoscheck CM, King LE. Comparison of epidermal growth factor binding and receptor distribution in normal human epidermis and epidermal appendages. *J. Invest. Dermatol* 1984;83:385–393.
108. Nave KA, Probstmeier R, Schachner M. Epidermal Growth Factor does not Cross the Blood -Brain Barrier. *The Journal of Investigative Dermatology* 1985;94(5):624-662.
109. Devlin TM. *Text book of biochemistry with clinical correlations*, 3rd. Wiley-Liss, New York. 1992;378-383.
110. Wilson EA, Jawad MJ, Vernon MW. Effects of Epidermal Growth Factor on Hormone Secretion by Term Placenta in Organ Culture. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1984;149(5).
111. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann. Rev. Biochem* 1979;68: 194-216.
112. Gope R. The effect of epidermal growth factor & platelet derived growth factors on wound healing process. *Indian J. Med. Res* 2002;116:201-206.
113. Hung MC, Lau YK. *Semin. Oncol* 1999;26:51–59.
114. Harris AL. *Nat. Rev. Cancer* 2002;2:38–47.

6. ÖZGEÇMİŞ

05.09.1981 tarihinde Elazığ'da doğdum. İlköğrenimimi Atatürk İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimimi Atatürk Ortaokulu'nda, lise öğrenimimi Balakgazi Süper Lisesi'nde tamamladım (Yabancı Dil Ağırlıklı). 1999 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesinde Eğitime başladım. 2005 yılında tıp doktoru olarak mezun oldum. 2007 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Halen bu görevi sürdürmekteyim.