

ARAŞTIRMA MAKALESİ  
RESEARCH ARTICLE  
CBU-SBED, 2018, 5(3):112-119

## Kronik Sudan Kaçınma Stresi ile Oluşturulan Oksidatif Hasar ve Fulvik Asidin Erkek Sıçan Dokusunda Erektile Disfonksiyon Üzerine Etkisi

Ezgi Yaprak Söyük<sup>1</sup>, İbrahim Söğüt<sup>2\*</sup>, Esra Çikler Dülger<sup>1</sup>, Canan Hürdağ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı İstanbul, Türkiye:  
ezgiyaprak05@hotmail.com, esracikler@gmail.com,

<sup>2</sup>İstanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü,  
İstanbul, Türkiye ibrahim.sogut@gmail.com

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: İbrahim Söğüt

Gönderim Tarihi / Received: 03.08.2018

Kabul Tarihi / Accepted: 20.09.2018

### Öz

**Amaç:** Çalışmamızda fulvik asitin antioksidan özelliğinden yararlanarak erektil disfonksiyon ile bağlantılı olan penil doku hasarının üzerine olan etkisini amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda 18 adet Sprague-Dawley (250-300gr) erişkin erkek sıçan 3 eşit gruba ayrıldı: Kontrol (K), Kronik Stres (KS) ve Kronik Stres+Fulvik Asit (KS+FA). Penis doku kesitleri Hematoksilin&Eozin (H&E) ve Masson trikrom ile histokimyasal; endotelial; nöronal nitrik oksit sentaz (eNOS;nNOS), Kaveolin-1, immünohistokimya işaretlemeler incelenmiştir. Biyokimyasal olarak dokulardaki total antioksidan seviyesi (TAS), total oksidatif stres indeksi (OSI), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ölçülmüştür.

**Bulgular:** KS grubu incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla trabeküler endotel hücrelerinde kayıp, kollajen liflerde azalmalar ve incelmeler, bağ dokusu ve düz kas dağılımında bozulmalar gözlenmiştir. KS+FA grubu incelendiğinde KS grubuna kıyasla oluşan hasarlarda tam bir iyileşme gözlenmemekle beraber dokularda yer yer düzelmeler rastlanmıştır. KS grubunda eNOS ve nNOS aktivitesinin kontrol grubuna göre azalmış, kaveolin-1 reaksiyonunun ise artmış olduğu gözlenmiştir. Aynı grupta TOS ve OSI değerlerinin arttığı, TAS, SOD, KAT ve GPx değerlerinin de azaldığı görülmüştür. KS+FA grubunda fulvik asit kullanımı ile kontrol grubuna yakın olduğu gözlenmiştir.

**Sonuç:** Kullanılan fulvik asitin tedavi edici etkileri olduğu fakat tedavi için kullanılan dozun yeterli miktarda olmadığı saptanmıştır. Tedavi edici etkinin yeterli miktarda olması için farklı dozlarda çalışılmasını ileri sürmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Erektile Disfonksiyon, Sudan Kaçınma Stresi, Oksidatif Stres, İnfertilite, Fulvik Asit.

### Abstract

**Aim:** We aimed to utilize the antioxidant property of fulvic acid in our study to prevent penile tissue damage associated with erectile dysfunction.

**Methods:** 18 Sprague-Dawley male adult rats were distributed into 3 experimental groups: Control (C), Chronic Stress (CS) and Water Avoidance Stress+Fulvic Acid (CS+FA). The histological sections obtained from the testes has been stained with the Hematoxylin&Eosin (H&E) and Masson Trichrome and endothelial and n nitric oxide sentase (eNOS &nNOS) immünohistochemistry labelling has been made to. Total antioxidant status (TAS), total oksidatif stres indeksi (OSI), catalase (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) and superoxide dismutase (SOD) levels has been evaluated biochemically.

**Results:** In CS group were examined, it was observed that trabecular endothelial cells are lost, collagen fibers had shrunk, connective tissue and smooth muscle distributions were unevenly distributed compared to the control group. When CS + FA group were examined, damage in the CS group showed considerable recovery in tissues that were treated. In CS group both eNOS and nNOS reactivity had decreased compare to the control group whereas caveolin-1 reactivity had increased. histochemical data. It was also observed increased TOS and OSI levels and decreased TAS, SOD, CAT and GPx levels in the KS group.

**Conclusions:** The fulvic acid used was found to have therapeutic effects but the dosage used for treatment was not sufficient. We suggest to work at different but higher dosages to ensure that the therapeutic effect is achieved.

**Key Words:** Erectile Dysfunction, Water Avoidance Stress, Oxidative Stress, Infertility, Fulvic Acid.

## 1. Giriş

Dünyada en yaygın rastlanan erkek infertilite problemi, beraberinde cinsel fonksiyon sorunlarını da meydana getiren, erektil disfonksiyondur (ED). İnfertilite erkek için stres kaynağıdır. İnfertiliteye bağlı stres ED gelişimine sebep olur [1]. Erektile disfonksiyon ile infertilite arasında psikoseksüel bir etki vardır. İnfertiliteye bağlı yaşanan sürekli kaygı, inhibitör sinirleri uyarak penisteki düz kasların gevşemesini önler. Bu durum ereksiyon bozukluğuna neden olur [2]. Erektile disfonksiyon tanılı hastalarda cinsellik üremenin önüne geçer, bu durumda erkek birey kendini yetersiz hissetme psikolojisine girer ve yaşam kalitesini düşürür [3].

Stres, organizmanın fizyolojik ve psikolojik dengesini bozacak anormal çevresel etkilere karşı homeostazi korumak üzere geliştirdiği bir tepkidir. Kronik stres uzun süreli strese maruz kalma durumu olarak tanımlanır [4]. Kronik stres sonucu hipotalamik-pitüiter-adrenal (HPA) ekseninin organizasyonunda değişiklikler meydana gelir [5]. Vücuttaki HPA eksenini ile hipotalamik-pitüiter-gonadal (HPG) ekseninin hormonal mekanizmaları arasında yakın bir ilişki vardır. Uzun süreli veya tekrarlanan stres koşullarında, HPA ekseninin aktivasyonu sonucunda kortizol salgısı artar; ancak HPG ekseninin aktivitesi ters yönde etkilenir. HPG ekseninin son ürünü olan testosteron, ereksiyonun hormonal düzenlenmesinde önemli rol oynar [6]. Ereksiyon, hipotalamus ve periferik etki mekanizmaları altındaki cinsel uyarı sonrasında, sinüzoidlerin kan ile dolmaya başlaması sürecidir. Bu süreç, korpus kavernoza da ki düz kasların gevşemesi ile sağlanır.

Ereksiyon oluşumunda nitrik oksit (NO), nörojenik nitrik oksit sentaz (nNOS), endotel nitrik oksit sentaz (eNOS), Ca<sup>2+</sup> ve tunika albuginea rol oynamaktadır [7]. Reaktif oksijen türleri (ROS) vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri NO ve eNOS ekspresyonunu ve aktivitesinin uyarılmasına neden olur [8]. Endotel hücre membranında bulunan eNOS ve kaveolin-1 proteinleri direkt etkileşim halindedir ve diğer proteinlerle birlikte normal endotel hücre fonksiyonu için çalışırlar. Kaveolin-1, eNOS aktivitesini inhibe eder ve buna bağlı olarak endotel hücre yapısının bozulmasına ve erektil disfonksiyona sebep olur [9]. Stresin çeşitli dokularda meydana getirdiği toksisite, ROS artışı nedeniyle oluşur. Normal koşullarda hücre içi antioksidan sistemleri, ROS oluşumunu engelleyerek ya da serbest radikal ve bunların öncülerini uzaklaştırarak görev yaparlar. ROS'un artması ve antioksidan savunma sistemlerinin bu ROS artışına karşı yetersiz kalmasıdır [10].

Post mortem dönemde mikroskobik organizmalar maddelerin ayrıştırılmasını sağlarken birçok yararlı madde de açığa çıkar. Bu maddelerden biri toprakta bulunan humik maddedir [11]. Fulvik asit yapısında aromatik polimerler, aromatik halkalar, fenolik hidroksil, keton karbonil dahil olmak üzere aktif

fonksiyonel gruplar içerir [12]. Topraklarda humik maddelerin dağılımı yaklaşık olarak %50 humin, %40 humik asit ve %10 fulvik asit şeklinde olduğu bilinmektedir [11,13]. Fulvik asit, humik asite göre daha düşük molekül ağırlığına ve daha yüksek oksijen oranına sahiptir. Fulvik asit, hormonlar, vitaminler ve mineraller bakımından çok zengindir ve bulundurduğu sağlıklı minerallerden dolayı toprağın içindeki en aktif madde olarak bilinir [12]. Fulvik asit, antioksidan özelliğinin yanı sıra toksik olmayan anti-inflamatuar ve antiapoptotik bir ajandır. Stres sonucu, fulvik asit tedavisinin nötrofillerden salınan oksidanların üretimini azalttığı bildirilmiştir [14]. Fulvik asit, serbest radikal hasarı ile mücadelede önemli bir başarı göstermektedir, özellikle süperoksit dismutaz enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırmaktadır [15].

Çalışmamızda uygulanan sudan kaçınma stresi hem psikolojik hem de fizyolojik stresi yansıtmaktadır. Bu çalışmanın amacı, günümüzde herkesi etkileyen yaşamsal stres koşullarının etkisi ile artan ve önemli bir sosyal sorun olan erektil disfonksiyon ile ilişkili penis doku hasarına fulvik asitin iyileştirici etkisinin incelendiği ülkemizde ve dünyada yapılacak ilk araştırma olma özelliğini taşımaktadır.

## 2. Gereç ve Yöntem

**Deney Hayvanları** Deneylerde 250-300 gr ağırlığındaki erişkin Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. Denekler, deney süresince standart kafeslerde, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde, sabit 22 °C ve %55 nemli ortamda barındırıldılar, standart pellet yem ve musluk suyu ile (ad libitum) beslendiler. Denekler, İstanbul Medipol Üniversitesi MEDİTAM'dan alındı ve deneysel çalışmalar aynı kurumda 24/02/2016 tarihli 2016/26 numaralı etik kurulu onayı ile gerçekleştirildi.

**Fulvik Asitin Hazırlanması** Fulvik asit, IHSS (Uluslararası Humik Madde Derneği) tarafından "Pahokee Turba Fulvik Asit Standard" olarak temin edildi. Deneylerde distile su ile 150 mg/kg oranında hazırlanan homojen karışım kullanıldı.

**Stres Protokolü** Denekler birbirini takip eden 10 gün boyunca günde 1 saat olmak üzere 50 cm x 50 cm x 50 cm ebatlarındaki ılık suyla dolu pleksiglas havuzların merkezindeki 6 cm x 8 cm ebatlarındaki platformun üzerine bırakıldılar. Havuzlar platformun 1 cm altına gelecek kadar ılık su ile dolduruldu. Stres protokolü her gün sabah 08:00-09:00 saatleri arasında uygulandı. Deneylere başlanmadan bir hafta önce tüm denekler aynı araştırmacı tarafından dokunularak deney koşullarına ve araştırmacıya alıştırdılar (handling).

**Deney Protokolü** Deneylerde kullanılan toplam 18 adet sıçan her bir grupta eşit sayıda denek olacak şekilde 3 gruba ayrıldılar: (1) Kontrol (K) (n=6): Herhangi bir işlem uygulanmayan grup, (2) Kronik Stres (KS) (n=6): 10 gün boyunca sudan kaçınma stresi uygulanan grup, (3) Kronik Stres+Fulvik Asit (KS+FA) (n=6): 10 gün boyunca sudan kaçınma stresi ve ardından 10 mg/kg fulvik asit (i.p.) uygulanan grup. Deneylerin 10. gününde tüm gruplardaki denekler, izofluran (Aerrane

Isofluran Volatil) anestezi ile sedasyonun ardından sakrifiye edildiler. Deneklerin penil dokuları histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için Bouin solüsyona alındı. Biyokimyasal analiz için ayrılan testisler, sıvı azotta dondurulduktan sonra analizleri yapılabildiği kadar -80°C’de muhafaza edildi.

**Histolojik Yöntem** Bouin solüsyonunda fikse olan penil dokuları dehidrate edildikten sonra parafin blok haline getirilip dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı (Thermo Scientific HM 340E). Genel histolojik değerlendirme için H&E, bağ dokusu değerlendirmesi için Masson trikrom (TM) boyamaları ve immünohistokimyasal analizler yapıldı. H&E (Biooptica) ile boyanan kesitler X100, X400 büyütme ve TM (Biooptica) ile boyanan kesitler X1000 büyütme de Olympus BX53 ışık mikroskobu ile incelenip fotoğraflandı.

**İmmünohistokimyasal Yöntem** Kesitleri deparafinize ve rehidratasyon yaptıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için %3'lük hidrojen peroksit ve antijenik bölgelerin açılması amacıyla sitrat tamponuna (pH 6.0) (Sigma-Aldrich, LOT:C-2488) alındılar. Ardından kesitler nNOS primer antikorunda (1:200), eNOS primer antikorunda (1:500) ve kaveolin-1 primer antikorunda (1:200) (Thermo Fischer Scientific, sırasıyla LOT numaraları 40487565, QJ214409, RE2198415) +4 °C’de 24 saat boyunca tutuldu. Kesitler anti-polyvalent Biotin (ScyTek Laboratories LOT: 41865) sekonder antikorunda daha sonra peroksidaz enzimi ile işaretli olan streptavidinle (ScyTek Laboratories SensiTek HRP LOT: 41865) işaretlendi. Renk reaksiyon ürününün oluşması için 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) substratı (ScyTek Laboratories LOT: 36729) ile sulandırılmış olan DAB kromojene (ScyTek Laboratories LOT: 36702) maruz bırakıldı. nNOS, eNOS ve kaveolin-1 reaksiyonlarını gözlemlemek için ışık mikroskobunda (Olympus Bx53, Japonya) fotoğrafları çekildi.

**Biyokimyasal Yöntem** Penil doku örnekleri tartıldıktan sonra TAS, TOS ve OSİ seviyelerinin inceleneceği örnekler, 0.15 N potasyum klorür (KCl) solüsyonunda; SOD, KAT, GPx seviyelerinin inceleneceği örnekler PBS solüsyonunda Ultra Turrax T10 (IKA, Wilmington, NC, ABD) ile homojenize edildi. Penis dokusunda TAS, TOS ve OSİ seviyeleri Rel Assay Diagnostics kitleri (Gaziantep, Türkiye) ve SOD, KAT ve GPx seviyeleri ise ELISA kitleri (Bioassay teknolojisi laboratuvarı, Şangay, Çin) ile tespit edildi.

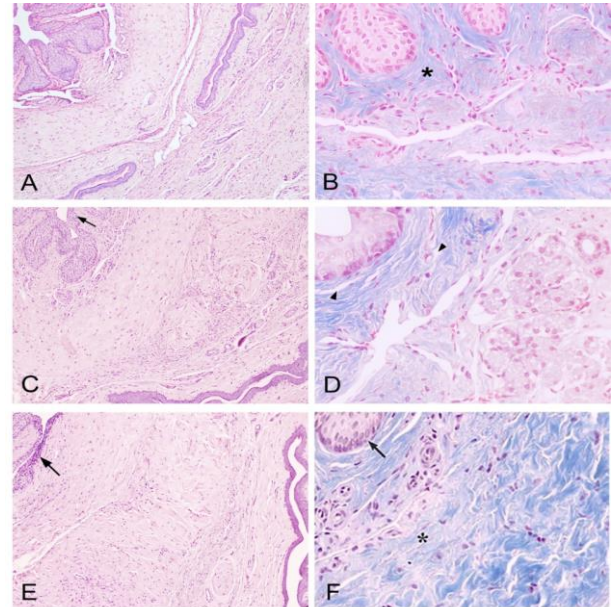
**İstatistiksel Değerlendirme** GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software Inc.) programı kullanıldı. Bulgular için ortalama ± standart hata (SE) ve \*p<0,05 değeri anlamlı kabul edildi. Normal dağılıma uygunluk gösteren veriler için tek yönlü ANOVA testi olan Tukey uygulandı.

### 3. Bulgular

**3.1.Histolojik Bulgular** Kontrol grubuna ait H&E ile boyanmış penis dokuları ışık mikroskobu ile incelendiğinde bağ doku yapısının düzgün, kollajen yapısının sık ve paralel yerleşim gösterdiği

görülmüştür. Fibroelastik trabeküler bağ doku ile düz kas içeriği oranı normal değerlendirilmiştir. Penil üretranın transizyonel epitelinde herhangi bir hasara rastlanmamış, lamina proprianın düzgün dağılım gösterdiği ve korpus spongiosum yapısının normal olduğu gözlenmiştir (Şekil 1A). Masson'un üçlü boyası ile boyanan K grubuna ait penis preparatları incelendiğinde, kollajen-kas oranı düzenli dağılım ve yerleşim göstermiştir. Epitel görüntüsünün düzgün ve hücrelerin yerleşimlerinin düzenli olduğu görülmüştür (Şekil 1B). KS grubuna ait H&E ile boyanmış penis dokuları ışık mikroskobu ile incelendiğinde bağ dokuda bozulmalar kollajen liflerde kopmalar gözlenmiştir. Bağ doku ile epitel doku arasındaki bazal membran bütünlüğü bozulduğu için bazal hücrelerde düzensiz yerleşim görülmüştür. Özellikle trabeküler alandaki düzensizlikler çok yoğun olarak izlenmiştir (Şekil 1C). KS grubuna ait Masson'un üçlü boyaması yapılan penis preparatları incelendiğinde, tunika albuginea'nın kaba ve dağınık kollajen lif demetlerinden oluştuğu görülmüştür. Dağınık ve incelmış kollajen demetleri içeren kavernoza dokuda yaygın fibroblast varlığı gözlenmiştir. Bağ dokusu ve düz kas dağılımı oranında belirgin bozulmalar ile endotel hücre hasarı görülmüştür (Şekil 1D).

KS+FA grubuna ait H&E ile boyanmış penis dokuları ışık mikroskobu ile incelendiğinde KS grubuna kıyasla bazal membran ve bağ dokuda düzensizlikler gözlenmiştir (Şekil 1E). KS+FA grubuna ait Masson'un üçlü boyası ile boyanan penis doku preparatları incelendiğinde, kronik stres grubuna kıyasla kollajen lif ve bazal membran yapılarında düzensizlikler görülmüştür (Şekil 1F).



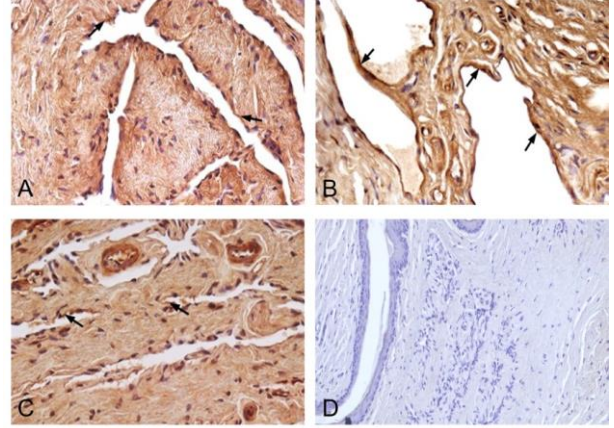
**Şekil 1:** Hematoksilen-eosin ve Masson'un üçlü boyaması ile boyanan penil doku kesitleri: K grubunda penil üretra, transizyonel epitel ve korpus spongiosum (A) ve düzenli yerleşimli kollajen görüntüsü (\*), (B); KS grubunda bazal membran bütünlüğünde bozulmalar

(→), kollajen liflerde ayrılmalar, (C); Kollajen liflerin dağılık ve incelmış görüntüsü (▲), (D); KS+FA grubunda bazal membranda (→), (E) ve bağ dokusunda düzelmeler (→, \*), (F) (Şekil 1A, C ve E: H&E boyaması, büyütme: X100; Şekil 1B, D ve F: Masson'un üçlü boyaması, büyütme: X 400).

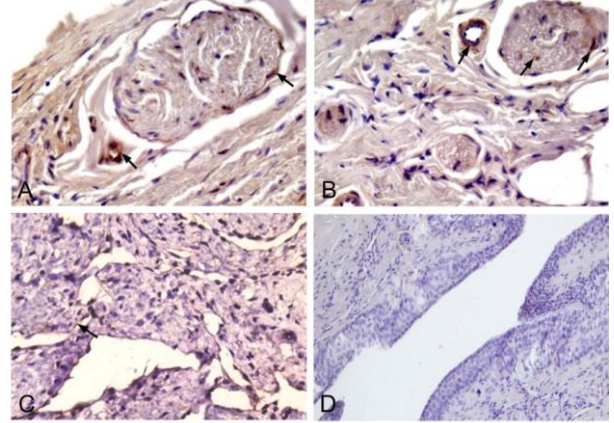
**3.2.İmmünohistokimyasal Bulgular** Sıçan penis dokularından elde edilen örneklerde K grubuna ait eNOS immün reaksiyonunun KS grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu ( $p<0,05$ ) görülmüştür. KS+FA grubuna ait eNOS immün reaksiyonunun ise KS grubuna göre artmış, ancak bu artış anlamlı bulunamamıştır Reaksiyon özellikle trabeküler alanda yer alan endotel hücrelerde gözlenmiştir (Şekil 2A). Bunun yanı sıra, damar endotelinde de eNOS reaksiyonunun olduğu belirlenmiştir. KS grubuna ait penis dokularında eNOS reaksiyonunun trabeküler alanda yer alan endotel hücrelerinde kontrol grubuna göre az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2B).

KS+FA grubuna ait penis dokularında trabeküler alan endotelindeki eNOS reaksiyonunun ise kronik stres grubuna göre arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 2C). KS grubunda nNOS ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla azalmış; ancak bu azalma anlamlı bulunmamıştır. KS+FA grubundaki nNOS ekspresyonu KS grubuna kıyasla artmış, bu artış anlamlı bulunmamıştır. nNOS reaksiyonunun, sıçanlardan elde edilen penis dokusunda sinir pleksusları çevresinde olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3A). KS grubuna ait penis dokusunda sinir pleksusları çevresinde nNOS immün reaksiyonu incelendiğinde K grubuna kıyasla aktivasyon azalmıştır (Şekil 3B). KS+FA grubuna ait penis dokusunda nNOS immün reaksiyonu incelendiğinde KS grubuna göre artış gözlemlenmiştir (Şekil 3C). KS grubunda kaveolin-1 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla artmış; ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır.

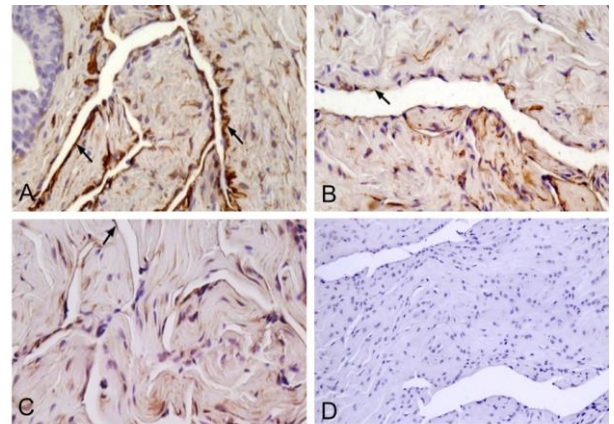
KS+FA grubundaki kaveolin-1 ekspresyonu KS grubuna kıyasla azalmış, bu azalma anlamlı bulunmamıştır. Kaveolin-1 ekspresyonu penis dokusunda düz kas hücrelerinde gözlemlenmemiştir (Şekil 4A). KS grubuna ait penis dokusu düz kas hücrelerinde immün reaksiyonu incelendiğinde K grubuna kıyasla aktivasyonu artmıştır (Şekil 4B). KS+FA grubuna ait penis dokusu düz kas hücreleri incelendiğinde kaveolin-1 immün reaksiyonu incelendiğinde KS grubuna göre azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4C).



**Şekil 2:** eNOS ile işaretlenen penis doku kesitleri: K grubunda trabeküler alanda endotel hücrede eNOS immün işaretlemesi (→), (A); KS grubunda trabeküler alanda bulunan endotel hücrelerde eNOS aktivitesindeki azalma (→), (B); KS+FA grubunda trabeküler alanda aktivitesi KS grubuna göre artmış (→), (C); Kontrol grubunda eNOS negatif immün boyama (D), (eNOS immünohistokimyası, büyütme: X400).



**Şekil 3:** nNOS ile işaretlenen penis doku kesitleri: K grubunda sinir pleksuslarında nNOS immün işaretlemesi (→), (A); KS grubunda nNOS aktivitesindeki K grubuna göre azalma (→), (B); KS+FA nNOS immün aktivitesinde KS grubuna göre artma (→), (C); Kontrol grubunda nNOS negatif immün boyama (D), (nNOS immünohistokimyası, büyütme: X400).



**Şekil 4:** Kaveolin-1 ile işaretlenen penil doku kesitleri: K grubunda düz kas hücresinde kaveolin-1 immün işaretlemesi (→), (A); KS grubunda düz kas hücresinde kaveolin-1 immün aktivitesinde K grubuna göre azalma (→), (B); KS+FA grubunda KS grubuna göre azalma (→), (C); Kontrol grubunda kaveolin-1 negatif immün boyama (D), (kaveolin-1 immünhistokimyası, büyütme: X400).

**Tablo 1: Biyokimya ve immunohistokimya verilerinin karşılaştırılması**

Parametreler	K Grubu	KS Grubu	KS+FA Grubu	p Değeri
SOD (ng/dL)	3.111±0.156	2.563±0.190	3.394±0.170 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> p<0.05 KS grubuna göre
KAT (ng/dL)	36.29±2.121	30.11±1.283	41.20±1.771 <sup>b</sup>	<sup>b</sup> p<0.01 KS grubuna göre
GPx (ng/dL)	23.96±2.710	19.13±1.489	28.53±2.012 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> p<0.05 KS grubuna göre
TOS (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> eq/L)	2.394±0.391	3.981±0.548	1.99±0.566 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> p<0.05 KS grubuna göre
TAS (mmol Trolox eq/L)	2.297±0.192	1.771±0.230	3.002±0.201 <sup>b</sup>	<sup>b</sup> p<0.01 KS grubuna göre
OSI (arbitrary unit)	0,11±0,02 <sup>a</sup>	0.265±0.06	0.06±0.018 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> p<0.05 KS grubuna göre
eNOS	2.167±0.16 <sup>a</sup>	1.333±0.21	1.833±0.307	<sup>a</sup> p<0.05 KS grubuna göre
nNOS	2.50±0.223	2.0±0.258	2.167±0.307	İstatistiksel fark yok
Kaveolin-1	2.333±0.21	2.50±0.223	2.167±0.307	İstatistiksel fark yok

a: \*p<0.05, b: \*\*p<0.01

#### 4. Tartışma

Eretil disfonksiyon yeterli bir ereksiyonu sağlama ve sürdürmedeki persistan yetersizlik olarak tanımlanır [16]. Günümüzde ED ile ilgili yapılan çalışmalarda stresin ED üzerine olan göreceli etkileri araştırılmıştır [17]. Ereksiyon, psikolojik, hormonal, nöral sistemlerle vasküler ve kavernoza düz kas yapılarının birlikte çalışması ile meydana gelen kompleks ve dinamik bir mekanizmadır. Bu mekanizmaların herhangi bir aşamasında oluşacak bozukluk eretil disfonksiyon ile sonuçlanır. Bu olayın uzun yıllar anlaşılmasının sebebi, deneysel çalışmaları yapmadaki zorluklarından kaynaklanıyordu.

Bir çalışmada, deneklere günde 1 saat sudan kaçınma modeli uygulayarak hem fizyolojik hem de psikolojik periferik CRH (kortikotropin salgılatıcı hormon) aracılığıyla kolon epitelinin permeabilitesini arttırdığı sonucuna varmışlardır [18]. Tron ve arkadaşları, kemirgenlerde sudan kaçınma modeli, hassas bağırsak sendromuna benzer aşırı visseral ağrıya sebep verdiğini ve bu modelin kronik fizyolojik stres modeli olduğunu ispatlamışlardır. Bu durum kronik stres visseral duyarlılığı artırarak merkezi sinir sistemini de etkilediği için önemlidir [19].

**3.3. Biyokimyasal Bulgular** Sıçan testis örneklerinde K, KS ve KS+FA grupları arasındaki biyokimyasal parametrelerin değişimi incelendiğinde KS+FA grubuna ait dokuların SOD, KAT, GPx ve TAS düzeylerinin KS grubuna göre ise anlamlı derecede arttığı; KS+FA grubuna ait TOS ve OSI düzeylerinin KS grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (Tablo 1).

Lee ve arkadaşları, dişi sıçanlara 10 gün boyunca sudan kaçınma modelini kullanmış bunun sonucunda yüksek kaygılı sıçanlarda kronik psikolojik stresin sürekli mesane hiperaljeji olmasına neden olduğunu ileri sürmüşlerdir [20]. Çalışmamızda, yaşamsal stresi yansıtmak üzere erkek sıçanlara on gün birer saat uygulanan kronik sudan kaçınma stresi, penis dokusunda hasar oluşturmuştur.

Ereksiyon mekanizmasında anatomik bakımından korpus kavernoza en önemli yapıyı meydana getirir. Korpus kavernoza başlıca düz kas lifleri, bağ dokusu, kan damarları ve trabeküler damarlardan oluşmuştur. Bağ dokusu ereksiyon sırasında sertliğin artmasına ve uzamasına izin verir ve detümesans sonrası olan gevşeme dönemine hızlıca geri dönmesi için gerekli direnci sağlar. Halbuki, düz kas lifleri, ereksiyon esnasında intrakavernöz basıncı artırarak ereksiyonun devam etmesi için gevşemelidir. Bu mekanizma sadece vasküler mekanizma ile sağlanamaz. Bu durumda normal penis fonksiyonunu sağlamak için yeterli oranda düz kas ve bağ dokusu gerektiği görülmektedir.

Mersdorf ve arkadaşları yaşlı hastalarda ve vasküler rahatsızlığı olan hastalarda ekstrasellüler matriksin, kas endotel hücrelerinin azaldığını bildirmiştir [21]. Diğer çalışmalar, düz kas içeriğinin veno-okluzif

mekanizmayla fonksiyonel bir paralellik olduğunu bildirmişlerdir. Özbilen yaptığı çalışmada Tunika albuginea yapısındaki bozukluk ve kalınlığındaki azalmanın veno-oklüzyonun sağlanmasında yetersizliğe sebep olarak ED' ye neden olacağını bildirmiştir [22].

Çalışmamızda Masson'un üçlü boyama bulguları incelendiğinde kronik stres grubuna ait bulgularda tunika albuginea kaba ve dağınık kollajen lif demetleri şeklinde gözlenmektedir. Bağ dokusu ve düz kas dağılımı incelendiğinde belirgin bozulmalar gözlenmekte bunlarda ED'ye katkıda bulunmaktadır. Kronik stres oluşturduğumuz grupta da saptandığı üzere korpus kavernozumun düz kas liflerinin göreceli kaybı ve bağ dokusunun artışı (penil fibrozis) ED'li hastalarda da bildirilmiş ortak bir bulgudur [22]. Penil fibrozis aynı zamanda yaşlanma, diabetes mellitus, kavernoze sinir hasarı ve androjen eksikliği ile ilişkilidir. İnsan ve sıçan korpus kavernozumları arasında morfolojik farklılıklar olmasına rağmen benzer biçimde bazı hastalıkların oluşumundaki penil fibrozis mekanizması açınsındadır.

NO'nun fizyolojik sistemlerde birçok işlevsel rollere sahip olduğu bilinmektedir. NO penil ereksiyonda vasküler ve nörolojik etkiye sahiptir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar erektil disfonksiyonun özellikle NO'nun fizyolojik etkilerinin aksamasından kaynaklı olduğunu göstermektedir. Nöronlar tarafından sentezlenen NO nörotransmitter olarak hareket ederken, damar içerisinde NO endotel hücre fonksiyonu ve düz kas hücre çoğalmasını inhibe etmektedir. Nitrik oksit guanilat siklaz enzimini aktive eder, böylece trabeküler düz kaslarda guanozin trifosfatın (GTP) guanozin monofosfata (cGMP) dönüşümüne yol açılır. Monofosfat düz kas gevşemesine neden olur. Bu nedenle GTP, cGMP dönüşümde meydana gelecek herhangi bir değişiklik erektil disfonksiyona katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür [23].

ED ile ilgili yapılan çalışmalarda, penil ereksiyonda rol oynayan diğer faktörlerden düz kas ile ilgili yapılan araştırmalarda kaveolin-1 etkisi incelenmiştir [24]. Çalışmada, erektil disfonksiyonun oksidatif stres ile olan ilişkisini anlamak (vasküler ve nörolojik etkisini göstermek için) eNOS, nNOS ve ED' nin düz kas hasarı sebepli ilişkisini anlamak için ise kaveolin-1 seviyeleri belirlenmiştir. Bivalacqua ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada artmış oksidatif stres sonucu eNOS fonksiyonunun azalarak ED'a sebep olduğunu göstermişlerdir [25]. Seftel ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada eNOS'un vasküler kaynaklı hastalıkların patogeneğinde ve endotel hücre ile düz kasların immünohistokimyasal lokalizasyonunda önemli bir düzenleyici rol oynadığını göstermişlerdir [26]. Penson ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada ED'u olan hastalarda nNOS aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir [27].

Akingba ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada ED'de eNOS ve nNOS etkisinin aynı oranda azaldığını göstermişlerdir [22,28]. Hurdag ve arkadaşları, yaptığı çalışmada ED'u olan hastalarda eNOS ve nNOS'un etkisinin azalmasının korpus kavernozeum relaksasyonunu bozarak kavernozeal disfonksiyona sebep olduğunu göstermiştir [29]. Haas ve arkadaşları, tavşan korpus kavernozeumunda asetilkolin uygulama sonrası yaşa bağlı gevşemenin azaldığını göstermişlerdir [30]. Bununla birlikte, penisde yaşlılarda ve gençlerde eşdeğer gevşemenin NO verilmesi ile sağlanabileceği gösterilmiştir. Haas ve arkadaşları, eNOS ifadesinin penis endotelin de upregüle edildiğini doğrulamıştır. Genç tavşanlar ve yaşlı tavşanlar kıyaslandığında eNOS' un telafi edici bir mekanizma olduğu anlaşılmıştır [30]. Araştırmamızda da eNOS ve nNOS'un aktivitesinin kronik strese maruz kalan grupta, K grubuna oranla azaldığı gözlemlenirken KS+FA grubunda kronik strese maruz kalan gruba göre azda olsa artış gözlemlenmiştir. Kaveolin-1 aktivitesi ise tam tersi etkiyle KS grubunda anlamsız artış göstermiştir. Kaveola plazma zarında bulunan özel organeldir ve çoğu hücrenin endositozu ile ilgilidir. eNOS ile kaveolin-1 arasında inhibitör ilişki olduğu kabul edilmektedir. eNOS kalsiyum-kalmodulin bağımlı çalışmaktadır, bu düzenleme eNOS homodimerizasyonu için önemlidir. eNOS' un böyle etkinleşmesi kaveolin-1 aktivitesini engellemektedir. Kalmodulin' in eNOS a bağlanması ile hücre içi kalsiyum seviyesi düşmektedir [24].

Bugüne kadar elde edilen veriler, kaveolin'lerin NO sinyaline katkıda bulunduğunu, kas fonksiyonu ve endotel sağlığı için kaveolin'lerin önemli olduğunu bildirmektedir. Sağlıklı ereksiyon için penis dokusunda eNOS aktivitesinin kaveolin-1'e oranla daha fazla olması gerekmektedir [31]. Linder ve arkadaşları, kaveola'nin ereksiyona katkısı solubl guanil siklaz/cGMP sinyal yolağı için platformlar olarak hareket etmesi olduğunu ileri sürülmüştür [32].

Çalışmamızda uyguladığımız kaveolin-1'in istatistiksel olarak anlamsız yükselişi kaveolin-1'in aktivitesi hakkında daha fazla bilgi ihtiyacımızın olduğunu düşünmekteyiz. Bir çalışmada subklinik hipotiroidinin endotel disfonksiyona neden olduğu ateroskleroz gelişimine etkisi olacak şekilde lipid metabolizması üzerindeki olumsuz etkisi olduğu ortaya konulmuştur. Endotel bağımlı vazodilatasyon olan NO, LDL kolesterol'ün (LDL-C) oksidatif modifikasyonunu engeller [33]. Bu bilginin doğrultusunda çalışmamızda kaveolin-1'in aktivitesini anlayabilmek ve yorumlayabilmek için stres ile birlikte inflamasyon parametrelerine bakılması gerektiğini ileri sürmekteyiz.

Stres koşulları sırasında oksidatif stres ortaya çıkabilmektedir. Oksidatif stres, vücut hücrelerin çok fazla düzeyde moleküler oksijen veya reaktif oksijen türlerine (ROS) maruz kalması anlamına gelmektedir. Oksidatif stresin etkisinden korunmak için bazı enzim

sistemleri vardır ve bunlar süperoksitler ile diğer ROS'ları uzaklaştırmaktadır. Bunların en önemlileri, süperoksit dismutaz (SOD; bu enzim süperoksit anyonunun ( $\cdot O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüştürür), katalaz (KAT;  $H_2O_2$  'nin moleküler oksijene ve suya çevrilmesini katalizler) ve glutatyon peroksidaz (GPx; hidrojen peroksiti suya dönüştürür) 'dir [34]. Bizim çalışmamızda da kronik stres oluşturulan grubun SOD, KAT, GPx ve TAS düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir. Fulvik asit yapısında içerdiği aktif karbon ve bol miktardaki oksijen molekülü nedeniyle güçlü antioksidan özelliği taşır. Bu özelliği sayesinde fulvik asit etkisini, dokuda oluşan serbest radikalleri nötralize ederek gösterir [35]. KS+FA grubun ise SOD, KAT, GPx ve TAS düzeylerinde KS grubuna kıyasla arttığı gözlemlendi. TOS ve OSI seviyeleri ise antioksidan parametrelerini destekler şekilde KS grubunda artmış KS+FA grubunda ise azalmıştır. Bizim sonuçlarımıza paralel olarak daha önce yapılan bir çalışmada, sudan kaçınma stresi sonucunda lipid peroksidazın son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyelerinde artma, antioksidanlardan glutatyon seviyesinde ise azalma bulmuşlardır [36]. Stres sonucu, FA tedavisinin nötrofillerden salınan oksidanların üretimini azalttığı anlaşılmıştır [14]. FA serbest radikal hasarı ile mücadelede önemli bir başarı göstermektedir, özellikle süperoksit dismutaz enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırmaktadır [14]. Schneider ve arkadaşları yaptıkları çalışmada FA 'in ölümcül kanser ve tümörlerin tedavisinde ilerlemeyi durdurduğunu belirtmiştir. MacCarthy yaptığı çalışmada FA'in hücrelerde antioksidan gibi davranarak serbest radikallerin olumsuz etkilerini yok ederek hastalık önlenmesinde etkili olduğunu belirtmiştir [37]. Bunlara ek olarak, oksidatif stresin hipertansiyon, diyabet ve infertilite gibi pek çok hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir [38].

## 5. Sonuç

Çalışmamızın sonucunda kronik sudan kaçınma stresinin testis dokusunun antioksidan savunma sistemini zayıflattığı ve dokuda hem histolojik hem de biyokimyasal hasara neden olduğu tespit edilmiştir. Dışarıdan alınan güçlü bir antioksidan olan fulvik asit desteği ile dokudaki antioksidan-oksidan dengesi kurularak oksidatif stresin olumsuz etkilerinin engellendiği görülmüştür. Buna göre fulvik asitin psikolojik strese bağlı infertilite durumlarında stres kaynaklı penis dokusunda hasarın azaltılmasında destekleyici bir ajan olarak kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

## 6. Teşekkürler

Çalışmamız İstanbul Bilim Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (İBAPKO Karar No: 2016-01-17) tarafından desteklenmiştir.

## 7. Kaynaklar

1. Khademi A, Alleyassin A, Amini M, Ghaemi M. Evaluation of sexual dysfunction prevalence in infertile couples. *J Sex Med.* 2008;5(6):1402-10.

2. Saleh RA, Ranga GM, Raina R, Nelson DR, Agarwal A. Sexual dysfunction in men undergoing infertility evaluation: a cohort observational study. *Fertil Steril.* 2003;79(4):909-12.
3. Burns LH. Sexual counseling and infertility. In: Covington S.H. BLH, editor. *Infertility counseling a comprehensive handbook for clinicians.* New York: Parthenon Publishing; 2006. p. 212-36.
4. Rees PM, Fowler CJ, Maas CP. Sexual function in men and women with neurological disorders. *Lancet.* 2007;369(9560):512-25.
5. Tsigos C, Kyrou I, Kassi E, Chrousos GP. *Stress, Endocrine Physiology and Pathophysiology.* 2000.
6. Grigoriadis DE, Heroux JA, De Souza EB. Characterization and regulation of corticotropin-releasing factor receptors in the central nervous, endocrine and immune systems. *Ciba Found Symp.* 1993;172:85-101
7. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacol Ther.* 2005;106(2):233-66.
8. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41:1819-28.
9. Lewis RW, Fugl-Meyer KS, Corona G, Hayes RD, Laumann EO, Moreira ED, Jr., et al. Definitions/epidemiology/risk factors for sexual dysfunction. *J Sex Med.* 2010;7:1598-607.
10. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(7):841-52.
11. Wang W, Yang H, Wang X, Jiang J, Zhu W. Effects of fulvic acid and humic acid on aluminum speciation in drinking water. *J Environ Sci (China).* 2010;22(2):211-7.
12. Zhang XF, Yang G, Dong Y, Zhao YQ, Sun XR, Chen L, et al. Studies on the binding of fulvic acid with transferrin by spectroscopic analysis. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015;137:1280-5.
13. Chiou C.T. Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. In: Sawhney B.L. BK, editor. *Reactions and movement of organic chemicals in soils.* Madison,W: Soil Science Society of America; 1989. p. 1-29.
14. van Rensburg CE. The Antiinflammatory Properties of Humic Substances: A Mini Review. *Phytother Res.* 2015;29(6):791-5.
15. Dong L, Cordova-Kreylos AL, Yang J, Yuan H, Scow KM. Humic acids buffer the effects of urea on soil ammonia oxidizers and potential nitrification. *Soil Biol Biochem.* 2009;41(8):1612-21.
16. Wespes E, Amar E, Hatzichristou D, Montorsi F, Pryor J, Vardi Y. Guidelines on erectile dysfunction. *Eur Urol.* 2002;41(1):1-5.
17. Saenz de Tejada I, Angulo J, Celtek S, Gonzalez-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, et al. Pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2005;2(1):26-39.
18. Saunders PR, Santos J, Hanssen NP, Yates D, Groot JA, Perdue MH. Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Dig Dis Sci.* 2002;47(1):208-15.
19. Tran L, Chaloner A, Sawalha AH, Greenwood Van-Meerveld B. Importance of epigenetic mechanisms in visceral pain induced by chronic water avoidance stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(6):898-906.
20. Lee UJ, Ackerman AL, Wu A, Zhang R, Leung J, Bradesi S, et al. Chronic psychological stress in high-anxiety rats induces sustained bladder hyperalgesia. *Physiol Behav.* 2015;139:541-8.
21. Mersdorf A, Goldsmith PC, Diederichs W, Padula CA, Lue TF, Fishman IJ, et al. Ultrastructural changes in impotent penile tissue: a comparison of 65 patients. *J Urol.* 1991;145(4):749-58.
22. Ozbilen O. Sıçanlarda Medikal ve Cerrahi Kastrasyon Sonrası Penil Kavernoöz Doku ve Tunika Albugineada Gelişen Histopatolojik Değişiklikler ve Erektile Disfonksiyon Mekanizmasındaki Rolü. *Adana2008.*
23. Bakircioglu ME, Sievert KD, Nunes L, Lau A, Lin CS, Lue TF. Decreased trabecular smooth muscle and caveolin-1

- expression in the penile tissue of aged rats. *J Urol.* 2001;166(2):734-8.
24. Becher EF, Toblli JE, Castronuovo C, Nolzco C, Rosenfeld C, Grosman H, et al. Expression of caveolin-1 in penile cavernosal tissue in a denervated animal model after treatment with sildenafil citrate. *J Sex Med.* 2009;6(6):1587-93.
  25. Bivalacqua TJ, Musicki B, Hsu LL, Berkowitz DE, Champion HC, Burnett AL. Sildenafil citrate-restored eNOS and PDE5 regulation in sickle cell mouse penis prevents priapism via control of oxidative/nitrosative stress. *PLoS One.* 2013;8(7):e68028.
  26. Seftel AD, Saenz de Tejada I, Szetela B, Cole J, Goldstein I. Clozapine-associated priapism: a case report. *J Urol.* 1992;147(1):146-8.
  27. Penson DF, Armstrong AJ, Concepcion R, Agarwal N, Olsson C, Karsh L, et al. Enzalutamide Versus Bicalutamide in Castration-Resistant Prostate Cancer: The STRIVE Trial. *J Clin Oncol.* 2016;34(18):2098-106.
  28. Akingba AG, Burnett AL. Endothelial nitric oxide synthase protein expression, localization, and activity in the penis of the alloxan-induced diabetic rat. *Mol Urol.* 2001;5(4):189-97.
  29. Hurdag C, Ozkara H, Citci S, Uyaner I, Demirci C. The effects of alpha-lipoic acid on nitric oxide synthetase dispersion in penile function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Tissue React.* 2005;27(3):145-50.
  30. Haas CA, Seftel AD, Razmjouei K, Ganz MB, Hampel N, Ferguson K. Erectile dysfunction in aging: upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Urology.* 1998;51(3):516-22.
  31. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* 2002;90:40.
  32. Linder AE, McCluskey LP, Cole KR, 3rd, Lanning KM, Webb RC. Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314(1):9-15.
  33. Esertas K. Subklinik Hipotiroidili Olgularda Simvastatin ve Levotiroksin Replasman Tedavisinin Endotel Disfonksiyonu Üzerindeki Etkilerinin Araştırılma. İstanbul2004.
  34. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271:1424-37.
  35. Rodriguez NC, Urrutia EC, Gertrudis BH, Chaverri JP, Mejia GB. Antioxidant activity of fulvic acid: A living matter-derived bioactive compound. *J Food Agric Environ.* 2011;9(3-4):123-7.
  36. Ak E C-DE, Sehirli AO, Tetik S, Pisiriciler R, Sener G, Cetinel S. Sudan kaçınma stresi uygulanmış erkek sıçan mesanesinde oksitosin etkisi: Işık ve elektron mikroskopik inceleme. *Marmara Pharmaceutical Journal.* 2015;19:19-26.
  37. MacCarthy P PM, Malcolm RL, Thurman EM. . Separation of humic substances by ph gradient desorption from a hydrophobic resin. *Anal Chem.* 1979;51(12):2041-3.
  38. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol.* 2009;16(5):449-57.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Alıntı-Gayriticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

