



1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Üroloji Anabilim Dalı

SIÇAN İZOLE VAJEN VE MESANE DOKULARINDA
RHO-KİNAZ İNHİBİSYONUNA YAŞLILIK VE CERRAHİ
MENOPOZUN ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Alaaddin AKAY

Ankara, 2009



1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Üroloji Anabilim Dalı

SIÇAN İZOLE VAJEN VE MESANE DOKULARINDA
RHO-KİNAZ İNHİBİSYONUNA YAŞLILIK VE CERRAHİ
MENOPOZUN ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Alaaddin AKAY

Tez Danışmanları

Prof. Dr. Levent PEŞKİRCİOĞLU

Doç. Dr. Remzi ERDEM

Ankara, 2009

Özet

Menopoz sonrası genitoüriner sistemde en sık karşılaşılan sorunlar iritatif üriner yakınmalar ve kadın cinsel fonksiyon bozukluklarıdır. Bu yakınmaların oluşmasında düzeyleri değişen seks steroidlerinin mesane ve vajen düz kaslarında meydana getirdikleri fizyolojik değişimler oldukça önemlidir. Düz kas kasılmasında kalsiyum-bağımlı yoldan başka son zamanlarda kalsiyumdan bağımsız bir yolak olan Rho-kinaz yolağı önem kazanmıştır.

Bu çalışmada Rho-kinaz yolağının sıçan izole mesane ve vajen düz kasındaki fizyolojik etkisini ve seks steroidlerindeki değişimin bu yolakla olan ilişkisinin araştırılması hedeflendi. Bu amaçla östrojen düzeyinin düştüğü fizyolojik menopoz (yaşlılık) ve hem östrojen hem de testosteron düzeyinin azaldığı cerrahi menopoz (ooferektomi) grupları kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı.

Çalışmaya, 18'i genç erişkin (7-9 aylık), 6'sı yaşlı (18 ay ve üzeri) olmak üzere 24 adet erişkin dişi Wistar albino sıçan dahil edildi. Sıçanlar dört gruba ayrıldı. Bunlar; 1. Kontrol grubu (7-9 ay), 2. Kontrol cerrahi (sham) grubu, 3. Cerrahi menopoz (bilateral ooferektomi) grubu ve 4. İleri yaş (18 ay ve üzeri) grubu, olarak belirlendi. Cerrahi menopoz grubundaki sıçanlara bilateral ooferektomi yapılırken, kontrol cerrahi grubunda ise overler gözlendi ancak herhangi bir girişim yapılmaksızın batin tekrar kapatıldı. Cerrahi menopoz ve sham gruplarının 4 haftalık takibinden sonra tüm sıçanlar sakrifiye edildi. Vajen ve mesane dokularından izole edilen düz kas preparatlarında, Rho-kinaz antagonisti Y-27632 ve çeşitli farmakolojik ajanların etkileri izole organ banyosu sisteminde incelendi. Vajen şeritlerine, mesane şeritlerinden farklı olarak elektriksel alan uyarımı uygulanarak sinirsel aracılı uyarımının fizyolojik yanıtları araştırıldı.

Prekontrakte vajen ve mesane düz kaslarında Y-27632 ile konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları gözlendi. Her iki dokuda da genç, sham ve yaşlı gruplar arasında gevşeme yanıtlarında anlamlı fark görülmezken, cerrahi menopoz grubu ile genç grubu arasında yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin olmak üzere anlamlı fark gözlendi. Sempatik, parasempatik ve nitretrjik yolakların blokajı sonrası Y-27632 ile oluşturulan gevşeme yanıtları genç, sham ve yaşlı gruplarda vajende bir miktar artarken mesanede azaldı. Her iki dokuda ooferektomi grubunda değişiklik gözlenmedi. Vajen dokusunda elektriksel alan

uyarımı(EAU) yanıtlarını trifazik olarak gözlemlendi. Öncesinde gevşeme, ardından bir kasılma ve “off” yanıtı gözlemlendi. Vajen dokusunda EAU genç grupta yaşlı ve cerrahi menopoz gruplarına göre daha fazla gevşeme oluşturdu. Fakat tüm gruplarda benzer kasılma yanıtlarına neden oldu.

Bu bulgular vajen ve mesane dokusunda Ca^{2+} dan bağımsız kasılmaya yol açan Rho-kinaz aktivitesinin varlığını düşündürmektedir. Bu çalışmada elde edilen ve Rho-kinaz aktivitesinin fizyolojik menepoz durumunda değişmediğini, oysa cerrahi menopoz durumunda arttığını işaret eden bulgular, testosteronun Rho-kinaz üzerinde baskılayıcı yönde tonik bir etkisinin olabileceğini düşündürdü. Seks steroidlerinin yanı sıra mesanede nitrik oksit (NO) düzeyinin azalması da Rho-kinaz aktivitesinin artışına yol açarken, vajende NO Rho-kinaz yolları arasında böyle bir etkileşim görülmemiştir.

Bu çalışmadan elde edilen bulguların ileri deneysel ve klinik çalışmalarda desteklenmesi halinde spesifik Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 kullanılarak veya testosteron düzeyi düşük hastalarda testosteron replasmanı yapıp, Rho-kinaz aktivitesi azaltılarak, iritatif üriner semptomlarda ve cinsel disfonksiyonda düzelme olabileceği söylenebilir.

Summary

Irritative urinary complaints and female sexual dysfunction are the most common genitourinary problems in the postmenopausal period. Physiological changes in the bladder and vaginal smooth muscles which occur due to alterations in the levels of sex steroids are very important causative factors for these complaints. In recent years, beside the calcium-dependent pathway, a calcium-independent pathway named as “Rho-kinase pathway”-gained importance in smooth muscle contraction.

In this study, the aim was to investigate the physiological effect of Rho-kinase pathway in isolated bladder and vaginal smooth muscles of rat and to show the relationship between this pathway and alterations of the the levels of sex-steroids. For this purpose, physiological menopause (elderly) group in which estrogen levels decrease and surgical menopause (ooforectomy) groups in which both estrogen and testosterone levels decrease are compared with control groups.

In this study 24 adult female Wistar albino rats were involved. Eighteen of them were young adults (7-9 months of age) and 6 of them were elderly (18 months of age and older). Rats were divided into four groups; as: 1. Control group (7-9 months), 2. Control surgery (sham) groups, 3. Surgical menopause (bilateral ooforectomy), 4. Advanced age group (18 months and older). Bilateral ooforectomy was performed to surgical menopause group and only ovaries were exposed without any intervention and then abdomen was closed in the control surgery group. All rats were sacrificed after a follow-up of 4 weeks in the sham and surgical menopause groups. The effects of Y-27632 which is a Rho-kinase antagonist and other pharmacological agents on smooth muscle slides isolated from vagina and bladder tissues were investigated in isolated organ bath. Physiological responses of neuronal mediated stimulation were also studies by electrical field stimulation application in vaginal bands, but not in bladder bands.

Concentration-dependent relaxation responses to Y-27632 was observed in pre-contracted vaginal and bladder smooth muscles. There was statistically no significant difference in relaxation responses between young, sham and elderly groups in both tissues; where as, the difference was significant between surgical menopause and young groups, more prominent

in higher concentrations. After the blockage of sympathetic, parasympathetic and nitregeric pathways, relaxation responses induced by Y-27632 while increasing in vagina a bit, decreased in bladder in young, sham and elderly groups. There was no difference in ooferectomy group in both tissues. We observed the electrical field stimulation (EFS) responses in vaginal tissue as triphasic. Relaxation at the beginning, followed by a contraction and an “*off response*” were observed. In vaginal tissue, EFS produced more relaxation in young group compared to elderly and surgical menopause groups. But it caused similar contraction responses in all groups.

These findings give rise to the thought of presence of Rho-kinase activity, causing Ca^{2+} -independent contraction in vaginal and bladder tissues. The results of this study implying that Rho-kinase activity does not change in physiological menopause, where as increases in surgical menopause pointed a suppressive tonic effect of testosterone on Rho-kinase. Beside sex steroids, decrease in nitric-oxide (NO) levels improved Rho-kinase activity in bladder, but such an interaction couldn't be determined between NO and Rho-kinase pathways in vagina.

If the findings of this study are supported by further experimental and clinical studies, improvement in irritative urinary symptoms and sexual dysfunction could be achieved by using the specific Rho-kinase inhibitor Y-27632 or by testosterone replacement in patients with low testosterone levels.

İçindekiler

Özet.....	iii
Summary.....	v
İçindekiler.....	vii
Kısaltmalar	ix
Şekiller ve Tablo Dizini.....	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Düz Kaz Fizyolojisi	3
2.2 RhoA ve Rho-Kinaz	4
2.2.1 Rho Proteinleri.....	4
2.2.2 Rho- Kinaz.....	4
2.2.3 Rho/Rho-Kinaz Aktivitesinin Düzenlenmesi	5
2.2.4 Selektif Rho-Kinaz İnhibitörü: Y-27632.....	6
2.2.5 Rho/Rho-Kinaz Yolağının Vasküler Dokudaki Fonksiyonu.....	7
2.2.6 Rho/Rho-Kinaz Yolağının Kavernozal Dokudaki Fonksiyonu.....	8
2.3 Kadınlarda Genital Uyarılma Fizyolojisi	10
2.3.1 Genital Uyarılma Yanıtı	11
2.3.2 Genital Yanıtı Düzenleyen Nörotransmitterler.....	13
2.3.3 Kadınlarda Genital Uyarılmanın Seks Steroidleri Tarafından Düzenlenmesi	15
2.4 Mesane Uyarım Fizyolojisi	19
2.4.1 Mesane ve Muskarinik Reseptörler	19
2.4.2 Mesane ve β -Adrenoseptörler.....	20
2.4.3 Mesane ve α -Adrenoseptörler.....	20
2.4.4 Mesane ve Nitrik oksit.....	21
2.4.5 Mesane ve Afferent Nöropeptidler.....	22
2.4.6 Mesane ve Diğer Nöropeptidler	22
2.4.7 Mesane ve Prostaglandinler, Endotelinler	22
2.4.8 Mesane ve Seks Steroidleri.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1 Deney Hayvanları	24

3.2 Ön Deney Aşaması	25
3.3 Deneyle Sırasında Kullanılan Anestezi.....	25
3.4 Cerrahi Menopoz Oluşturulması	25
3.5 Sham grubunda yapılan işlemler	26
3.6 Cerrahi Sonrası	26
3.7 İzole Distal Vajen ve Mesane Düz Kas Preparatlarının Hazırlanması.....	26
3.8 İzole Organ Banyosu Sistemi	29
3.9 Elektriksel Alan Uyarımı.....	29
3.10 Kullanılan Farmakolojik Ajanlar ve Solüsyonlar.....	31
3.11 Deney Protokolleri.....	31
3.11.1 Elektriksel Alan Uyarım Yanıtları.....	31
3.11.2 Vajen ve Mesane Dokularında Y-27632 ile Elde Edilen Konsantrasyon- Bağımlı Yanıtlar	32
3.12 İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
4.1. Y-27632 yanıtları.....	34
4.1.1: Vajen Dokusunda Y-27632 Yanıtları	34
4.1.2 Mesane Dokusunda Y-27632 Yanıtları	38
4.2 Elektriksel Alan Uyarım Yanıtları.....	41
4.2.1 Bazal Gerimdeki Sıçan İzole Vajen Düz Kasında EAU'nun Etkisi.....	41
4.2.2 Prekontrakte Sıçan İzole Vajen Düz Kasında EAU'nun Etkisi.....	44
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	56

Kısaltmalar

- ATP:** Adenozin trifosfat
Ca²⁺: Kalsiyum
CPI-17: 17 kDa Protein kinaz C
DAG: Diaçil gliserol
DHEA: Dehidroepiandrosteron
EAU: Elektriksel Alan Uyarımı
ET: Endotelin
eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz
GAP: GTPaz aktive edici protein
GDI: GTPaz ayırıcı inhibitörler
GDP: Guanozindifosfat
GEF: Guanin nükleotid değiştirici faktör
GPCR: G protein kenetli reseptör
GTP: Guanozintrifosfat
IP₃: İnositol 3 fosfat
İKB: İtrakavernozal basınç
i.p.: İnterperitoneal
L-NAME: Nitro-L-Arjinin Metil Ester
MHZ: Myozin hafif zincir
MHZP: Miyozin hafif zincir fosfat
NA: Noradrenalin
NANC: Nonadrenerjik-nonkolinerjik
nNOS: Nitrik Oksit Sentaz
NO: Nitrik oksit
NOS: Nöronal nitrik oksit sentaz
PDE5: Fosfodiesteraz tip 5
PIP₂: Fosfoinozitol (4,5) bifosfat
PKC: Protein Kinaz C
PLC: Fosfolipaz C
SIP: Sfingozin 1-fosfat
VIP: Vazoaktif İntestinal Polipeptit

Şekiller ve Tablo Dizini

Şekil 2.1: Ca ²⁺ -bağımlı ve Ca ²⁺ -bağımsız düz kas kasılması	6
Şekil 2.2: Rho-Kinaz inhibitörlerinin terapötik hedefleri.....	7
Şekil 3.1: Soldaki resim: dişi sıçanda, üretral me, introitus ve anüs; sağdaki resim: sıçanda mesane	26
Şekil 3.2. Dişi sıçanda intraoitusun çevresine yapılan sirküler insizyon ve üretranın izolasyonu.....	27
Şekil 3.3. Dişi sıçanda vajinal kanalla rektum arasına yapılan künt diseksiyon	28
Şekil 3.4. Dişi sıçanda genitoüriner organların anatomik yerleşimi ve vajenden sirküler kesit hazırlanması	28
Şekil 4.1. Fenilefrin (10 ⁻⁵ M) ile prekontrakte olan sıçan izole vajen dokusunda Y-27632 ile gözlenen gevşeme yanıtlarını gösteren örnek traseler.....	34
Şekil 4.2. Fenilefrin (10 ⁻⁵ M) ile prekontrakte edilen sıçan izole vajen dokusunda Y-27632 ile oluşan konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları.	35
Şekil 4.3. Fenilefrin (10 ⁻⁵ M), ile prekontrakte edilen sıçan izole vajen dokusunda Y- 27632 ile oluşan konsantrasyon-bağımlı gevşemeler üzerinde guanetidin (10 ⁻⁵ M) + atropin (10 ⁻⁵ M) + L-NAME (10 ⁻³ M) preinkübasyonları ile adrenerjik, kolinerjik ve nitreerjik sistemlerin inhibisyonunun etkisi.	36
Şekil 4.4. Fenilefrin (10 ⁻⁵ M) ile prekontrakte edilen sıçan izole vajen dokusunda Y-27632 ile oluşan konsantrasyon-bağımlı gevşemeler (gruplar-1) üzerine guanetidin (10 ⁻⁵ M) + atropin (10 ⁻⁵ M) + L-NAME (10 ⁻³ M) preinkübasyonlarının (gruplar-2) etkisi.	37
Şekil 4.5. Sıçan izole mesane dokusunda karbakol (10 ⁻⁵ M) ile oluşturulan ön-kasılma üzerinde Y-27632 ile meydana gelen konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları.	38
Şekil 4.6. Karbakol (10 ⁻⁵ M) ile prekontrakte edilen sıçan izole mesane dokusunda Y- 27632 ile oluşan konsantrasyon-bağımlı gevşemeler üzerinde heksametyum (10 ⁻⁵ M) ve L-NAME (10 ⁻³ M) preinkübasyonlarının etkisi.....	39
Şekil 4.7. Karbakol (10 ⁻⁵ M) ile prekontrakte edilen sıçan izole mesane dokusunda Y- 27632 ile oluşan konsantrasyon-bağımlı gevşemeler (gruplar-1) üzerine heksametyum (10 ⁻⁵ M) ve L-NAME (10 ⁻³ M) preinkübasyonlarının (gruplar-2) etkisi.....	40
Şekil 4.8. Bazal gerim (istirahat gerimi) altındaki sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan izometrik gerim değişikliklerini gösteren örnek trase.....	41
Şekil 4.9. Bazal gerim (istirahat gerimi) altındaki sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan gevşeme yanıtları	42

Şekil 4.10. Bazal gerim (istirahat gerimi) altındaki sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan kasılma yanıtları	43
Şekil 4.11. Bazal gerim (istirahat gerimi) altındaki sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan <i>off</i> yanıtları.	44
Şekil 4.12. FE (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen sıçan izole vajen düz kasında EAU ile oluşan izometrik gerim değişikliklerini gösteren örnek trase.....	44
Şekil 4.13. Fenilefrin (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan gevşeme yanıtları.	45
Şekil 4.14. Fenilefrin (10^{-5} M) ile prekontakte edilen sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan kasılma yanıtları.	46
Şekil 4.15. Fenilefrin (10^{-5} M) ile prekontakte edilen sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan <i>off</i> yanıtları.	47
Tablo 2.1: Mesanede adrenerjik ve kolinerjik reseptörlerin yerleşimi ve düz kastaki etkisi	21

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kadın cinsel fonksiyon bozukluğu ve irritatif üriner yakınmalar postmenopozal dönemde genitoüriner sistemde sık karşılaşılan sorunlardır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada 50 ile 74 yaş arasındaki 9,7 milyon kadında azalmış vajinal kayganlaşma (lubrikasyon), cinsel ilişki sırasında ağrı ve rahatsızlık, azalmış cinsel uyarılma (*arousal*) ve orgazma ulaşmada güçlük gibi, cinsel fonksiyonlarda bozulma bulunduğu belirtilmiştir (1). Postmenopozal irritatif semptom oranının ise % 49 gibi oldukça yüksek olduğu ifade edilmiştir (2).

Kadınlarda genital ve alt üriner sistemi oluşturan pelvik bölge, üretra, mesane ve vajen, taşıdıkları steroid reseptörleri nedeniyle seks steroidlerine karşı duyarlıdır. Bunun muhtemel sebebi embriyolojik farklılaşma sırasında iki sistemin organları arasındaki yakın ilişkidir. Kadın yaşamında seks steroid düzeylerindeki değişimin en belirgin olduğu dönem şüphesiz ki menopozal dönemdir. Bu dönem fizyolojik olarak meydana gelebileceği gibi endometriozis, meme ve endometriumun östrojene duyarlı neoplazilerinde tedavi amacıyla yapılan oofektomi veya radyasyon tedavisiyle de ortaya çıkabilir. Cerrahi menopoz fizyolojik açıdan metabolizmada ciddi bir strese neden olmaktadır. Kastre edilen kadında overlerin çıkartılmasına bağlı olarak sadece östrojen düzeyi değil, aynı zamanda androjen düzeylerinde de düşüş meydana gelir (3). Steroid hormonlar genital dokuların yapısı ve fonksiyonunun sürdürülmesi için gerekmektedir ve genital cinsel cevabın oluşmasında (genital kan akımı, ıslanma, musifikasyon, duyarlılık) önemli role sahiptir.

Postmenopozal dönemde görülen bu yakınmalardan, seks steroidlerinin santral sinir sistemindeki etkilerinin yanı sıra vajen ve mesane düz kasında meydana getirdikleri morfolojik değişiklikler ve bu düz kasların işlevselliğini sağlayan nörotransmitterlerin düzenlenmesindeki etkilerinin olduğu anlaşılmıştır (4).

Düz kasta kasılma için hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) düzeyinde artış olması gerekmektedir. Düz kas kasılma fizyolojisinde bu Ca^{2+} -bağımlı mekanizmadan başka ikinci bir mekanizmanın olduğunu ve bunun hücre içi Ca^{2+} artışından bağımsız olarak kasılmaya yol açtığı gösterilmiştir (5). Bu yolak hücre membranında bulunan ve küçük G proteinlerinden olan Rho ve onun hücre içi efektörü olan Rho kinaz enzimidir (5). Bu yolak hücre içi Ca^{2+}

artışına gerek olmadan Ca^{2+} duyarlılığında artışa yol açarak düz kasın kasılmasını sağlamaktadır. Birçok dokuda düz kaslarda Rho proteinleri gösterilmiş ve farmakolojik ajanlara yanıtı incelenmiştir. Bu dokuların başında vasküler ve penil kavernozaal düz kaslar gelmektedir (6). Araştırmacılar ilerleyen yaşla birlikte artan vasküler hastalıklarda ve erkek cinsel disfonksiyonunun etyolojisinde yer alan hipertansiyon, diyabetes mellitus, hipogonadizm gibi tablolarda Rho kinaz aktivitesindeki artışın sorumlu olabileceğini belirtmektedirler (7).

Literatürde Rho-kinaz yolağının erkek cinsel işlevi ile olan ilişkisi hakkında, büyük bir kısmı son yıllarda yapılan birçok çalışma mevcutken kadın cinsel işlevi ile olan ilişkisini inceleyen oldukça az yayın vardır. Vasküler ve kavernozaal düz kaslarda, yaşlanmayla aktivasyonunun arttığı gösterilen Rho-kinaz yolağının sıçan vajen ve mesane düz kaslarında da ileri yaş ve cerrahi menopozla aktivitesinin arttığı hipotezi kurulabilir. Bu çalışmanın amacı, sıçan vajen ve mesane düz kaslarında Rho-kinaz yolağının fonksiyonel etkilerini ve seks steroidlerinin bu yolağın aktivasyonu üzerindeki etkileşimini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Düz Kas Fizyolojisi

Vasküler düz kas kontraksiyonu myozin hafif zincirinin (MHZ) fosforilasyonuna bağlıdır. Vazokonstriktör ligand bağlanması fosfotidil inozitol kaskadını aktive ederek sarkoplazmik retikulumda depolanan kalsiyumun (Ca^{2+}) salıverilmesinin yanı sıra, membrandaki Ca^{2+} kanallarının açılmasına neden olarak sitozolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonunu artırır (5). Hücre içinde konsantrasyonu artan Ca^{2+} , kalmoduline bağlanır ve sonuçta oluşan Ca^{2+} -kalmodulin kompleksi myozin hafif zincir kinazı aktive eder. Aktive olan MHZ kinaz, aktinin myozin-ATPazı indüklemesine ve sonuçta düz kasın kasılmasına yol açan MHZ'yi fosforile eder. MHZ fosfataz, fosfatın ortadan kaldırılmasından sorumludur ve nonfosforile durumda myozin çapraz bağı ayrılır ve gevşeme meydana gelir. Kontraktıl agonistlerin MHZ kinazı aktive etmelerine ve kontraksiyon oluşturmalarına ek olarak MHZ fosfatazı inhibe edip etmedikleri henüz net olarak bilinmemektedir (8). MHZ kinaz ve MHZ fosfatazın aktiviteleri arasındaki denge düz kaslarda kasılma ve gevşeme durumunu belirler.

Bununla birlikte vasküler düz kasta Ca^{2+} ve agonistler ile indüklenen güç üretimi arasındaki ilişkinin basit olmadığını gösteren ve agonist ile indüklenen düz kas aktivasyonu sırasında da aktive edilebilen Ca^{2+} 'dan bağımsız bir düzenlemeyi ileri süren çalışmalar vardır (9). Ca^{2+} indikatörleri kullanılarak hücre içi kalsiyum düzeyi ölçüldüğünde Ca^{2+} konsantrasyonunun, MHZ fosforilasyonu ve düz kas kasılmasıyla her zaman paralel olmadığı görülmüştür (10). Sitozolik Ca^{2+} artışına ilave olarak, vazokonstriktör ajanlar Ca^{2+} sensitizasyonu gibi, bu Ca^{2+} 'dan bağımsız mekanizmayı da aktive edebilirler. Ca^{2+} sensitizasyonu ile oluşan kasılma yanıtı MHZ fosfataz aktivitesinin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. MHZ fosfataz aktivitesi azaldığında Ca^{2+} 'nin orta-düşük düzeylerinde dahi kasılma oluşmakta ve MHZ fosforilasyon oranında net bir artış görülmektedir. Çalışmalar GTP bağlayıcı bir protein olan Rho'nun agonist aracılı Ca^{2+} duyarlılığında yer aldığını ortaya çıkarmıştır. Rho proteinleri bu etkiyi *downstream* efektörleri olan *Rho-associated kinase* (Rho-kinaz) enzimi aracılığıyla oluşturmaktadırlar (10, 11).

2.2 RhoA ve Rho-Kinaz

2.2.1 Rho Proteinleri

Küçük G proteinleri, moleküler kütleleri 20-40 kilodalton olan monomerik G proteinlerdir. Memeli Rho ailesi en az 10 farklı üyeden oluşur. Bunlar; Rho izoformları olan RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG; Rac izoformları olan Rac1, Rac2; Cdc42 izoformu ve TC10 izoformudur (11). RhoA, RhoB ve RhoC'nin efektör bölgeleri aynı aminoasit dizilimine sahiptirler ve bu GTP'az proteinlerinin hücrel fonksiyonları benzerdir. Rho'nun açıklanan birçok fonksiyonu RhoA ile yapılan çalışmalara dayanmaktadır (11). RhoA, vücutta en fazla bulunan ve üzerinde en çok çalışılan bir Rho proteini alt tipidir (8, 9). Rho proteinleri, başlıca hücre iskeleti kontrolünden, stres liflerinin yapılanmasından, fibroblastların fokal adezyonundan ve düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlılığının düzenlenmesinden sorumludurlar (14, 15). Ayrıca, aktin iskeletinin yapılanmasını sağlayarak hücrenin şekli, motilitesi, adezyonu, göçü, kasılması ve sitokenezis gibi birçok hücrel fonksiyonda önemli rol oynarlar (16).

2.2.2 Rho- Kinaz

Yaklaşık 1388 aminoasit dizisinden oluşur. Bu dizide, amino (N) ve karboksil (C) uçları bulunmaktadır. Rho-kinaz aynı zamanda ROCK α veya ROCK2 olarak isimlendirilir. ROCK β (aynı zamanda ROCK1 olarak da isimlendirilir) Rho-kinazın bir izoformudur (11, 17). İnsanda ROCK1 ve ROCK2 genleri sırasıyla 18. kromozom (18q11.1) ve 2. kromozomda (2p24) yer almaktadır (18). Rho-kinaz enziminin vasküler düz kas hücrelerinde Ca^{2+} duyarlılığında rol aldığı bildirilmiştir (15). ROCK2'nin beyin ve kalpte, ROCK1'in ise akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve testiste daha fazla eksprese edildiği bildirilmiştir. Rho-kinaz enziminin birçok dokuda varlığı gösterilmiştir (11,18, 20, 21, 22).

Rho-kinazın N-terminalinde kinaz bölgesi vardır. Orta bölgesinde kuramsal, kangal gibi kıvrılmış (*coiled-coil*) bölge ve C-terminal bölgesinde plekstrin homoloji bölgesi vardır. Aktive olmuş Rho, kangal gibi kıvrılmış bölgenin C-terminal parçasıyla etkileşerek Rho-kinazın kinaz bölgesini aktive eder (23). Bu olay sonucu aktive olan Rho-kinaz hücre içindeki substratlarını fosforile ederek çeşitli hücre içi olaylara katılır. Vasküler düz kas hücrelerinin agonistle indüklenen kasılmasında MHZ'nin fosforilasyon derecesi kasılma gücü için hayati bir basamaktır. MHZ fosforilasyonunun miktarı Ca^{2+} -kalmodulin-bağımlı MHZ kinaz ve myozin fosfataz arasındaki dengeye bağlıdır (24). Myozin fosfataz

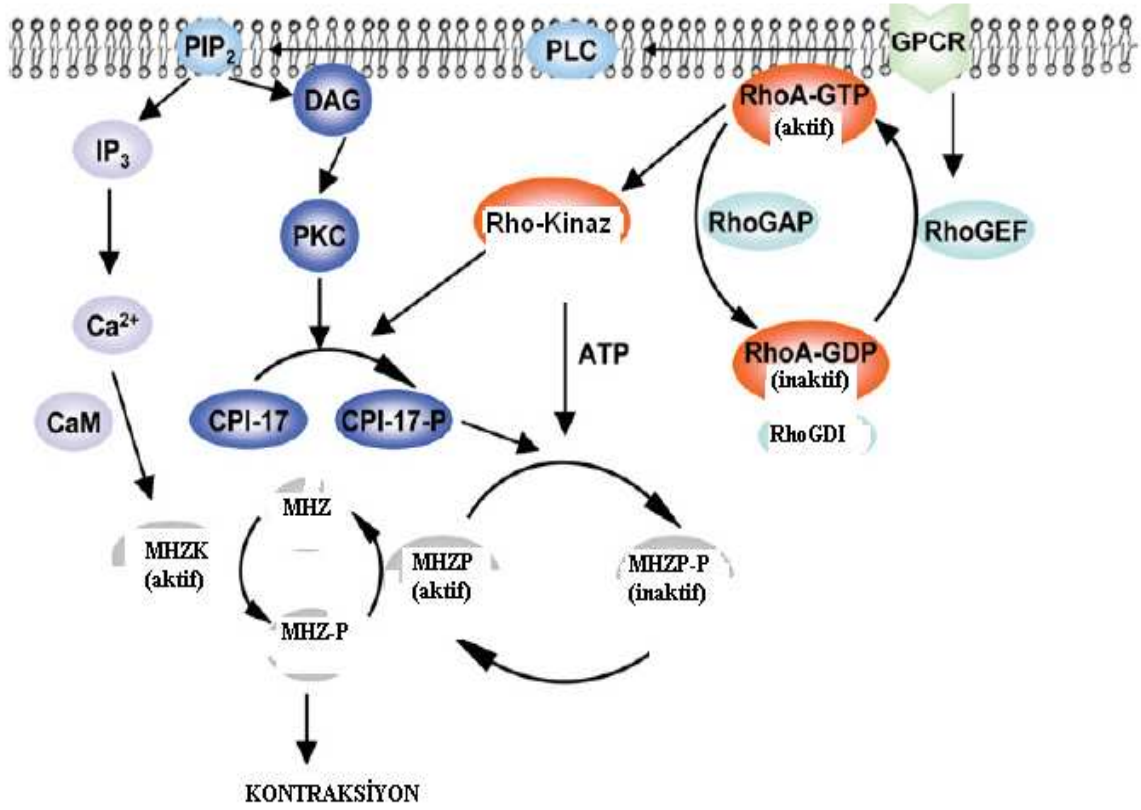
vasküler tonüs, kan basıncının kontrolü, gastrointestinal motilite, havayolu direnci, erektil fonksiyon, uterin kasılmalar gibi düz kas fonksiyonlarını düzenler (24).

2.2.3 Rho/Rho-Kinaz Aktivitesinin Düzenlenmesi

Küçük G proteinleri diğer G proteinleri gibi guanozindifosfat (GDP) ve guanozintrifosfat (GTP) ile spesifik etkileşme ve GTP'az aktivitesi için sorumlu aminoasit dizilimine sahiptirler (17). Ektörleri ile etkileşmek için de ayrı bir bölgeye sahiptirler. Sentezlendikten sonra lipitler ile posttranslasyonel değişikliklere gereksinim duyarlar. Bu lipit yapıları genellikle, palmitoil, farnesil ve geranilgeranil'dir. Küçük G proteinlerinin lipit modifikasyonu, bunların membrana ve düzenleyicilere bağlanmaları ve alt ektörlerini aktive edebilmeleri için gereklidir (27). Rho'nun aktive olabilmesi için geranilgeranile olmuş C-terminal ucu ile membrana tutunması gerekir. Küçük G proteinlerinin GDP-bağlı inaktif ve GTP-bağlı aktif olmak üzere, birbirine dönüşebilen iki formu vardır. Bu dönüşüm üç grup protein tarafından düzenlenir. Bunlar;

- 1- GTPaz aktive edici proteinler (GAPs, Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini artırarak GTP bağlı Rho'nun inaktivasyonunu kolaylaştırır),
- 2- GTPaz ayırıcı inhibitörler (GDIs, Rho ailesi GTPazlarının membrana bağlanmalarını inhibe eder. Nükleotid ayrılmasını ve böylece aktivasyonunu önler),
- 3- Guanin nükleotid değiştirici faktördür. (GEF, inaktif GDP-Rho'yu aktif GTP-Rho'ya dönüştürür).

İstirahattaki hücrelerde Rho-GDP disosiyasyon inhibitörü (Rho-GDI), GDP-Rho'ya bağlanır ve onu membrandan sökerek sitozole getirir. Hücreler bazı agonistlerle stimüle edilirse Rho-spesifik GEF'ler GDP ayrışmasını ve ardından GTP bağlanmasını başlatarak Rho'nun aktivasyonunu artırır. Bundan sonra GTP-Rho C-terminali geranil geranillenmiş kuyruğuyla hücre membranına hedeflenir ve spesifik hedefleriyle etkileşir (16). Günümüzde RhoGEF proteinleri Rho aktivitesinin ana düzenleyicisi olarak görülmektedir. GEF aktivitesinin protein kinazlar, fosfotidil inozitol kinazlar gibi çeşitli sinyal molekülleri tarafından veya dimerizasyonla düzenlendiği düşünülmektedir (23). Rho aktivitesi, aynı zamanda G proteini ile kenetli reseptörler (G_{12} ve G_{13}) tarafından da düzenlenir. Bu reseptörler düz kaslarda oldukça yaygın bulunurlar ve G proteinine bağlanarak RhoA'nın aktivasyonunu sağlarlar (26).



Şekil 2.1: Ca²⁺-bağımlı ve Ca²⁺-bağımsız düz kas kasılması

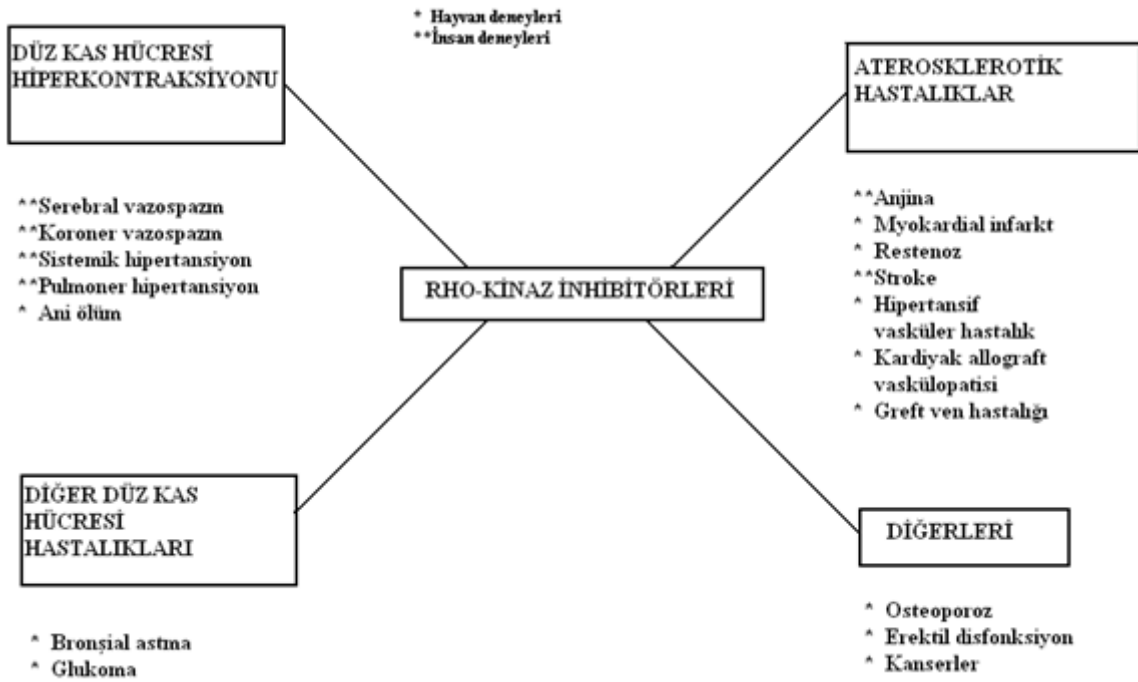
G proteini ile kenetli reseptörler (GPCR), Ca²⁺-bağımlı ve Ca²⁺-bağımsız kasılma yollarının her ikisini de uyarır. PLC, PIP₂'yi IP₃ ve DAG'a katalize eder. IP₃ hücre içi Ca²⁺ düzeyini artırarak Ca²⁺-CaM kompleksi oluşturur ve oluşan bu kompleks MHZK'yi aktive eder. MHZK, MHZ'i fosforile eder ve düz kas kasılmasına yol açar. DAG aktivasyonu sonrası, PKC, CPI-17'yi fosforiler. CPI-17, MHZP'ın katalitik alt-birimine karşı yüksek afiniteye sahiptir ve MHZP'yi fosforilleyerek inaktif hale çevirir. Kalsiyum-bağımsız yolda, aktive olan GPCR, RhoGEF'i uyarır. RhoGEF, inaktif RhoA-GDP'yi aktif RhoA-GTP haline çevirir. Aktive olan RhoA-GTP hücre membranından hücre içine doğru yer değiştirir. Takiben, Rho-kinaz, MHZP'yi fosforiler ve inaktif hale gelmesini sağlar. Aynı zamanda Rho-kinaz CPI-17'yi de fosforiler. Bu sırada RhoGAP'ta RhoA-GTP'yi RhoA-GDP'ye çevirerek inaktif formuna geçmesini sağlar. PLC: fosfolipaz C, PIP₂: fosfoinositol (4,5) bifosfat, DAG: diaçil gliserol, PKC: Protein Kinaz C, IP₃: inositol 3 fosfat, MHZ: Miyozin hafif zincir, MHZP: Miyozin hafif zincir fosfat, CPI-17: 17 kDa PKC, GPCR: G proteini ile kenetli reseptör, Rho GDI: Rho GDP disosiyasyon inhibitörü, RhoA GDP: RhoA guanozin iki fosfat, RhoA GTP: RhoA guanozin üç fosfat, RhoGEF: Rho-Guanin nükleotid değişim proteini, RhoGAP: Rho-GTPaz aktive edici protein, CaM: Kalmolulin. Jin ve Burbett (28)' den alınmıştır.

2.2.4 Selektif Rho-Kinaz İnhibitörü: Y-27632

Y-27632:(+)-R-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4 pyridil) cyclohexane carboxamide dihydrochloride) ROCK ailesinin selektif sentetik yapıda bir inhibitörüdür (27). Bu Rho-kinaz inhibitörü, agoniste bağlı düz kas kontraksiyonunu –kalsiyum sensitizasyonunu engelleyerek- inhibe eder. Y-27632, ROCK ailesine ait kinazları diğer kinazlardan (protein kinaz C, cAMP kinaz) çok daha güçlü biçimde inhibe eder (24). Y-27632'nin Rho-kinaza olan afinitesi ROCK ailesinin üyesi olan protein kinaz ve sitron kinaza göre en az 20-30 kez daha fazladır. Y-27632, Rho-kinaz'da ATP bağlayıcı bölgeye bağlanmak için ATP ile yarışır ve bu yolla fosforilasyonu ve böylece MHZ fosfatının inaktivasyonunu önler.

Y-27632 varlığında, düz kas gevşemesini artırmak için MHZ fosfatazın defosforile olmasına yönelik MHZ fosfataz aktive olur.

Y-27632'nin düz kas gevşemesi, hücre proliferasyonunun inhibisyonu, tümör invazyonunun inhibisyonu, hücre transformasyonunun inhibisyonu ve anyon kanallarının aktivasyonu gibi birçok hücreyel reaksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir (22). Y-27632'nin gastrointestinal, vasküler ve bronşiyal düz kaslarda; uyarılara bağlı kasılmaları *in vitro* ve *in vivo* ortamda düz kas kontraksiyonunu inhibe ederek engellediği pek çok çalışmada gösterilmiştir (26, 27). Uehata ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Y-27632'nin sistemik uygulanmasının hipertansif sıçanlarda kan basıncı düşürürken, normotansif sıçanlarda sistemik kan basıncında değişikliğe yol açmadığını gözlemlemişlerdir (29).



Şekil 2.2: Rho-Kinaz inhibitörlerinin terapötik hedefleri. Shimokawa ve arkadaşlarından alınmıştır (25).

2.2.5 Rho/Rho-Kinaz Yolağının Vasküler Dokudaki Fonksiyonu

Noradrenalin, anjiotensin II, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve serotonin gibi çeşitli vazoaktif ajanlar Rho kinaz sinyal yolağını aktive ederler (30). Bu bakımdan, Rho kinaz yolağının vasküler lezyonların gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Rho-kinaz inhibitörleri ile uzun süre tedavi sonucunda vasküler düz kas hücresinde fibroblast

proliferasyonu, migrasyonu ve inflamatuvar hücrelerin vasküler duvarlara göçü gibi kritik basamakları inhibe etmesi olasıdır. Rho-kinaz sinyal yolağı sadece hipertansif vaskülopatide değil, aynı zamanda diğer vasküler hastalıklarda da yer alır.

Sıçan aortasında yapılan bir çalışmada, Y-27632'nin endoteli intakt dokularda fenilefrin ile oluşturulan kasılmaları, endotelsiz olanlara göre nisbeten daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (28). Ayrıca sodyum nitroprussiyatın fenilefrinle indüklenen RhoA translokasyonunu geri çevirdiği bulunmuştur. Buna karşın, endoteli sağlam aorta halkalarında, nitrik oksit sentaz inhibitörleri ve guanilat siklaz inhibitörleri varlığında, fenilefrin kasılmalarının Y-27632'ye verdiği gevşeme yanıtları küntleşmiştir (30). Bütün bu bulgular, intakt sıçan aortasında nitrik oksidin Rho-kinazın kastırıcı aktivitesini inhibe ederek gevşeme oluşturduğunu göstermektedir (29).

RhoA ve mitojenle aktive olan kinaz gibi birkaç intrasellüler sinyal yolağının, sfingozin 1-fosfat (SIP) ile aktive edildiği bulunmuştur. SIP, aktive olmuş trombositlerden salıverilen bir lipittir. Vasküler düz kas hücre kültürlerinde SIP sinyalinin, proliferatif cevapları uyardığı gösterilmiştir. Diğer taraftan Rho-kinaz'ın aracılık ettiği Ca^{2+} duyarlılaşmasında, sfingozil fosforilkolinin yeni bir ikincil yolak olduğu bulunmuştur (32, 33)

Rho kinaz aktivitesini spesifik olarak inhibe eden problemlerin kullanılmasıyla hayvan modellerinde Rho/Rho-kinaz yolağı bazukluklarının sıklıkla ölüme neden olan hipertansiyon, vasküler spazm ve arteriyosklerozun ana nedeni olduğu gösterilmiştir. Ca^{2+} -bağımlı kastırıcı mekanizmaları hedef alan Ca^{2+} kanal blokörlerine ek olarak, spesifik Rho-kinaz inhibitörleri ile Rho/Rho-kinaz yolağının düzenlenmesi düz kası, gevşetmek için yeni bir yaklaşım olabilir.

2.2.6 Rho/Rho-Kinaz Yolağının Kavernozaal Dokudaki Fonksiyonu

Penil kavernozaal doku düz kas hücrelerinde Rho-kinaz sinyal yolunun belirgin aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Rho kinaz varlığını göstermek için Western blotlama, immünohistokimyasal ve Y-27632 kullanılmıştır (33, 34, 35). Korpus kavernozaal doku hem $ROCK\alpha$ hem de $ROCK\beta$ izoformlarının varlığı gösterilmiştir (38). Chitale ve arkadaşları sıçan penil kavernozaal sinüsleri içine Y-27632 enjeksiyonu ile konsantrasyon-bağımlı olarak intrakavernozaal basınçta (İKB) artış ve ereksiyon olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, NO sentaz inhibitörü L-NAME ve guanilat siklaz inhibitörü ODQ'nun dokuya

eklenmesiyle, Y-27632'nin vazodilatör etkinliğinin değişmemesini, yazarlar Y-27632'nin etkisinin NO'dan bağımsız olduğu biçiminde yorumlamışlardır. Çeşitli çalışmalarda fenilefrin veya endotelin (ET)-1 ile kasılmış insan, tavşan veya sıçan kavernoöz doku şeritlerinde Y-27632'nin ilavesiyle konsantrasyon-bağımlı şekilde gevşeme yanıtları gözlenmiştir (33). Yine Chitaley ve arkadaşları kavernoözal dolaşımında vazokonstriksiyonun devamında Rho-kinaz yolunun kritik öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir. Mills ve arkadaşları ise Y-27632 uygulanmasından hemen önce ve hemen sonra bir NO donörünün intrakavernoözal enjeksiyonuna yanıtı ölçmüşlerdir. Tek başına verildiği zaman Y-27632'ye net olarak ölçülebilir bir yanıt olmadığı halde, Y-27632 tedavisi İKB'daki NO ile uyarılan yükselmeyi belirgin şekilde artırmıştır. Dahası, araştırmacılar NO donörü ve Y-27632'nun kombinasyonuna yanıtın, her ilacın tek başına veya ayrı ayrı verildiğinde iki ilaca olan yanıtın toplamından belirgin olarak fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular NO/cGMP/PKG yolağının Rho-kinazı inhibe ettiği ve böylelikle normal erektil yanıtın bir parçası olarak vazokonstriksiyonu azalttığı hipotezini destekler (36, 39).

Pek çok araştırmacı, Rho-kinaz sinyal yolağının *up-regülasyonunun* erektil disfonksiyon gelişmesinde önemli bir faktör olabileceğini ileri sürmektedir (35, 36, 37, 38). Çeşitli hastalıklara sekonder gelişen erektil disfonksiyonda Rho-kinaz sinyal yolağının katkısının olduğu öne sürülmüştür. Diyabete sekonder gelişen erektil disfonksiyonda RhoA/Rho-kinaz yolağının aktivasyonunun ve buna sekonder endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin aktivitesinin azalmasının rol oynadığı öne sürülmüştür (40). Pelvik ateroskleroz ve endotelial hasarlanma ile birlikte vaskülojenik erektil disfonksiyon oluşturulan sıçan modelinde kavernoözal Rho-kinaz aktivitesinin arttığı, eNOS enzim ekspresyonunun azaldığı ve erektil fonksiyonun bozulduğu, Rho-kinaz inhibitörü fasudilin kronik oral uygulanmasının erektil fonksiyonları, kavernoözal Rho-kinaz aktivitesini ve total eNOS ekspresyonlarını normale döndürdüğü bildirilmiştir (41).

Sıçanların kastrasyonunu takiben gelişen ciddi hipogonadal durum, erektil yanıtın belirgin olarak baskılanmasıyla sonuçlanır ve androjen replasmanı erektil yanıtı düzeltir (39, 40). Son zamanlarda, kastrasyonla ilişkili erektil disfonksiyonun gelişiminde Rho-kinaz sinyal yolağının rolü araştırılmıştır. Bu deneylerde, kavernoözal dokudaki Rho-kinaz proteininin Western-blot analizi, kastre edilmiş sıçanlarda bu proteinlerin önemli ölçüde *up-regülasyonunu* göstermiştir. Kastre edilen sıçanlara testosteron replasmanı, RhoA veya

Rho-kinaz proteininin miktarını tamamen yükseltmediği halde, erektil yanıtı tam olarak düzeltmiştir. Y-27632'nin intrakavernozal tek doz enjeksiyonu kastre edilmiş sıçanlarda erektil yanıtın büyüklüğünü artırmıştır. Benzer olarak, α_1 adrenoseptör agonisti fenilefrine *in vitro* kontraktıl yanıt, kastre sıçanların kavernoza dokularında belirgin olarak artmış ve bu yanıt, Y-27632 ile inhibe edilmiştir (39, 40).

Erektil disfonksiyon (ED) tedavisinde Rho-kinaz antagonistlerinin etkin rolü olup olmadığını net olarak kestirmek mümkün olmamakla birlikte bu stratejinin bazı avantajları olabilir:

1.Rho-kinaz yolağı alfa adrenerjik agonistler, ET-1 ve diğer ajanlarla uyarılan vazokonstriksiyonu düzenliyor gibi görünmektedir. Bir Rho-kinaz inhibitörü değişik nedenlerle oluşan ED'de efektif olabilmektedir.

2.Deneysel hayvan modellerine göre, bulgular ED ile ilişkili pek çok hastalıkta yolağın *up-regule* (örneğin; diyabet, hipertansiyon, hipogonadizm ve mesane boynu obstrüksiyonunu) olabileceğini düşündürmektedir.

3. Rho kinazın aracılık ettiği vazokonstriksiyonun inhibisyonu NO/cGMP/PKG yollarından bağımsız olan yollar üzerinden ereksiyonla sonuçlanmaktadır, böylece nitrat içeren ilaçların kullanımı kontrendike olmamaktadır.

4. Y-27632, topikal veya enjeksiyon şeklinde uygulanabilirken oral uygulamanın etkisi bildirilmemiştir. Bununla birlikte, oral uygulamanın spontan hipertansif sıçanlarda sistemik kan basıncını düşürmede etkili olduğu bildirilmiştir.

2.3 Kadınlarda Genital Uyarılma Fizyolojisi

Bugünkü bilgilerimize göre kadın cinsel fonksiyonu henüz yeni anlaşılmaya başlanmıştır ve halen cevaplanması ve araştırılması gereken sorular vardır. Birçok bilgiye hayvan modellerinden ve erkeklerdeki analogi temel alınarak ulaşılmıştır. Kadınlardaki çalışmalar daha çok genital cevabı kontrol eden merkezi sinir sinir sistemi ve cinsel davranış üzerinde yoğunlaşmıştır. Periferik sinir sistemi ve genital somatik sensöryal sistem konusundaki veriler sınırlıdır (45).

Kadınlarda cinsel yanıt döngüsü cinsel istek, uyarılma, orgazm ve çözülme fazlarından oluşmaktadır. Cinsel istek, cinsel aktiviteyi tetikleyen dış ve iç uyarılara karşı oluşturulan bir mental süreçtir. Cinsel uyarılma ise başlıca şu öğeleri içerir; düşünce ve fantezilerin santral sinir sistemini aktive etmeleri, genital organlar dışındaki yapılarda terleme,

vazodilatasyon, kalp hızında ve kan basıncında yükselme, meme ereksiyonu gibi durumlar ve genital organlarda (klitoral, vajinal ve labial) genişleme. Orgazm ise klitoris, vajina, labiumlar, periüretal glandlar gibi organlardan gelen uyarıların merkezi sinir sistemine taşınması sonucunda tekrarlayan pelvik kasılmalarla ortaya çıkan bir süreçtir (45).

Genital uyarılmanın düzenlenmesi şu maddeleri içerir; vajinal kan akımı, klitoral, labial ve bulbus vestibulariste genişleme ve vajinal düz kas cevabı. Vajinal düz kasın genital uyarılma cevabındaki kasılma ve gevşeme süreçleri oldukça önemlidir. Bazı *in-vitro* çalışmalar vajinal tonus ve bu tonusun düzenlenmesi üzerine odaklanmıştır.

2.3.1 Genital Uyarılma Yanıtı

Kadın genital sisteminin periferik inervasyonları cinsel uyarılma, vasküler ve nöromusküler kontrol altındadır ve parasempatik sistem ile aktive, sempatik sistem ile inhibe olur (45). Vajinal ve klitoral otonomik pregangliyonik parasempatik sinir lifleri, spinal korttaki sakral parasempatik nükleustan, sempatik sinir lifleri ise torakolomber seviyeden kaynaklanır. Parasempatik sinir lifleri pelvik sinir ile taşınırken, sempatik lifler ise hipogastrik sinir ve paravertebral sempatik zincir aracılığıyla taşınır. Buna ek olarak, somatik pudental sinir, vagusun aferent ve eferent lifleri genital cevaba katkıda bulunurlar (52).

Otonomik İnervasyon: Hipogastrik (sempatik) ve pelvik (parasempatik) sinirlerin her ikisi de pelvik gangliyonda sinaps yaparlar. Postgangliyonik sinir lifleri mesaneyi, üretrayı, aksesuar genital bezleri, vajinayı, uterusu ve klitorisini inerve eder. Klitorisini inerve eden kavernoza sinir vazodilatasyonu sağlar (41). İnsan vajinal sinir lifleri incelendiğinde, distal vajinal parçada proksimale göre daha fazla sinir lifi bulunduğu dikkat çekmektedir (41, 42). Vajina ön duvarının inervasyon yoğunluğu, arka duvardan daha zengindir (41). Kadınlarda sakral parasempatik nükleus ve nöronları genital parasempatik liflerin ana kaynağıdır. Hipogastrik sinirin pregangliyonik lifleri, spinal segmentin T12-L3 arasında iki ayrı nükleustan (dorsal gri komisür ve intermediolateral hücreler) çıkmakta ve genital sempatik lifleri oluşturmaktadır (41, 42, 43).

Somatik İnervasyon: Anatomik çalışmalarda pudental, pelvik ve hipogastrik duyuşal sinirlerin kadın pelvik organlarını inerve ettiği gösterilmiştir. Sakral pleksusun pelvik splanknik dallarından köken alan pudental sinir perine, klitoris ve üretranın duyuşunu alır.

Motor aksonları spinal kord L5 seviyesindeki iki motor nöron nükleustan (dorsomedial ve dorsolateral nükleus) köken alır (43). Bununla birlikte, perineal kasları inerve eden motor sinirler cinsel cevapta rol oynar ve cinsel ilişki sırasında uyarılmayı ve zevki arttırmaları. Pelvik sinirin duyuşal lifleri vajin, serviks, uterusun duyuşunu alır ve önemli ölçüde vajinal fornikste yoğunlaşmıştır (43).

Spinal Refleksler: Cinsel uyarılma cevabında esas spinal refleks mekanizmalar, supra spinal seviyeden gelen eksitatör ve inhibitör uyarılardır. Aferent sinirler esas olarak pudental sinir aracılığıyla alınır. Eferent kontrol ise somatik ve otonomik aktivitenin koordinasyonu ile gerçekleşir. Spinal bir refleks olan bulbokavernöz refleks, sakral S2-S4 seviyesinden kontrol edilir. Diğer refleksler, vajinal ve kavernozaal otonomik sinir uyarısı yaparak klitoris, labia ve vajinada genişlemeye neden olurlar (42).

Santral İnervasyon: Kadın seksüel fonksiyonunu kontrol eden merkezi sinir sistemi yollarıyla ilgili çok az bilgi vardır çünkü seksüel fonksiyonunun tam yerleşimi bulunamamıştır. Orta beyinde, periaquaduktal gri maddenin seksüel olarak anlamlı uyarılar için önemli bir nokta olduğu gösterilmiştir. Bu bölgedeki nöronların büyük bir kısmı, çiftleşme davranışı sırasında aktif hale gelmektedir (42).

Homeostatik görevlerinin dışında, hipotalamus, seksüel ve üremeye yönelik davranış için çok önemli bir bölgedir ama bu aktivitelerin çok sayıda olması hipotalamusun seksüel arzu ve performansla ilgili rolünün tam olarak tanımlanmasını zorlaştırır. Erkeklerde, medial preoptik bölge seksüel partneri tanımakla ilgilidir; aynı şey kadınlar için de geçerli olabilir. Hipotalamusun paraventriküler nükleusu, genital tepkinin kontrolü için iyi bir adaydır. Dişü sıçanlarda, arzu ve orgazm sırasında bu bölgeden kana oksitosin salgılanır ve çiftleşme sırasında paraventriküler nükleustaki nöronlar aktif hale gelir (44).

Kadınların seksüel fonksiyonuyla ilgili önbeyin bölgeleri, çiftleşme testlerinde Fos boyanma ve viral boyama kullanılarak tanımlanmıştır. Bulunan bölgeler medial amigdala ve stria terminalisin kırmızı nükleusunu içerir (44).

Kadın seksüel fonksiyonunun merkezi ve periferik kontrolü, çoklu entegre sistemlerle uyarılma ve inhibisyonunun dengesini içerir. Merkezi düzeyde nörotransmitterler dopamin

ve serotonindir. Periferik düzeyde, vajinada vazoaktif intestinal polipeptid ve asetilkolin, klitoriste ise nitrik oksit rol oynar.

2.3.2 Genital Yanıtı Düzenleyen Nörotransmitterler

Otonomik Nörotransmitterler: Alfa adrenerjik reseptörlerin tavşan vajinal dokusunda gösterildiği gibi hayvan modellerinde vajinal ve klitoral sinirlerin postgangliyonik liflerinde adrenerjik ve kolinerjik nörotransmitterler gösterilmiştir (45, 46). Birtakım veriler adrenerjik uyarının genital cevapta inhibitör etki yaptığını vurgulamaktadır. Tavşanda klitoral ve vajinal düz kaslar üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda vajinal düz kasın adrenerjik uyarıya kontraktıl cevap verdiği gösterilmiştir (46, 47).

Cinsel uyarılma bozukluğu olan postmenopozal kadınlarda oral yoldan alfa adrenerjik reseptör antagonisti fentolamin verilerek yapılan pilot çalışmada fentolaminin subjektif ve objektif uyarılmaya orta derecede etkili olduğu rapor edilmiştir (46). Ancak fentolaminin santral ve periferik etkilerini ayırt etmek mümkün olmamıştır. Meston ve arkadaşları, bu bulguyu destekleyen çalışmalarında adrenerjik aktivasyonun kadın cinsel uyarılmasında tetikleyici görevi olduğunu vurgulamaktadır. Bir alfa ve beta adrenerjik agonist olan efedrin ile yapılan plasebo kontrollü randomize bir çalışmada vajinal fotopletismografi ile ölçülen doku kan akımının arttığı saptanmıştır (49).

Noradrenalinin klitoral ereksiyondaki rolü indirektir ve yalnızca klitoral priapizmi olan vakalarda adrenerjik agonist enjeksiyonları ile tedavi tanımlanmıştır (49). Klitoral zengin kolinerjik inervasyona rağmen asetilkolinin rolü henüz tam netlik kazanmamıştır. Giuliano ve arkadaşları *in vitro* hayvan modellerinde intravenöz atropin enjeksiyonu ve pelvik sinir stimülasyonu ile birlikte, sadece vajinal kanlanmada bir miktar artış olduğu tanımlanmıştır (48). Aynı modelde intravenöz atropin enjeksiyonu ve pelvik sinir stimülasyonunun aynı zamanda vajinal düz kas kontraksiyonunu azalttığı gösterilmektedir. Kontrol grubu olmayan 6 kadından oluşan bir çalışmada, intravenöz atropin enjeksiyonunun mastürbasyon sırasında vajinal kan akımına etki etmediği bildirilmektedir (48).

Non-Adrenerjik, Non-Kolinerjik (NANC) Nörotransmitterler: Kadın genital traktında Başlıca deney hayvanı modellerinde çeşitli NANC mediyatörler gösterilmiştir (52). Deney hayvanı çalışmalarında, vajina ve vajinal vasküler yatakta Vazoaktif İntestinal Polipeptid (VIP), nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS), Nöropeptit Y (NPY), Kalsitonin Geni ile ilişkili

Peptit (CGRP), P maddesi (SP), Pituitar Adenilat Siklaz Aktive Eden Polipeptit (PCAP), Helospektin ve Peptit Histidin Methionin (PHM) varlığı gösterilmiştir (52, 53, 54).

İnsanlarda sinir liflerinin VIP, NPY, PACAP, NOS ve CGRP içerdiği gösterilmiştir (52, 53). Hoyle ve arkadaşları, vajinal vasküler yatağın (arterler, venler ve subepitelyal pleksus) yoğun bir şekilde inerve edildiğini göstermektedir. Vajinal sinir liflerinde en fazla NPY ve VIP, daha az olarak da NOS, CGRP, SP bulunmaktadır (55). İnsan çalışmaları oldukça önemli olmakla birlikte, en büyük dezavantajı vajinal dokuların histerektomize kadınlardan alınmasıdır. Vajinanın proksimal parçasının inervasyonu daha azdır ve distal parçadan farklı embriyojenik kökeni vardır.

İnsan klitorisyle ilgili sınırlı sayıdaki çalışmada klitoral sinirlerde VIP, PHM, NPY, CGRP ve P maddesi gösterilmiştir (55). Sinyal iletim sistemi yapılan çalışmalarda araştırılmıştır. İnsan ve tavşan vajinal düz kas hücre kültüründe sinyal iletiminden sorumlu moleküller cAMP ve cGMP olarak belirlenmiştir (54).

Vajinal düz kas hücresinde cAMP, PGE₁, isoproterenol tarafından, cGMP ise NO donörü olan sodyum nitroprusid tarafından uyarılır. Bununla birlikte sildenafilin tavşan ve insan vajinal düz kas hücresinde intrasellüler cGMP düzeyini artırdığı gözlenmiştir. İnsan vajinasının anterosuperior duvarında PDE5 ekspresyonu olmaktadır (55).

VIP, cinsel uyarılma cevabında vajinal kan akımının düzenlenmesinden sorumlu önemli bir nörotransmitterdir. Bu varsayım şu temellere dayanılarak ileri sürülmüştür:

- 1) VIP'in genital kanalda yüksek konsantrasyonda bulunması,
- 2) Genital vasküler yapıda VIP içeren sinir lifleri ile vasküler yapı arasında ilişki olması,
- 3) Cinsel uyarılma sırasında VIP seviyesinde artış gözlenmesi,
- 4) VIP uygulanmasından sonra vajinal kan akımının artması (56). Bu indirekt kanıtlar dışında, VIP'in cinsel cevaptaki rolünü tam anlamak için kliniğe dayalı daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Son zamanlarda NO'nun uyarılma fazındaki rolünü araştıran çalışmaların sayısında artış olmuştur. Sıçan, tavşan ve köpekler üzerinde yapılan yeni *in vivo* modellerde vajinal, klitoral kan akımı ölçümü, vajinal oksijen basıncı, vajinal sıcaklık ve vajinal lüminal basınç, uyarımın bir belirteci olarak kabul edilerek ölçülmektedir (52).

In vivo hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda pelvik sinir stimülasyonunun (PSS) klitoral kan akımını artırdığı kadar vajinal kan akımını da artırdığı ve vajinal sıcaklık artışı yaptığı gösterilmektedir. Sıçanlarda paravertebral sempatik zincirin uyarılması, PSS etkisinin aksi yönünde etkili olmaktadır (57). Hem köpek hem de tavşan modelinde PDE5 inhibitörleri olan sildenafil ve vardenafil sırasıyla vajinal ve klitoral kan akımını NO/cGMP yolağı üzerinden etki göstererek artırmaktadır (58).

In vitro hayvan modellerinde klitoral ereksiyonda NO/cGMP yolağının fizyolojik önemi dikkat çekmektedir. Tavşanlarda sildenafil klitoral ereksiyonu sağlamaktadır (59). İnsanlarda ise klitoral dokudaki PDE5'in sildenafil tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir ve klitoris glans ve korporal kavernoza dokusundaki sinirlerde NOS immünreaktivitesi gösterilmiştir (59).

Cinsel fonksiyon bozukluğu olmayan kadınlarda sildenafilin erotik stimülasyon sırasında vajinal genişlemeyi artırdığı gösterilmiştir (58). Uyarılma sorunu olan kadınlarda, sildenafilin etkilerini aydınlatmaya yönelik birçok çalışma yürütülmektedir (58). Genital uyarılma cevabında NO/cGMP yolağının önemli bir rol oynadığı bilinmekle birlikte, bu cevaptaki rolünün tam bilinmesi için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

2.3.3 Kadınlarda Genital Uyarılmanın Seks Steroidleri Tarafından Düzenlenmesi

Klinik ve deneysel çalışmalar, östrojenin genital hemodinamiyi, vajinanın fonksiyonunu ve yapısal özelliklerini düzenlediğini göstermiştir (60). Östrojen replasmanı genital kan akımını ve vajinal ıslanmayı artırmaktadır (60). Bulgular östrojenin genital kan akımını artırmadaki bu düzenleyici etkiyi NO sentaz ve VIP aracılığıyla yaptığı yönündedir (61).

Deney hayvanlarında östrojen ortadan kaldırıldığında vajinal ıslanmanın belirgin derecede azaldığı ve östrojen replasmanı ile ıslanmanın tekrar düzeldiği saptanmıştır (60). Overektomize hayvanlarda östrojen azalması nedeniyle vajinal musifikasyon azalmaktadır. Östrojenin vajinal düz kas kontraktilitesi üzerindeki etkisi ile ilgili yapılan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Kim ve arkadaşları, frekans ve doz-bağımlı elektriksel alan uyarımı ve VIP'in vajinal düz kas dokusunda gevşeme yaptığını göstermiştir (62). Bu vajinal gevşeme yanıtı overektomili hayvanlarda bir miktar azalmıştır.

Klinik alışmalar androjenlerin genital dokuda cinsel uyarı cevabını etkilediği yönündedir (63). Androjen replasmanı yapılan overektomize hayvanlarda elektriksel alan uyarımına karşı vajinal düz kasın gevşeme cevabının arttığı gösterilmiştir (63). Bununla birlikte androjen tedavisinin VIP-aracılı düz kas gevşemesini normale getirmesi androjenlerin nörotransmitter fonksiyonlarını düzenlediğini desteklemektedir. Kennedy, Armstrong ve arkadaşları (64), androjen tedavisinin sıçanlarda vajinal musifikasyonu attırdığını göstermiştir. Overektomize sıçanlarda topikal dehidroepiandrostenodion (DHEA) tedavisi vajinal atrofi ve vajinal epiteldeki değişiklikleri tersine çevirmektedir. Diğer alışmalar da progesteronun periferik sinirler için önemli bir sinyal molekülü olduğunu desteklemektedir. Progesteron spesifik hormon-duyarlı gen ekspresyonunu ve myelin kılıf gelişmesini sağlamaktadır. Progesteronun periferal vajinal uyarılmadaki rolü tam anlaşılamamıştır (63).

Genital Kan Akımının Östrojen ve Androjenler Tarafından Düzenlenmesi:

Filogenetik olarak alt kademede ki dişi hayvanlarda partneri cinsel yönden kabul etme daha çok östrojenin kontrolü altındadır. Buna ek olarak, androjenler dişi hayvanlar da cinsel ilgiyi şiddetlendirmektedir. Klinik ve deneysel çalışmalar östrojenin genital kan akımını düzenlediğini şiddetle desteklemektedir (64). Overektomize hayvanlarda östrojen ve östrojen+testosteron replasmanlarının pelvik sinir stimölasyonu ile oluşturulan genital kan akımını arttırdığı rapor edilmektedir (64). Oysa overektomize hayvanların sadece testosteronla tedavi edilmeleri genital kan akımını arttırmamaktadır (60). Bu bulgular, östrojenin genital vasküler yapıları kontrol ettiğini, androjenlerin de kan akımında modölasyon yapabildiğini düşündürmektedir.

Vajinal Lubrikasyonun Östrojen ve Androjenler Tarafından Düzenlenmesi:

Vajinal ıslanma, genital doku bütünlüğünün iyi olmasının ve genital uyarılmanın bir göstergesidir. Dolaşımdaki östrojen seviyesinin düşmesi cinsel şikayetlerin nedeni gibi görünmektedir. Östrojenin ve pelvik kan akımının azalması, yetersiz bir vajinal ıslanma, klitoral fibrozi, vajinal duvar kalınlığının azalmasını ve vajinal submukozal vaskülerizasyonun azalmasını beraberinde getirmektedir. Buna ek olarak, östrojen eksikliği genital organlarda involüsyon ve atrofiye neden olmakla birlikte servikal, endoservikal ve glandüler musin yapımını olumsuz etkilemektedir. Postmenopozal kadınlardaki östrojen tedavisi genital kan akımını arttırmakta, normal vajinal yapıyı ve ıslanmayı yeniden sağlamaktadır.

Deney hayvanı modellerinde overektomi sonrası östrojen replasmanının vajinal ıslanmaya etkisi araştırılmıştır. Overektomi, vajinal ıslanmayı önemli derecede azaltmaktadır. Buna ek olarak, östrojen eksikliğinin neden olduğu yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin sonucunda genital kan akımı azalmakta ve genital atrofi meydana gelmektedir. Overektomize hayvanlarda östrojen replasmanının vajinal ıslanmayı anlamlı derecede arttırdığı görülmektedir. İlginç olarak tek başına testosteron tedavisinin vajinal ıslanmayı değiştirmediği belirtilmiştir (64). Bu veriler overektomize hayvanlarda östrojen replasman tedavisinden sonra, normal vajinal ıslanmanın olduğunu ve östrojen seviyesinin normale yükseldiğini göstermektedir. Bu bulgu, vajinal kuruluk ve genital atrofisi olan postmenopozal dönemdeki kadınlarda vajinal ıslanmanın ve yapımının östrojen tedavisi ile normale getirebileceğini desteklemektedir.

Vajinal NOS Aktivitesinin Östrojen ve Androjenler Tarafından Düzenlenmesi:

Genital kan akımında NOS/cGMP yolağının rolü halen incelenmektedir. Traish ve arkadaşları, PDE tip 5 enziminin vajinada sentezlendiğini göstermiştir (66). Cellek ve arkadaşları (47), tavşan klitoral korpus kavernozum gevşemesinin NO aracılığı ile olduğunu ve bu cevabın PDE5 inhibitörleri ile etkilendiğini göstermiştir. Kim ve arkadaşları, hayvan modelinde NOS'un vajinal kan akımında önemli role sahip olduğunu ve L-NAME ile oluşan NOS inhibisyonunun vajinal kan akımında azalma ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Androjen, östrojen yetmezliği ve replasmanının NOS ekspresyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır (67). Overektomize tavşanlarda androjenler NOS ekspresyonunu artırır. Östrojenler ise NOS aktivitesini ve protein sentezini düzenler. Gözlemler Batra ve arkadaşlarının NOS'un östrojenle azaldığı, androjenle arttığı şeklindeki bulgularıyla uyumludur (67). NOS metabolizmasının östrojenlerle yavaşlatılıp androjenlerle hızlandırılmasının vajinal hemodinamik parametreler açısından anlamı bilinmemektedir. Birçok klinik çalışmada sildenafilin kadınlardaki etkisi incelenmiş ve çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak hastanın endokrin profili üzerine PDE5 inhibitörünün etkisinin genital uyarılmayı kolaylaştırıp kolaylaştırmadığı henüz net olarak bilinmemektedir.

Östrojen ve Androjenlerin Vajinal Düz Kas Kontraktilitesine Etkileri: Dişi hayvan modellerinde pelvik sinir stimülasyonu periferik genital şişkinliği, ıslanmayı, klitoral ve vajinal kan akımının artmasını, vajinal kan ile klitoral kavernoza dokunun genişliğinin ve uzunluğunun artmasını, vajinal duvarla klitoriste duvar gerginliğinin artmasını ve

genişlemeyi, vajinal transüstasyon ile vajinal ıslanmayı sağlamaktadır. Vajinal dokudaki değişikliklerin bir kısmı düz kas kontraktilesiyle sağlanır. İzole organ banyosunda yapılan çalışmalarda overektomize hayvanlardan elde edilen vajinal düz kas şeritlerinde elektriksel EAU ile oluşan vajinal gevşeme cevabının kontrol grubuna göre azaldığı saptanmıştır (62). Bu bulgu androjenlerin vajinal düz kas gevşemesini kolaylaştırdığını, östrojen tedavisinin ise bu gevşemeyi azalttığını desteklemektedir (62).

Overektomi ve Östrojen Replasmanının Vajinal Sialik Asit (musifikasyon) İçeriğine

Etkisi: Vajinal müsin içeriğinin düşük doz androjenlerle arttığı, yüksek doz östrojenle azaldığı gösterilmiştir. Tavşan vajinasında östrojenin vajinal sialik asit üretimine etkileri Traish ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır (62). Bu çalışmada bir gruba hiçbir uygulama yapılmamış, bir gruba ise bilateral overektomi yapılmıştır. Overektomiden iki hafta sonra bir grup tedavisiz bırakılmış, bir gruba östrojen, diğer gruba ise testosteron verilmiştir. Tedavisiz bırakılan grupta, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında vajinal sialik asit konsantrasyonunda belirgin azalma görülmüştür. Hayvanlar östrojen ile tedavi edildiklerinde vajinal sialik asit konsantrasyonunda anlamlı artış olmaktadır. Bununla birlikte, testosteron verilen grupta, tedavisiz gruba kıyasla bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu bulgular östrojenin müsin sekresyonunun düzenlenmesinden sorumlu olduğunu desteklemektedir.

Steroid Hormonların Vajinal Östrojen ve Androjen Reseptörleri Üzerine Etkileri:

Vajina, steroid seks hormonlarının hedef dokularından biridir. Birçok çalışma vajinadaki seks steroid hormon reseptörlerini biyokimyasal ve immünohistokimyasal olarak göstermiştir (68). Steroid hormonların reproduktif organlardaki östrojen ve progesteronların reseptörlerine etkisi önemli ölçüde araştırılmıştır. Vajinadaki seks steroid hormon reseptör ekspresyonunun düzenlenmesi hakkında sınırlı sayıda çalışma vardır. Steroid reseptör ekspresyonları farklı dokularda farklı olarak düzenlenmektedir. Örneğin, uterin dokuda östrojen ve progesteron reseptör sayısını arttırmaktadır. Bunun yanında, overektomi vajinal dokudaki östrojen reseptör sayısını arttırmaktadır. Östrojen verilen overektomize hayvanlarda ise vajinal östrojen reseptör sayısı normale dönmektedir (68). Androjen reseptör sayısı ise overektomize hayvanlarda azalmaktadır ve östrojen veya östrojen+testosteron verilmesi ile normal düzeyine gelmektedir. Postmenopozal kadınların vajinasında östrojen reseptör α ekspresyonunun azaldığı veya olmadığı rapor edilmiştir

(68). Bu bulgu, bu reseptörün aracılık ettiği fizyolojik cevabın niçin kaybolduğunu açıklamaktadır.

Vajinal steroid hormon reseptörlerini düzenleme mekanizmasında hangi seks steroidlerinin önemli olduğu konusunda yapılan araştırmalarda vajinal steroid hormon reseptörü ile vajinal kan akımı, ıslanma, müsifikasyon, düz kas kontraktilitesi gibi cinsel uyarılma cevaplarına aracılık eden nörotransmitterlerin fonksiyonu arasında korelasyon bulunduğu saptanmıştır (67).

2.4 Mesane Uyarım Fizyolojisi

2.4.1 Mesane ve Muskarinik Reseptörler

İnsanlarda ve pek çok hayvan türünde mesane kontraksiyonlarının hem kolinerjik hem de nonadrenerjik-nonkolinerjik (NANC) mekanizmalar tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (69, 70). Bu kontraksiyonların asetil kolinesteraz inhibitörleri ile artırılması ve atropin ile ortadan kaldırılması, muskarinik reseptörlerin stimülasyonu ile düzenlendiklerini göstermektedir. Normal insan mesanesinde *in vivo* boşaltma kontraksiyonu ve sinirlerin elektriksel olarak *in vitro* uyarılması, temel olarak muskarinik reseptörler yolu ile meydana gelmektedir. Çünkü bu yanıtlar tamamen ya da tama yakın bir şekilde atropin tarafından bloke edilebilmektedir (70).

İnsan mesanesinde yapılan çalışmalarda tüm muskarinik reseptör alttipleri ($M_1 - M_5$) için mRNA'ların varlığı gösterilmiş ancak M_2 ve M_3 alttiplerini kodlayan mRNA'lar daha baskın bulunmuştur. M_2 reseptörleri sayıca daha fazla olsa da M_3 reseptörü mesane kontraksiyonlarından sorumlu olan ana reseptördür (71).

Tavşan detrüör kasında yapılan kolinerjik agonist betanekol ile indüklenen kontraksiyonların, selektif olmayan katyon kanalı inhibitörü olan LOE-908 ve Rho-kinaz inhibitörlerinin (Y-27632, HA-1077) kombinasyonu ile ortadan kalktığı bulunmuştur (73). Bu da detrüör kasında muskarinik reseptör aktivasyonunun, hem selektif olmayan katyon kanallarını hem de Rho-kinaz aktivasyonunu kapsadığını gösterir. Ayrıca mesanede Rho-kinaz isoformlarının(I-II) yüksek seviyeleri gösterilmiştir (72). Rho-kinaz detrüör kasının kontraksiyon ve tonusunda rol oynar (72).

2.4.2 Mesane ve β -Adrenoseptörler

Detrüsör dokusunda noradrenalin (NA) adrenerjik sinirlerin uyarımına bağlı olarak salıverilir. Mesanede β -adrenoseptörler α -adrenoseptörlere göre daha baskın olduğundan normal detrüsörün NA'e verdiği yanıt gevşemedir (74).

Türlerin çoğunda detrüsörde baskın olarak β_2 -AR'lerin bulunduğu gösterilmiştir (88). Fakat, hem β_2 -AR'leri hem de β_1 -AR'leri içeren kobay detrüsöründe gevşetici etki, temel olarak β_1 -AR'lerin aracılığıyla gerçekleşir. İnsan detrüsöründeki, β -AR'lerin ne β_1 -AR'lerin, ne de β_2 -AR'lerin fonksiyonel karakteristik tipine sahip olduğu gösterilmiştir, çünkü detrüsör β -AR'leri propranolol tarafından bloke edilebildikleri halde, proktalol (α_1 AR antagonisti) veya butoksamin (β_2 AR antagonisti) tarafından bloke edilememiştir. *Real Time* (RT)- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), PCR ürününün direkt sekansı, *in situ* hibridizasyon ve *in vitro* izometrik kontraksiyonları kapsayan farklı metodların kullanılması ile çeşitli araştırmacılar insan detrüsörünün β_1 ve β_2 -AR'leri yanında β_3 -AR'leri de eksprese ettiğini gösterdiler. β_3 -AR'leri efektif olarak insan detrüsör kasını gevşetirler. Mesane gevşemesi için en önemli β -AR'ler en azından insan için β_3 -AR'leridir (74). β_1 , β_2 ve β_3 -AR'lerini kodlayan için mRNA'lar sıçan mesanesinde de bulunmuştur (88).

Detrüsör gevşemesi β -adrenerjik uyarının sonucunda adenil siklaz uyarımı ve cAMP birikimi aracılığıyla olur. PDE, cAMP'nin AMP'ye indirgenmesini katalize ederek, cAMP'nin etkisini kısıtlar. Bir başka ifadeyle, PDE cAMP'yi metabolize eder. Kendi bağlanma seçiciliği, özel alt türleri ve doku dağılımları ve farmakolojik seçicilikleri olan çeşitli PDE izoformları vardır (79). Mesanede PDE'nin seçici inhibisyonu, cAMP'nin bazal seviyesini artırırken (ve muhtemelen detrüsörün gevşemesine yol açarken) β -adrenerjik agonistlerin etkisini de artırır.

2.4.3 Mesane ve α -Adrenoseptörler

Alfa adrenerjik aktivite normal mesanede fazla önemli olmadığı halde, patolojik durumlarda artan α -AR yoğunluğu, mesanede norepinefrine verilen yanıtların, gevşemeden kasılmaya dönmesine neden olur. Lepor ve arkadaşlarının normal ve instabil insan mesanelerinin reseptör yoğunluğunu karşılaştırmaları, instabil mesanelerde muskarinik reseptör yoğunluğunu α -adrenoseptör yoğunluğundan daha az olduğunu göstermiştir (78).

Alfa adrenerjik mekanizmalar üretral fonksiyonlarda daha önemlidir. Önemli farmakolojik ve fizyolojik bulgular, üretral tonus ve intraüretral basıncın α -adrenerjik reseptörler tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Radyoligand bağlama çalışmaları, tavşan üretrasında α_1 ve α_2 adreno reseptörlerinin bulunduğunu belgelemiştir. Dişi hayvanlarda α -adreno reseptörlerin büyük kısmı α_2 alt tipiyken, erkeklerde α_1 reseptörleri daha baskındır. İzole edilmiş insan üretral düz kası, α -adrenerjik agonistlere cevap olarak kasılır. Alfa adrenerjik antagonistler bu kasılmayı bloke eder.

Tablo 2.1: Mesanede adrenerjik ve kolinerjik reseptörlerin yerleşimleri ve etkileri

Reseptör	Yerleşim	Düs kastaki etki	Sonuç
α adrenerjik	Mesane tabanı, boynu, iç sfinkter	Kasılır	Depolama
β adrenerjik	Mesane superioru	Gevşer	Depolama
Kolinerjik	Mesanenin tümü	Kasılır	Boşaltma

2.4.4 Mesane ve Nitrik oksit

NO, idrar boşaltımı sırasında üretral düz kasların gevşemesini sağlayan ana inhibitör transmitter olarak tanımlanmıştır (79). NO, bu etkisini kolinerjik ya da adrenerjik uyarımla kasılmış durumda olan düz kas üzerinde göstermektedir. Mesanede NO etkisi daha çok mesane boynu ve üretral düz kaslar üzerinde belirgindir. Özellikle miksiyon başlangıcında oluşması gereken mesane çıkımı relaksasyonunda NO'nun önemli rolü olduğu anlaşılmıştır. Bu etkinin fetal yaşamda başladığı ve yüksek intravezikal basınçların oluşması sonucunda ortaya çıkabilecek üst üriner sistem bozulmasının engellenmesinde çok önemli olduğu düşünülmüktedir (79). Sıçanda, NO, major pelvik gangliyondan çıkan postganglionik sinirlerinden salıverilir. Bu nöronlar, NO sentezinde yer alan NOS enzimini içerir. Dişi sıçanlar üzerinde yapılan elektrofizyolojik çalışmalar, lumbosakral spinal köklerin elektriksel uyarımının eş zamanlı olarak mesane kasılmasına ve üretral gevşemeye sebep olduğunu göstermiştir. NO aynı zamanda mesane sinir aktivitesinin kontrolünde de rol alır. Bir çalışmada NO'nun intravezikal uygulanmasının, sıçanlarda siklofosfamide bağlı mesane iritasyonu ile oluşturulan mesane instabilitesini de baskılayabildiği gösterilmiştir. Bu etkinin mesane aferent aktivitesinin baskılanması aracılığıyla olduğu düşünülmüktedir (80).

2.4.5 Mesane ve Afferent Nöropeptidler

Mesanede etkili mediyatörlerin çoğu kapsaisin-duyarlı C liflerinde bulunmaktadır. C liflerinin patolojik durumlarda aferent etkileri üstlenmesi, bu mediyatörlerin esas olarak mesaneye gelen uygunsuz uyarımlar ile salıverildiğini düşündürmektedir. Bu nedenle, bunlar genel olarak aferent nöropeptidler olarak anılmaktadır. Bunların içinde P maddesi, nörokinin A ve B gibi taşıkininler, VIP, CGRP, PCAP ve enkefalinler sayılabilir. Bu ajanlar medulla spinalisteki afferent terminallerde de transmitter olarak yer almaktadır (81).

2.4.6 Mesane ve Diğer Nöropeptidler

Mesane üzerinde doğrudan etkili birçok başka nörotransmitter olduğu söylenebilir. Klinik ve deneysel çalışmalara dayanan veriler, mesanede enkefalinlerin, histamin ve serotoninin de etkili olduğunu göstermektedir. Opioidlerin postoperatif mesane boşalmasını geciktirmesi, naloksan gibi saf opioid antagonistlerinin mesane kompliyansını azaltması ve intravezikal morfin verilmesinin mesane cerrahileri sonrasında gözlenen spazmları azaltması, enkefalinlerin mesane üzerinde inhibitör nöromodülatörler olduğunu düşündürmektedir.

Histamin ve serotoninin de mesane üzerinde kontraktıl etki gösterdiği, histaminin periferik, serotoninin ise santral sinir sistemindeki reseptörleri aracılığıyla etki oluşturduğu bilinmektedir (81).

2.4.7 Mesane ve Prostaglandinler, Endotelinler

Prostaglandinler alt üriner sistemin birçok yerinde üretilmektedir. Mesane kontraktilitesi, inflamatuvar cevaplar ve sinir iletiminde rol oynadıkları ileri sürülmektedir. Prostaglandin(PG) F₂-alfa, PGE ve PGE₂ detrusör kontraksiyonu yapmaktadır (89). Bu etkilerine karşın prostaglandinlerin mesane boşalması ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmemiştir. Prostaglandinlerin nöral iletim düzenleyicileri olduğu ve uyarıcı transmitterlerin etkisini artırdıkları düşünülmektedir (82).

Endotelinlerin mesane epitelinin altında bulunduğu gösterilmiştir. Prostaglandinlere benzer şekilde mesane gerilmesi veya inflamasyonuna sekonder olarak salıverildikleri ve detrusör kontraktilitesini etkiledikleri sanılmaktadır (82).

2.4.8 Mesane ve Seks Steroidleri

Menstrüel döngünün farklı dönemleri içinde, kadınlarda boşaltımda, mesane ağrısında ya da idrar tutamama gibi durumlarda değişiklikler görülür. Seks steroidleri doğrudan mesane kasılmasını etkilemezler; ancak reseptörlerin aktivitesini düzenler ve mesane dokularının gelişimini etkilerler. Kadınlarda östrojen reseptörleri trigonda bulunur. Levin ve arkadaşları, östrojen verilmiş genç dişi tavşanların mesane gövdesi kaslarının, α -adrenerjik, kolinerjik ve pürinerjik agonistlere karşı artmış bir yanıt verdiğini göstermiştir (83). Diğerleri östrojen verildikten sonra adrenerjik ve muskarinik reseptör yoğunluğunda azalma görmüşlerdir. Örneğin, Eliot ve arkadaşları östrojen verilmiş sıçan mesanesi düz kaslarının kasılmalarında azalma olduğunu göstermişlerdir (84). Palea ve arkadaşları ooforektominin kolinerjik uyarıları artırdığını ve dışarıdan östrojen verilmesiyle uyarılardaki değişikliğin düzeldiğini göstermişlerdir (85).

Östrojenler ayrıca üretradaki adrenerjik reseptörleri artırırlar. Ekstrom ve arkadaşları ooforektomize tavşanlara östrojen verildiğinde, α -adrenerjik agonistlere karşı kasılma cevaplarının gözlemlendiğini, ancak kasılmış haldeki tavşan mesanelerinin bu ajanlara hiç cevap vermediğini bildirmişlerdir (86).

Dişilerde, östrojenin idrar kontinansı üzerine etkisi, muhtemelen bu hormonun adrenerjik reseptörler, damarlanma ve üretral morfolojideki çeşitli etkilerine bağlıdır. Ek olarak, progesteron mesanenin elektriksel ve kolinerjik kasılmalarını artırır. Ekzojen östrojenler ve progesteronlar dişi kobay mesanesinde NOS aktivitesini azaltırlar. Bu sebeple hormonal tedavinin, detrüsr instabilitesinin tedavisinde kullanılabileceği iddia edilmiştir (87). İster yalnız başına, ister diğer ilaçlarla birlikte, kadınlarda oral ya da intravajinal östrojenin üriner inkontinans tedavisinde kullanımının faydalı olması, seks steroidlerinin, alt üriner bölgedeki sinirsel ya da myojenik yanıtlarda rol oynadığını destekler (88).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmadaki deneylere Başkent Üniversitesi Araştırma Kurulu ve Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan onay alındıktan sonra başlandı (10/02/2009 tarihli, DA09/05 no'lu proje).

3.1 Deney Hayvanları

Sıçan izole vajen ve mesane düz kas dokusunda Rho-Kinaz yolağı üzerine cerrahi menopozun ve yaşlılığın etkilerini incelemek için Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları ve Üretim Merkezi'nden temin edilen genç erişkin (7-9 aylık; $n=18$) ve yaşlı (22 ay ve üzeri; $n=6$) Wistar albino türü dişi sıçanlar (250-300 g; $n=24$) kullanıldı. Bütün deney hayvanları vivaryumda, sabit tutulan fizyolojik koşullar (12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık, $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%50\pm 10$ nem) altında barındırıldı. Sıçanlar standart sıçan yemi ile *ad libitum* beslendi.

Sıçanların bu araştırma için seçilmesindeki temel neden, alt ürogenital sistemlerinin insana benzer merkezi ve çevresel sinir sistemine, hücresel ve hücreler arası iletim organizasyonuna sahip ve filogenetik olarak alt sınıfta olan bir canlı türü olması idi.

Deney hayvanları rasgele dört gruba ayrıldı;

- **Kontrol Grubu ($n=6$):** herhangi bir işlem ve/veya ilaç uygulanmayan genç erişkin sıçanlar
- **Bilateral Ooferektomi Grubu ($n=6$):** ooferektomi uygulanan genç erişkin sıçanlar
- **Sham Grubu ($n=6$):** ooferektomi hariç tüm cerrahi işlemlerin gerçekteştirildiği genç erişkin sıçanlar
- **İleri Yaş Grubu ($n=6$):** herhangi bir işlem ve/veya ilaç uygulanmayan yaşlı sıçanlar

Ooferektomi işleminde bir ay sonra bütün hayvanların distal vajen ve mesaneleri, anestezi altında *en blok* rezeke edilerek soğuk Krebs-Henseleit solüsyonu içerisinde etraf dokudan temizlendi ve çeşitli biyoaktif ajanlara yanıt olarak oluşan izometrik gerim değişiklikleri ağıısından izole organ banyosu düzeneğinde değerlendirildi.

3.2 Ön Deney Aşaması

Vajen düz kasında optimum yanıtın elde edilebileceği preparatı belirlemek üzere öncelikle vajen uterustan intraoitusa kadar bütün halinde çıkarılıp sirküler ve longitudinal vajen kesitleri ile ön çalışma yapıldı. Longitudinal kesitlerde yeterli kasılma ve gevşeme yanıtları gözlenmezken, sirküler vajen kesitlerinde fenilefrin (10^{-5} M) ile kasılma yanıtları ve papaverin (10^{-6} M ve 10^{-5} M) ile gevşeme yanıtlarının belirgin olduğu saptandı. Optimum yanıtların sirküler düz kas preparatlarında elde edildiğinin anlaşılmasından sonra sirküler preparatlarda vajenin distal ve proksimal kesitlerinin yanıtları karşılaştırıldı. Distal kesitlerin fenilefrin ve papaverin yanıtlarının, proksimal kesitlere göre daha belirgin olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, araştırmada distal sirküler vajen dokusu şeritlerinin kullanılmasına karar verildi.

3.3 Deneysel Sırasında Kullanılan Anestezi

Deneysel sırasında her türlü cerrahi girişim anestezi altında uygulandı. Bu amaçla deney hayvanlarının cerrahi anestezi derinliğine ulaşması beklendi. Sedatif ve düz kas gevşetici olarak ksilazin (10 mg/kg, intraperitoneal (*i.p.*); Rompun %2, Bayer, Türkiye), disosiyatif anestezik ajan olarak da ketamin (60 mg/kg, *i.p.*; Alfamine %10, Ege Vet, Türkiye) uygulandı.

3.4 Cerrahi Menopoz Oluşturulması

Anesteziyi takiben sıçanların karın bölgesindeki tüyler tıraş edildi. Sıçanlar supin pozisyonda tespit edildi ve tıraş edilen bölge %10'luk povidon iyot (Isosol, Merkez Laboratuvarı İlaç Sanayi, Türkiye) ile dezenfekte edildi. 1,5-2 cm'lik orta hat insizyonu ile karın açıldı. Mesane alt abdominal kavitede gözlemlendi. Ardından, mesane laterale deviye edilerek altındaki bikornu uterus dokusu gözlemlendi. Bilateral uterus kolları yukarı doğru takip edilerek sonlandığı yerde overler gözlemlendi. Overler çevre yağ ve bağ dokusundan serbestlendikten sonra alt ve üstten klempenip 4/0 vicryl ile bağlanıp eksize edildi. Kanama kontrolü yapıldıktan sonra alt abdominal kavite 2 ml serum fizyolojik (SF) ile yıkandı ve karın içi organlar yerleştirildikten sonra 4/0 prolon sütürle katlar devamlı olarak kapatıldı.

3.5 Sham grubunda yapılan işlemler

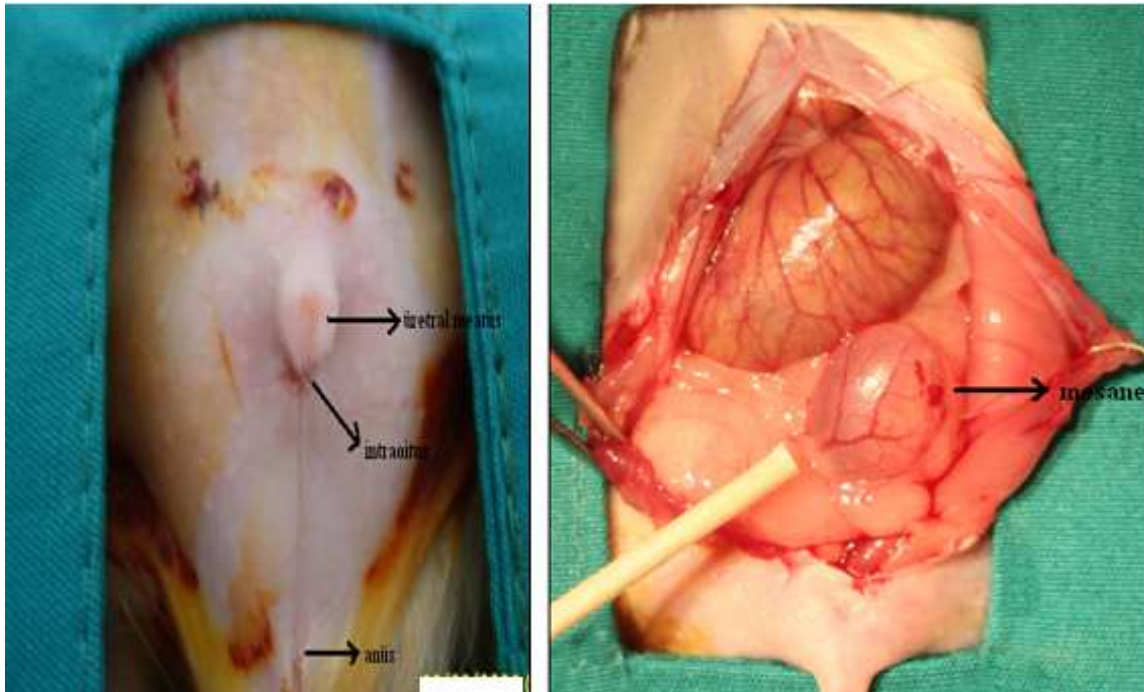
Sham grubundaki sıçanlara aynı anestezi ve asepti-antisepti koşulları altında, overlerin çıkarılması hariç, oofektomi grubunda uygulanan tüm cerrahi işlemler uygulandıktan sonra alt abdominal kavite SF ile yıkanıp 4/0 prolent sütünle katlar devamlı olarak kapatıldı.

3.6 Cerrahi Sonrası

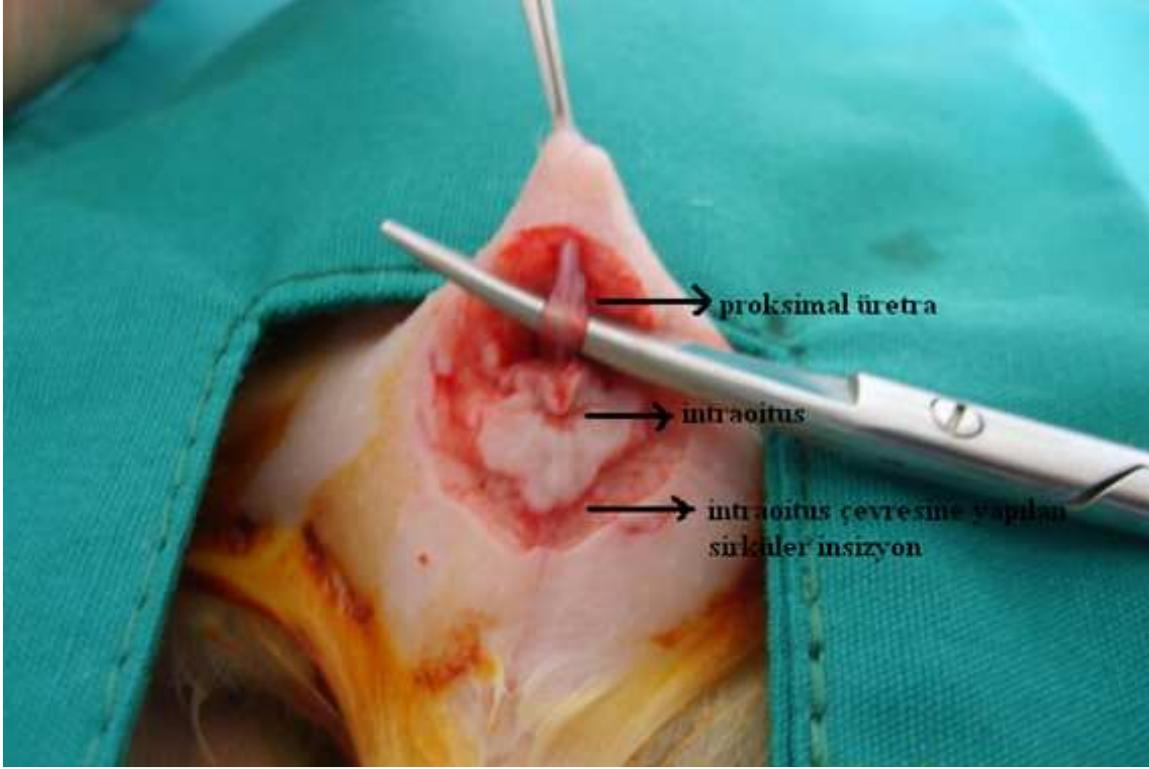
Sıçanlarda postoperatif ilk üç gün, enfeksiyon kontrolü için enrofloksasin (5 mg/kg, *i.m.*; Baytril, Bayer) ve analjezik olarak da fentanyl (2 mg/kg, *s.c.*) uygulandı. Cerrahi menoz oluşturmak amacıyla oofektomize edilen sıçanlar işlemiden 4 hafta sonra deneylere dahil edildi.

3.7 İzole Distal Vajen ve Mesane Düz Kas Preparatlarının Hazırlanması

Dört haftalık takip sonrasında Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji laboratuvarına ulaştırılan sıçanlara ketamin ve ksilazin anestezisi altında (sırasıyla 60 mg/kg, 10 mg/kg, *i.p.*) orta hat abdominal insizyon uygulandı. Mesanenin bütün halinde çıkarılmasını takiben, intraoitusa sirküler bir insizyon yapıldı (Şekiller 3.1 ve 3.2)

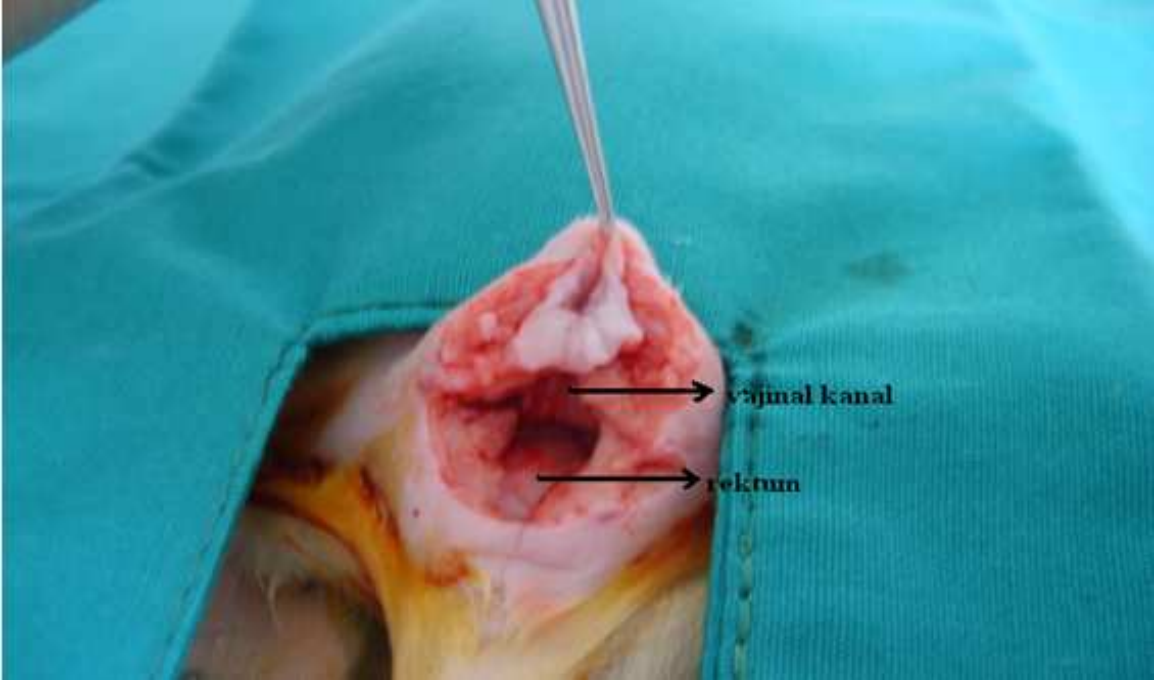


Şekil 3.1: Soldaki resim: dişi sıçanda, üretal meatus, introitus ve anüs; sağdaki resim: sıçanda mesane

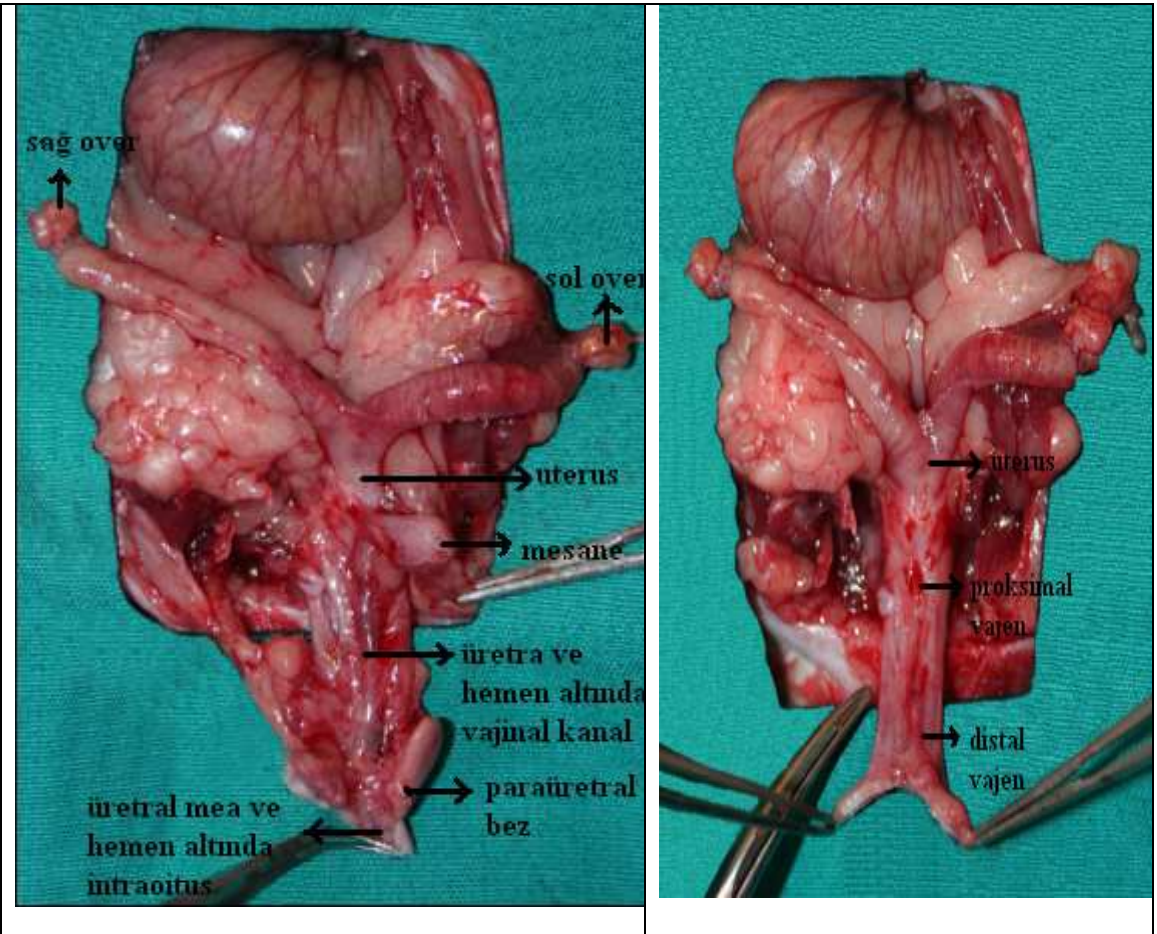


Şekil 3.2. Dişi sıçanda intraoitusun çevresine yapılan sirküler insizyon ve üretranın izolasyonu

Vajen dokusunun superiorunda klitoris, klitoral glandlar ve üretral doku gözlenip uzaklaştırıldı, inferiorunda ise vajen dokusu rektumdan künt ve keskin diseksiyonlarla serbestlendi (Şekil 3.3). Lateral bölgelerde ise çevre yağ dokusundan izole edilip 3-4 cm uzunluğunda bir vajinal doku çıkarıldı. Çıkarılan mesane ve vajen dokuları petri tabağında soğuk Krebs Henseleit solüsyonu içinde izole edildi. Mesaneden longitudinal olarak 3 mm x 1 cm'lik tek bir doku şeridi, distal vajenden ise 3 mm kalınlığında sirküler tek bir doku şeridi olmak üzere her bir sıçandan 2 doku şeridi hazırlandı (Şekil 3.4). Hazırlanan mesane ve vajen preparatları proksimalinden ve distalinden tespit edilerek izole organ banyosu sistemine Krebs-Henseleit solüsyonu içinde nakledildi (Şekil 3.5). Sakrifikasyon işlemi 8 ayrı günde, her gruptaki deney hayvanları için randomize olacak şekilde, her gün 3 sıçana uygulandı. Sıçanlar yüksek doz ketamin anestezisi (150 mg/kg, *i.p.*) altında dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.



Şekil 3.3. Dişi sıçanda vajinal kanalla rektum arasına yapılan künt diseksiyon



Şekil 3.4. Dişi sıçanda genitoüriner organların anatomik yerleşimi ve vajenden sirküler kesit hazırlanması

3.8 İzole Organ Banyosu Sistemi

Deney hayvanlarından elde edilen distal vajen ve mesane dokuları izole organ banyosu sisteminde izometrik gerim değişiklikleri açısından karşılaştırıldı (Şekil 3.5).. İzole organ banyosu sistemi, bir ucu sabit, diğer ucu bir transdüsize bağlı olan bir dokunun (özellikle düz kas içeren) fizyolojik şartlar altında, çeşitli biyoaktif ajanlara verdiği kasılma gevşeme gibi izometrik gerim değişikliklerini araştırmaya yönelik bir sistemdir. Dokular %95 O₂ + %5 CO₂ gaz karışımı ile sürekli olarak havalandırılan, 37°C sıcaklığında, Krebs-Henseleit solüsyonu ile dolu 10 mL'lik izole organ banyolarına asılarak, kuvvet-yerdeğiştirme transdüsipleri (FT03, MAY, Türkiye) aracılığı ile algılanan izometrik gerim değişiklikleri, bir fizyolojik veri toplama ve değerlendirme sisteminde (BioPac, MP100, MAY, Türkiye) analiz edilmek üzere kaydedildi. Optimum yanıtların elde edilmesi ve dengeleme amacıyla vajen dokusu 0.4 gr, mesane dokusu ise 0,5 gr dinlenme gerilimi altında, 1 saat süresince dinlendirildi. Bu sırada, her 15 dakikada bir organ banyoları taze Krebs-Henseleit solüsyonu ile yıkandı. Krebs fizyolojik solüsyonunun içeriği, mM olarak; NaCl: 118,2, KCl: 4,7, MgSO₄: 1,2, KH₂PO₄: 1,2, NaHCO₃: 25, Glukoz:11,1, CaCl₂: 2,5

3.9 Elektriksel Alan Uyarımı

Vajen doku şeritleri organ banyosu içinde iki tane platin elektrot arasına asılarak elektriksel alan uyarımına maruz bırakıldı. Dokudaki intakt sinirleri uyararak dokuların sinir-aracılı uyarımı ile oluşan eksitasyon-cevap kenetini taklit eden Elektriksel Alan Uyarımı (EAU) 'MAY STPT05 Research Stimulator' kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.5). Ön deneylerde vajen dokusuna farklı değerlerde EAU uygulanarak optimum yanıtlara yol açan EAU değerleri belirlendi. Duration:0,3 ms., interval:5 s., train:5, dalga:kare, volt:40V, frekans:40 Hz değerlerinde submaksimal yanıtlar gözlemlendi. Deney boyunca EAU için aynı değerler kullanıldı. EAU ile oluşan gevşeme, kasılma ve uyarımın kesilir kesilmez dokunun verdiği kasılma biçimindeki *off* yanıtları değerlendirildi. EAU önce dokunun istirahat geriminde (bazal EAU) daha sonra da prekontrakte (ön-kasılmış) dokuda uygulandı. Submaksimal kasılma yanıtı oluşturmak için vajen dokusunda fenilefrin (10⁻⁵M), mesane dokusunda ise karbakol (10⁻⁵M) kullanıldı. Bu şekilde, önce herhangi bir ajan organ banyosuna eklenmeden antagonistsiz (naif) gruba EAU uygulandı. Ardından önce adrenerjik, kolinerjik, nitreerjik sistemler bloke edildikten sonra EAU uygulanarak, yanıtındaki değişim kaydedildi, sonra da Rho kinaz inhibitörü eklendiğinde yanıtta ek değişim olup olmadığı incelendi. Her bir EAU üçer kez tekrarlanıp oluşan izometrik gerim değişikliklerinin aritmetik ortalaması hesaplandı.



Şekil 3.5. Sağ üstte; izole organ banyosu sistemi, sol üstte; izole organ banyosunda mesane dokusu örneği, alttaki resim; EAU için kullanılan cihaz (MAY STPT05 Research Stimulator)

3.10 Kullanılan Farmakolojik Ajanlar ve Solüsyonlar

İzole organ banyosu deneylerinde uygulanan test maddeleri ve konsantrasyonları aşağıdaki gibidir:

Vajen için kullanılanlar;

- Fenilefrin (FE): α_1 adreno-reseptör agonisti (10^{-8} - 10^{-4} M; Sigma, St. Louis, USA)
- Atropin (A): Kolinerjik muskarinik antagonisti (10^{-5} M; Sigma)
- Guanetidin (G): Sempatolitik, adrenerjik nöron blokörü (10^{-5} M; Sigma)
- L-NAME (L): NO sentaz inhibitörü (10^{-3} M; Sigma)
- Y-27632: Selektif Rho-kinaz inhibitörü (10^{-8} - 10^{-4} M; Sigma)

Mesane için kullanılanlar;

- Karbakol (K): Kolinerjik muskarinik reseptör agonisti (10^{-5} M; Sigma)
- Heksametonium (H): Kompetitif gangliyon blokörü (10^{-5} M; Sigma)
- L-NAME (L): 10^{-3} M
- Y-27632: 10^{-8} - 10^{-4} M

Test maddeleri distile suda çözülerek hazırlandı. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlar izole organ banyosundaki son konsantrasyonları göstermektedir. Bu amaçla, ilaçlar banyolara mikropipet aracılığı ile (μ L düzeyinde) eklendi. İlaçlar izole organ banyosuna kümülatif olarak eklendi. İnhibitör ve antagonistler, agonistlerden 20 dakika önce eklenerek dokunun inkübe olması sağlandı. Farklı ilaç uygulamaları arasında banyolar 5 dakika ara ile 3 kez taze Krebs-Henseleit solüsyonu ile yıkanarak önceki ilacın dokudan uzaklaştırılması sağlandı.

3.11 Deney Protokolleri

Mesane ve vajen dokusunda meydana gelen kasılma ve gevşeme yanıtlarının kolinerjik, adrenerjik, nitreerjik ve Rho-Kinaz yolları üzerine olan etkileri incelendi.

3.11.1 Elektriksel Alan Uyarım Yanıtları

EAU yanıtlarına vajen dokusunda çalışıldı.

- **Bazal EAU Yanıtları:** İstirahat gerimindeki dokuya organ banyosuna herhangi bir ajan ilave etmeden, yukarıda belirtilen parametrelerde EAU uygulandı.

- **Ön-kasılma üzerine EAU yanıtları:** FE (10^{-5} M) verilmesini takiben oluşan kasılma yanıtı platoya ulaştıktan sonra 3'er defa EAU uygulandı.
- **Sempatik, parasempatik, nitreerjik sistemlerin blokajı durumunda EAU yanıtları:** Dinlenim halindeki preparatlarda organ banyosuna guanetidin (10^{-5} M) + atropin (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-3} M) (GAL) inkübasyonunu takiben yukarıda belirtilen parametrelerde EAU uygulandı.
- **Sempatik, parasempatik, nitreerjik sistemlerin blokajı durumunda ön-kasılma üzerine EAU yanıtları:** GAL inkübasyonundan sonra organ banyosuna FE (10^{-5} M) eklenmesiyle oluşan kasılma yanıtı platoya ulaştınca EAU uygulandı.
- **Sempatik, parasempatik, nitreerjik sistemlerin ve Rho-kinaz yolağının blokajı durumunda EAU:** Organ banyosuna GAL + Y-27632 (10^{-5} M) (GALY) inkübasyonunu takiben EAU uygulandı.
- **Sempatik, parasempatik, nitreerjik sistemlerin ve Rho-kinaz yolağının blokajı durumunda ön-kasılma üzerine EAU yanıtları:** Organ banyosuna GALY inkübasyonu üzerine FE (10^{-5} M) eklenmesiyle oluşan kasılma yanıtı platoya ulaştınca EAU uygulandı.

3.11.2 Vajen ve Mesane Dokularında Y-27632 ile Elde Edilen Konsantrasyon-Bağımlı Yanıtlar

- **Vajen dokusunda submaksimal FE kasılması üzerine Rho-Kinaz antagonisti Y-27632'nin konsantrasyon-bağımlı yanıtları:** FE (10^{-5} M) verilmesini takiben oluşan kasılma yanıtı platoya ulaştıktan sonra Y-27632 (10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} M) ile oluşan yanıtlar kaydedildi.
- **Vajen dokusunda sempatik, parasempatik, nitreerjik sistemlerin blokajı durumunda ön-kasılma üzerine Y-27632'nin konsantrasyon-bağımlı yanıtları:** GAL inkübasyonunu takiben FE (10^{-5} M) uygulaması ile oluşan kasılma yanıtı platoya ulaştıktan sonra Y-27632 (10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} M) ile oluşan yanıtlar kaydedildi.
- **Mesane dokusunda submaksimal karbakol kasılması üzerine Y-27632 ile oluşan konsantrasyon-bağımlı yanıtlar:** Karbakol (10^{-5} M) uygulaması ile

oluşan kasılma yanıtı platoya ulaştıkta sonra Y-27632 (10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} M) ile oluşan yanıtlar kaydedildi.

- **Mesane dokusunda nitrerjik sistemin ve gangliyon blokağı durumunda submaksimal karbakol kasılması üzerine Y-27632 ile oluşan konsantrasyon-bağımlı yanıtlar:** Organ banyosunda L-NAME (10^{-3} M) + Hekzametoniyum (10^{-5} M) (HL) ile inkübasyonu takiben karbakol (10^{-5} M) ile oluşan kasılma yanıtı platoya ulaştıktan sonra Y-27632 (10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} M) ile oluşan gevşeme yanıtları kaydedildi.

3.12 İstatiksel Analiz

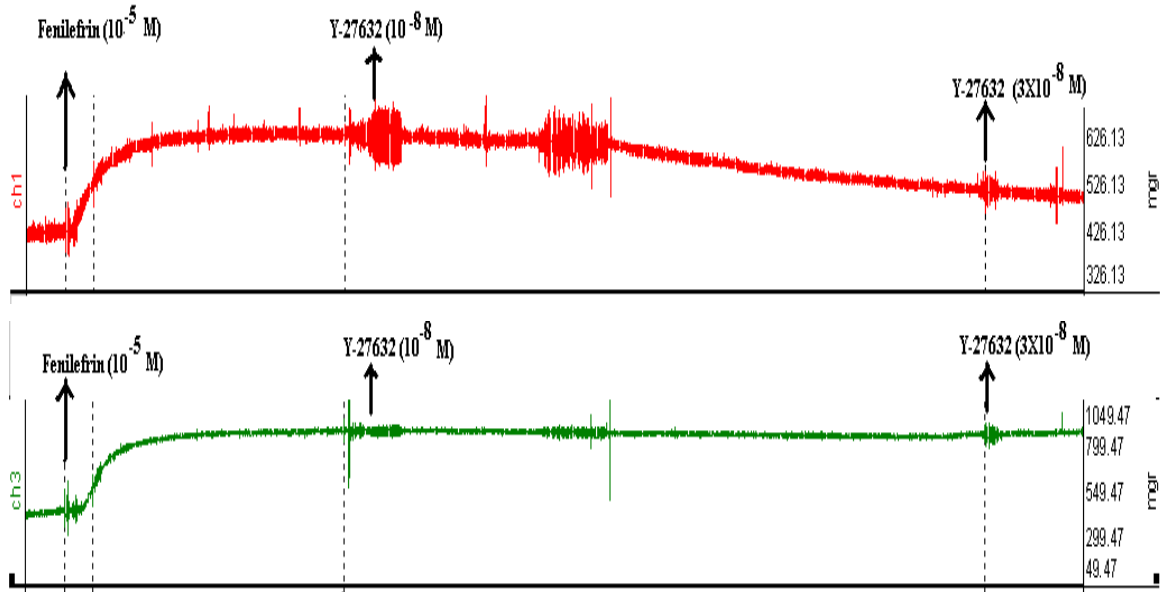
Çalışmadan elde edilen veriler ortalama ve ortalamanın standart hatası (OSH) olarak ifade edildi. Veriler GraphPad Prism Versiyon 4.0 (GraphPad Software Inc., USA) paket programı ile tek yönlü varyans analizi (*One-way ANOVA*) kullanarak değerlendirildi. Gruplar arasında farklılık tespit edilmesi durumunda, farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek üzere “*post hoc*” Bonferroni testi uygulandı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Y-27632 yanıtları

4.1.1: Vajen Dokusunda Y-27632 Yanıtları

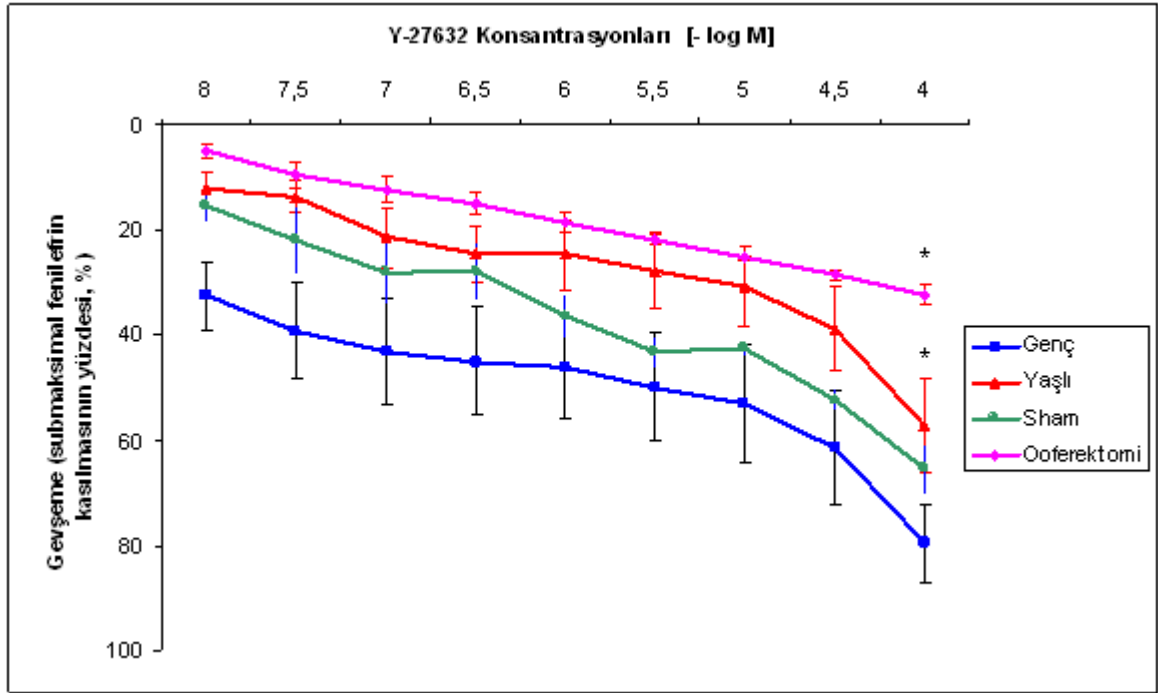
Rho A kinaz inhibitörü, Y-27632 sıçan izole vajen dokusunda tüm gruplarda konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları oluşturdu (Şekiller 4.1, 4.2, 4.3)



Şekil 4.1. Fenilefrin (10^{-5} M) ile prekontrakte olan sıçan izole vajen dokusunda Y-27632 ile gözlenen gevşeme yanıtlarını gösteren örnek traseler. Üstteki (kırmızı) trase genç bir sıçana, alttaki (yeşil) trase oofarektomili bir sıçana aittir. Y-27632 genç sıçanda belirgin gevşeme oluştururken, oofarektomili sıçanda aynı etkiyi göstermedi.

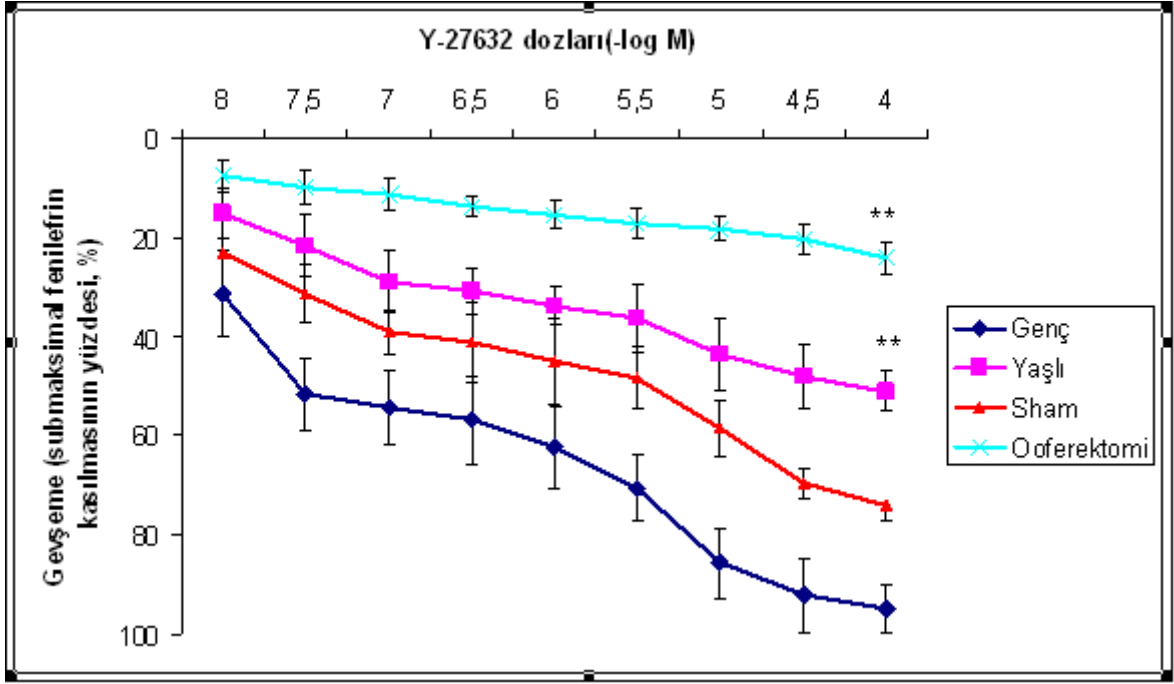
Fenilefrin ile Prekontrakte Edilen Vajen Dokusunda Y-27632 Yanıtları: Prekontrakte dokuda en belirgin gevşeme yanıtları genç ve sham gruplarında gözlenirken, en düşük gevşemeler oofarektomi grubunda gözlemlendi (Şekil 4.2). Yaşlı gruptaki gevşeme yanıtları genç ve sham gruplarından düşüktü, ancak 3×10^{-8} M'da genç grup ile olan farkın dışında anlamlı değildi ($13,57 \pm 3,03$ vs $39,18 \pm 9,18$, $P < 0,05$). Oofarektomi grubundaki gevşeme yanıtları yaşlı gruptakilerden daha düşüktü fakat istatistiksel olarak anlamlı tek fark 10^{-4} M'da saptandı ($32,22 \pm 8,93$ vs $57,09 \pm 1,90$, $P < 0,05$). Genç ve oofarektomi grupları arasında özellikle yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin olmakla beraber tüm konsantrasyonlarda anlamlı fark gözlemlendi. Sham grubunda gözlenen gevşemeler tüm konsantrasyonlarda oofarektomi grubundan yüksek olmasına rağmen anlamlı fark sadece yüksek (3×10^{-5} M ve 10^{-4} M) konsantrasyonlarda saptandı (Şekil 4.2). Yüksek FE konsantrasyonlarına

çıkıldığında diğer gruplardaki gevşeme yanıtlarındaki göreceli artışın, ooferektomi grubunda gözlenememesi dikkat çekici bulundu.



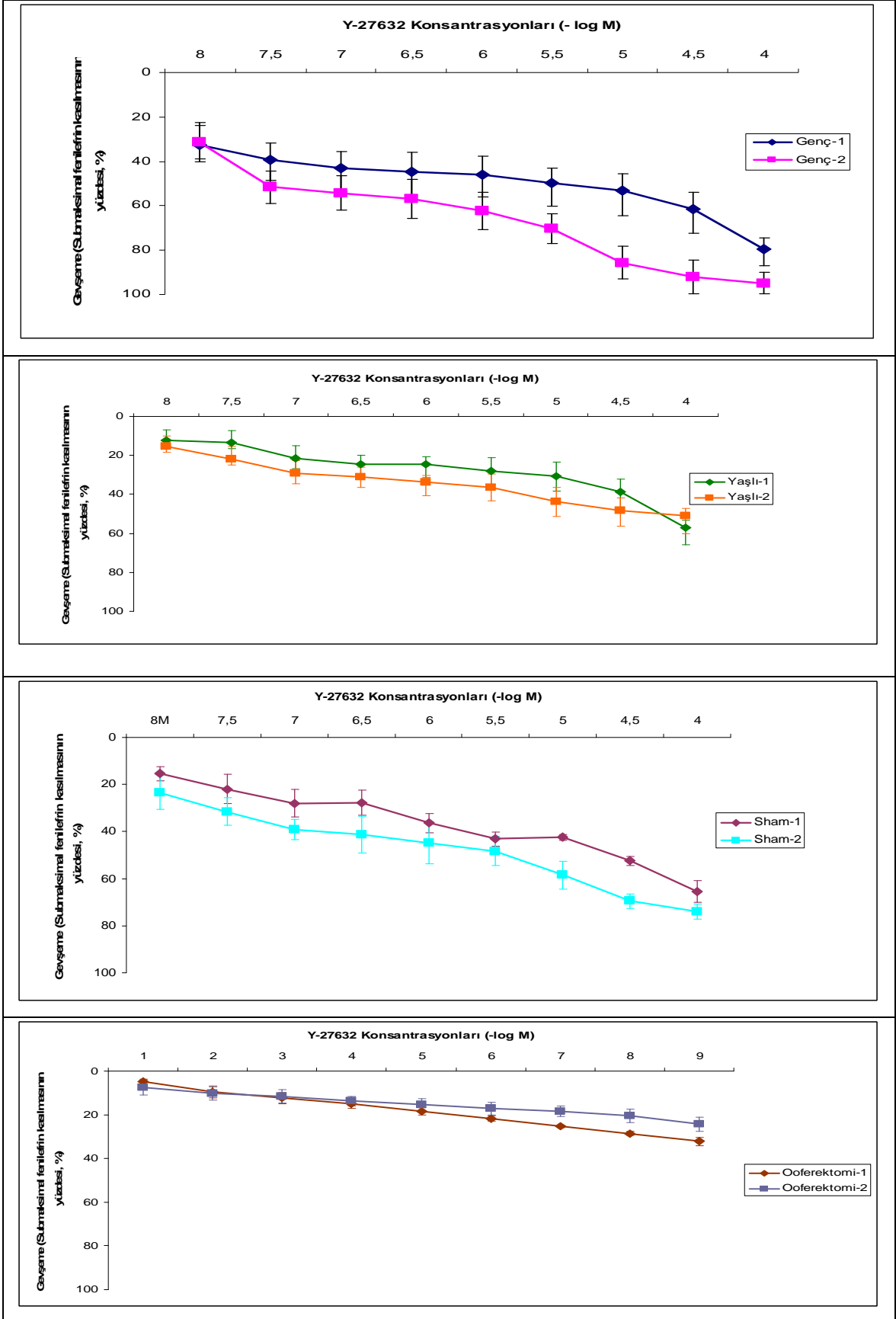
Şekil 4.2. Fenilefrin (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen sıçan izole vajen dokusunda Y-27632 ile oluşan konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları. * $P < 0,05$ genç grubuna göre

Fenilefrin ile Prekontrakte Edilen Vajen Dokusunda Y-27632 Yanıtlarına Adrenerjik, Kolinergik ve Nitreerjik İnhibisyonun Etkisi: Y-27632, tüm gruplarda konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları oluşturdu (Şekil 4.3). Kontrol ve sham grubundaki gevşeme yanıtları birbirine yakın ve diğer iki gruptan daha yüksekti. Yaşlı gruptaki gevşemeler, yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin olmak üzere, tüm konsantrasyonlarda genç grubuna göre anlamlı düşüktü. Ooferektomi grubundaki gevşeme yanıtları da tüm konsantrasyonlarda genç ve sham gruplarına göre belirgin olarak düşüktü. Ooferektomi grubundaki gevşemeler yaşlı gruptan daha düşük olarak gözlenmesine rağmen sadece 10^{-4} M ($32,22 \pm 1,90$ vs $57,09 \pm 8,93$, $P < 0,01$) ve 3×10^{-5} M ($28,50 \pm 0,80$ vs $38,73 \pm 8,01$, $P < 0,01$) konsantrasyonlarda anlamlı bulundu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Fenilefrin (10^{-5} M), ile prekontrakte edilen sıçan izole vajen dokusunda Y-27632 ile oluşan konsantrasyon-bağımlı gevşemeler üzerinde guanetidin (10^{-5} M) + atropin (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-3} M) preinkübasyonları ile adrenerjik, kolinerjik ve nitreerjik sistemlerin inhibisyonunun etkisi. ** $P < 0.01$ genç grubuna göre

Genç, sham ve yaşlı gruplarında adrenerjik, kolinerjik ve nitreerjik antagonistler (GAL; guanetidin + atropin + L-NAME) ile inkübasyon, gevşeme yanıtlarını artırdı. Ooferektomi grubunda ise düşük konsantrasyonlarda gevşeme yanıtlarını etkilemezken, yüksek konsantrasyonlarda gevşeme yanıtlarını azalttı (Şekil 4.4). Ancak, antagonist uygulamalarına bağlı bu farklar hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (Şekil 4.4)



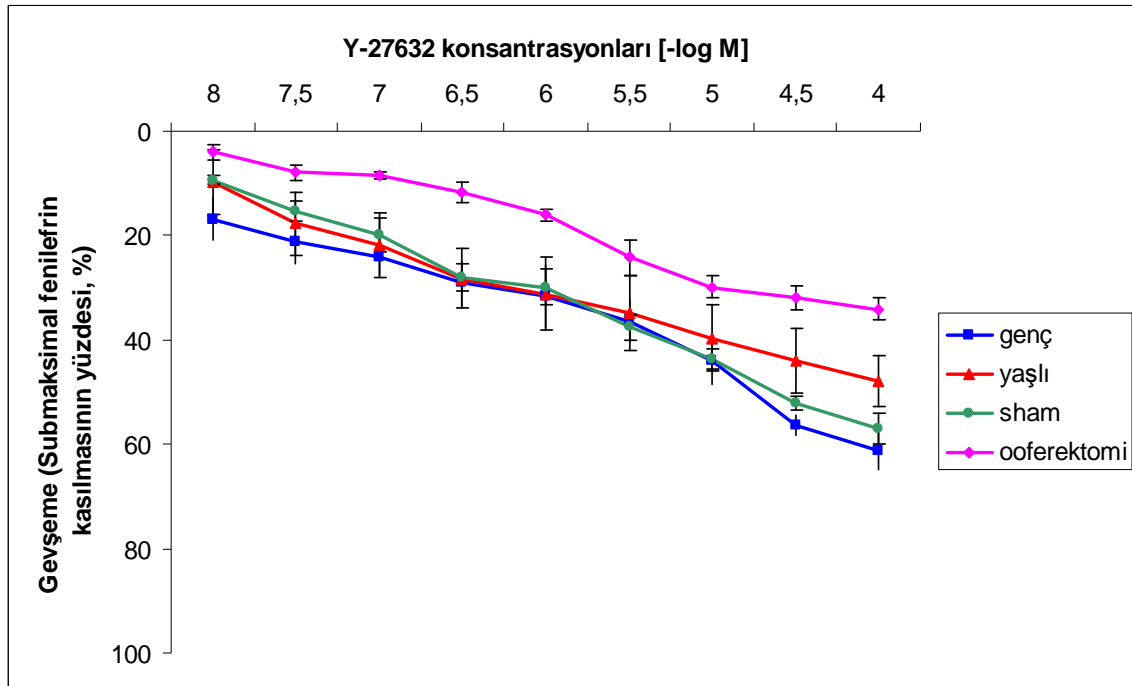
Şekil 4.4. Fenilefrin (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen sıçan izole vajen dokusunda Y-27632 ile oluşan konsantrasyon-bağımlı gevşemeler (gruplar-1) üzerine guanetidin (10^{-5} M) + atropin (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-3} M) preinkübasyonlarının (gruplar-2) etkisi.

4.1.2 Mesane Dokusunda Y-27632 Yanıtları

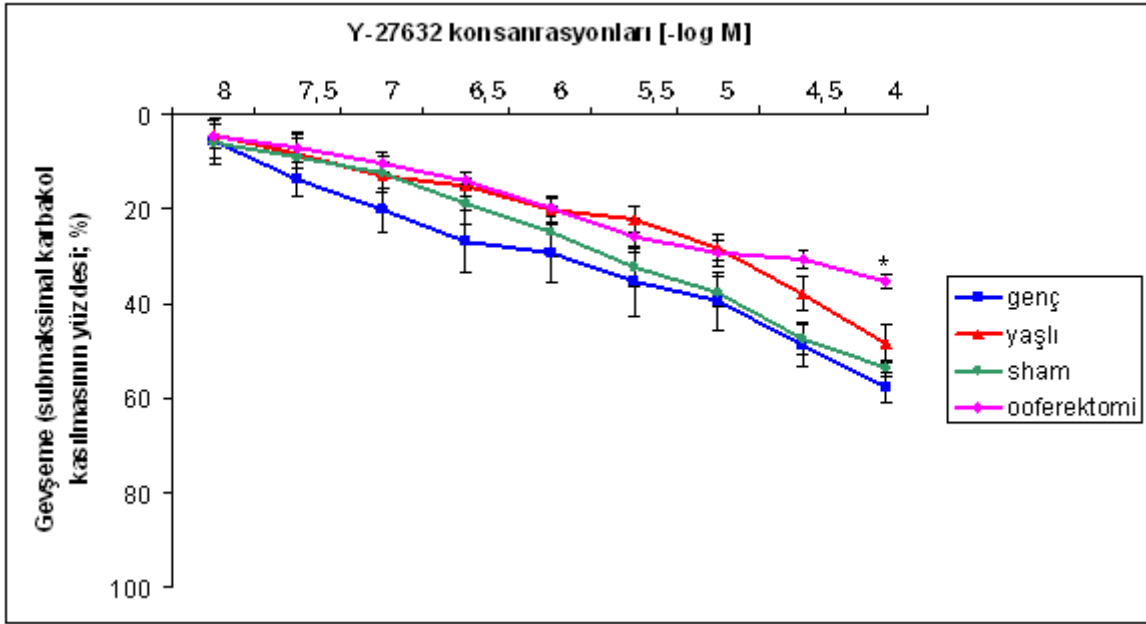
Y-27632, sıçan izole mesane dokusunda da tüm gruplarda konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları oluşturdu (Şekiller 4.5, 4.6).

Karbakol ile Prekontrakte Edilen Mesane Dokusunda Y-27632 Yanıtları: Y-27632 tüm gruplarda konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları oluşturdu. Kontrol, sham ve yaşlı gruplarındaki gevşeme yanıtları arasında istatistiksel fark gözlenmedi. Ooferektomi grubunda ise gevşeme yanıtları diğer üç gruba göre yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin olmak üzere azdı (Şekil 4.5).

Karbakol ile Prekontrakte Edilen Mesane Dokusunda Y-27632 Yanıtlarına Gangliyon Blokajının ve Nitrik Oksit Sentaz İnhibisyonunun Etkisi: Y-27632, gangliyon blokörü heksametonyum ve nitrik oksit sentaz inhibitörü L-NAME ile inkübasyon (HL) sonrasında da tüm gruplarda konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları oluşturdu. Genç gruptaki gevşeme yanıtları, yaşlı ve özellikle ooferektomi gruplarına göre fazla olmasına rağmen, sadece yüksek konsantrasyonlarda (10^{-4} M ve 3×10^{-5} M) genç grup ile ooferektomi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Şekil 4.6)

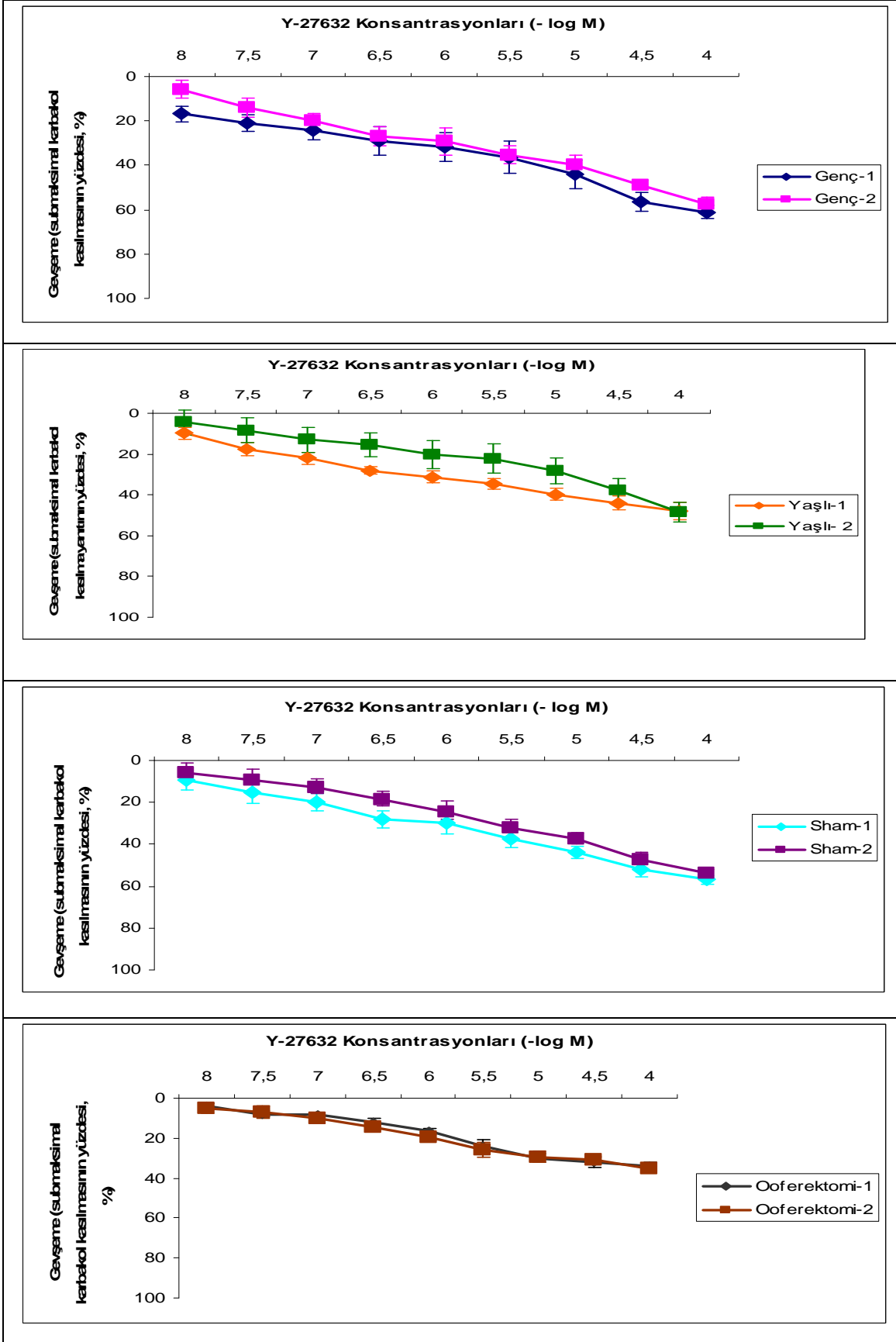


Şekil 4.5. Sıçan izole mesane dokusunda karbakol (10^{-5} M) ile oluşturulan ön-kasılma üzerinde Y-27632 ile meydana gelen konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları.



Şekil 4.6. Karbakol (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen sıçan izole mesane dokusunda Y-27632 ile oluşan konsantrasyon-bağımlı gevşemeler üzerinde heksametonyum (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-3} M) preinkübasyonlarının etkisi. * $P < 0,05$ genç (kontrol) gruba göre

Antagonist (HL) inkübasyonu genç, sham ve yaşlı gruplarındaki gevşeme yanıtlarında azalma eğilimi oluşturdu, ooferektomi grubunda ise belirgin bir farka yol açmadı (Şekil 4.7).

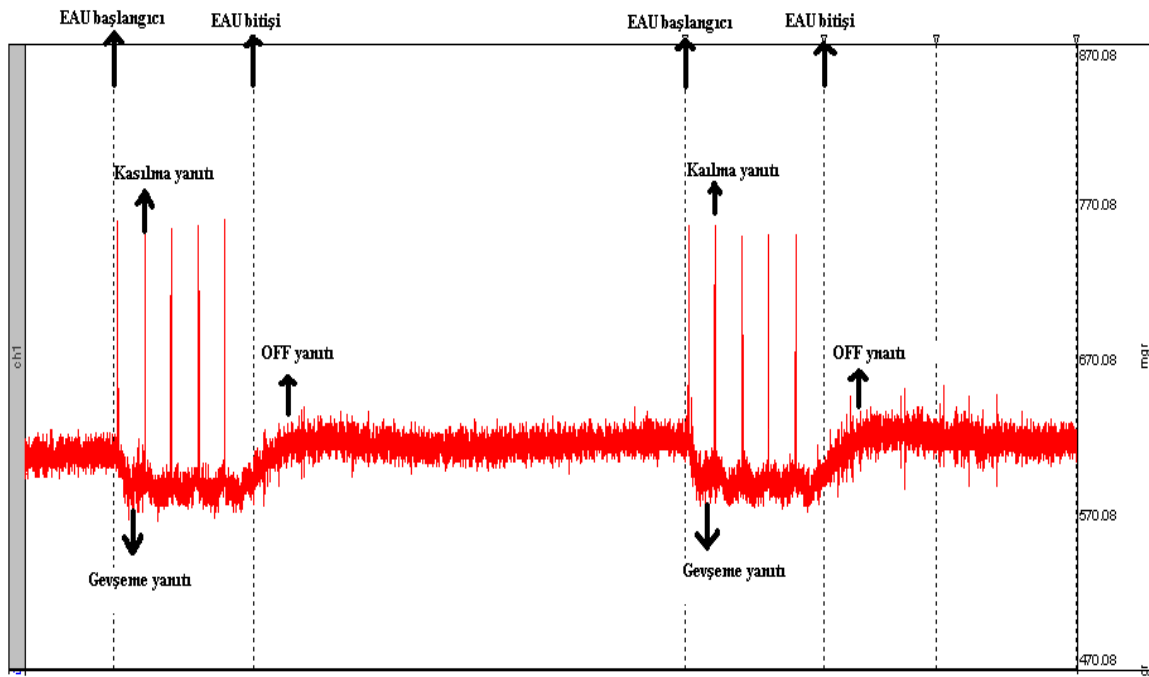


Şekil 4.7. Karbakol (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen sıçan izole mesane dokusunda Y-27632 ile oluşan konsantrasyon-bağımlı gevşemeler (gruplar-1) üzerine heksametyum (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-3} M) preinkübasyonlarının (gruplar-2) etkisi

4.2 Elektriksel Alan Uyarım Yanıtları

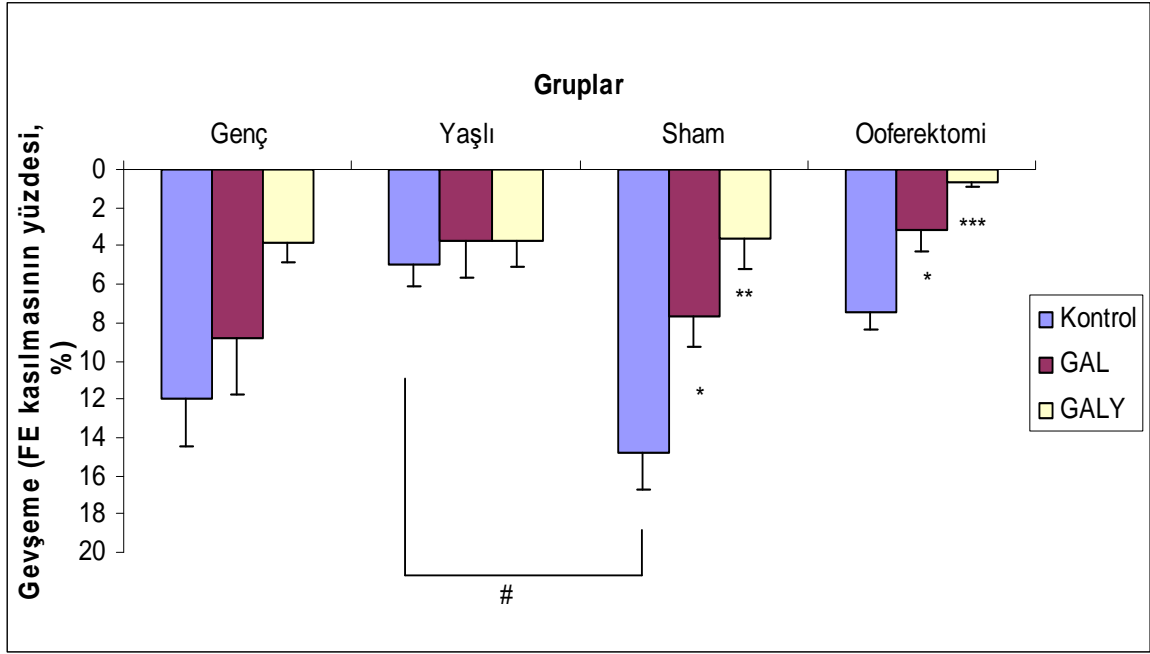
4.2.1 Bazal Gerimdeki Sıçan İzole Vajen Düz Kasında EAU'nun Etkisi

İzole edilen dokudaki intakt sinirleri uyararak eksitasyon-yanıt kenetini taklit etmeyi amaçlayan EAU, istirahat gerimindeki sıçan izole vajen dokusunda önce diken (spike) tarzında fazik bir kasılma, ardından tonik bir gevşeme ve son olarak da uyarı kesilir kesilmez ortaya çıkan tonik bir kasılma (“off”) yanıtı oluşturdu (Şekil 4.8).



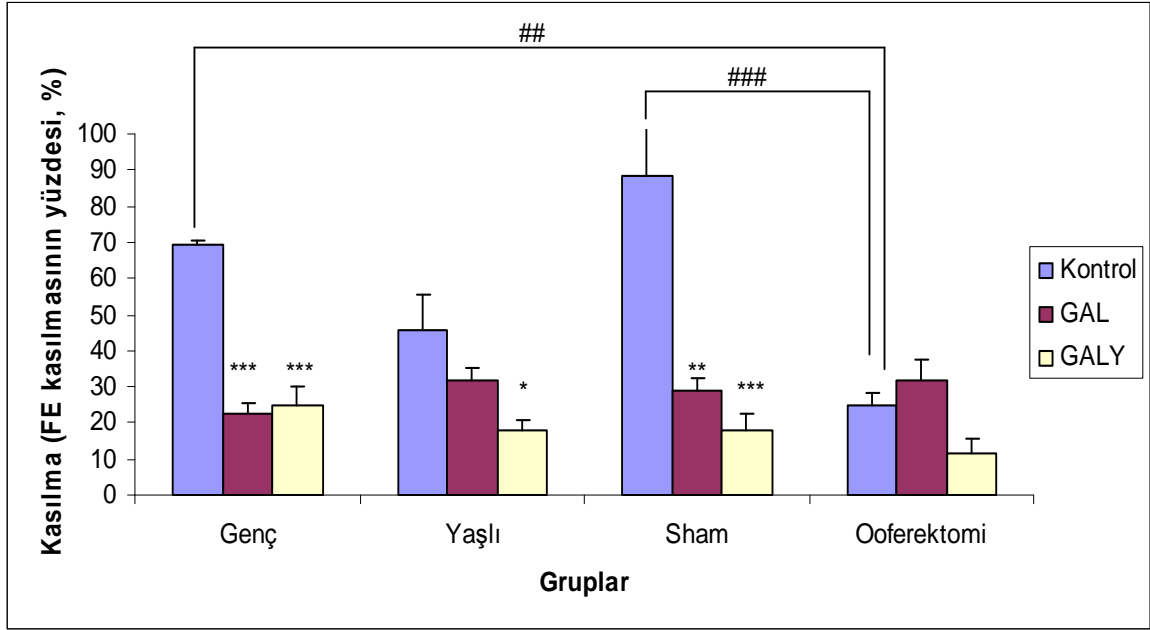
Şekil 4.8. Bazal gerim (istirahat gerimi) altındaki sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan izometrik gerim değişikliklerini gösteren örnek trase.

Gevşeme Yanıtları: Herhangi bir antagonist uygulanmayan (kontrol) vajen preparatlarında EAU'ya yanıt olarak oluşan gevşemelerin, genç ile sham gruplarında benzer biçimde, belirgin, yaşlı ile ooferektomi gruplarında ise benzer biçimde, azalmış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9). Guanetidin (G; 10^{-5} M), atropin (A; 10^{-5} M), L-NAME (L; 10^{-3} M) uygulaması (GAL), bu gevşemeleri tüm gruplarda azaltmakla birlikte, yalnızca sham ve ooferektomi gruplarındaki inhibisyon anlamlı bulundu (sırasıyla, $14,79 \pm 1,9$ vs $7,64 \pm 1,59$ ve $7,40 \pm 0,94$ vs $3,13 \pm 1,11$, $P < 0,05$). GAL + Y-27632 (Y; 10^{-5} M) inkübasyonu (GALY) ise gevşemeleri yaşlı grup dışında tüm gruplarda daha da azalttı. Ancak, yalnızca sham ($14,79 \pm 1,9$ vs $3,57 \pm 1,59$; $P < 0,01$) ve ooferektomi ($7,40 \pm 0,94$ vs $0,62 \pm 0,25$; $P < 0,001$) gruplarındaki azalmalar anlamlı bulundu (Şekil 4.9).



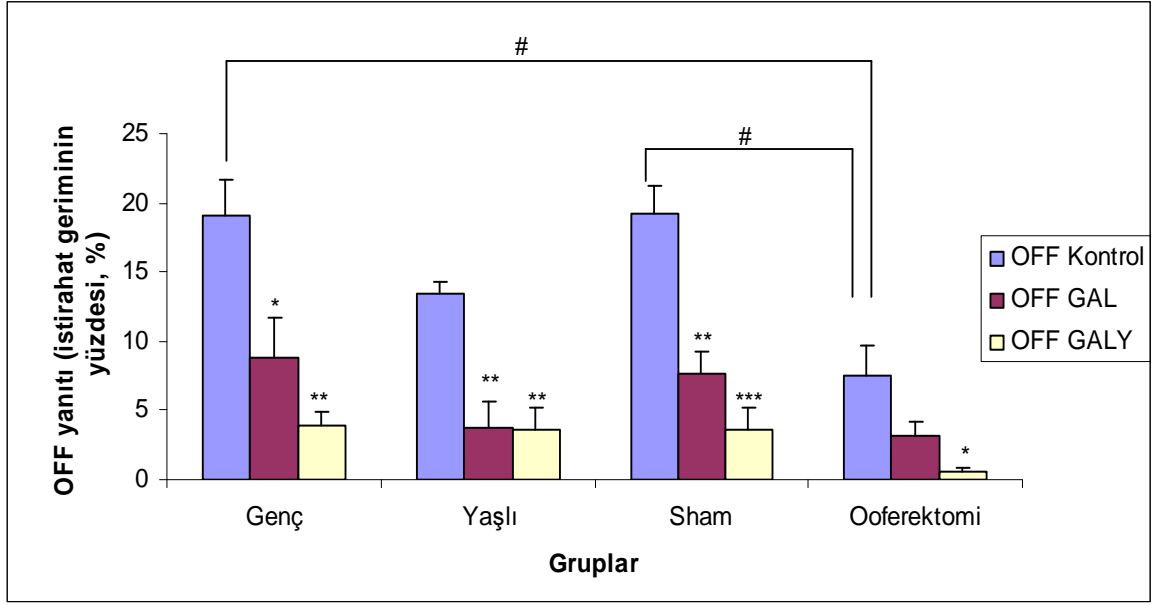
Şekil 4.9. Bazal gerim (istirahat gerimi) altındaki sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan gevşeme yanıtları. Kontrol: herhangi bir antagonist yok, GAL: guanetidin (10^{-5} M) + atropin (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-3} M), GALY: GAL + Y-27632 (10^{-5} M). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (grup içi, kontrole göre), # $P < 0,05$ (gruplar arası)

Kasılma Yanıtları: Herhangi bir antagonist uygulanmayan (kontrol) vajen preparatlarında da EAU ile oluşan kasılma yanıtları açısından genç ile sham, yaşlı ile ooferektomi grupları arasındaki benzer patern dikkat çekici idi (Şekil 4.10). Genç ve sham gruplarındaki kasılmalar, ooferektomi grubundan fazlaydı (sırasıyla, $69,34 \pm 1,22$ ve $88,44 \pm 13,52$ vs $24,90 \pm 3,42$, $P < 0,05$ ve $P < 0,01$). GAL ve GALY inkübasyonları sonrası yapılan EAU'larda gruplar arasında fark yoktu. Genç, sham ve yaşlı gruplarında, GAL ve GALY inkübasyonları kasılma yanıtlarını azaltırken, ooferektomi grubunda belirgin bir değişiklik gözlenmedi. Azalma genç ve sham gruplarında anlamlı bulundu (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Bazal gerim (istirahat gerimi) altındaki sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan kasılma yanıtları. Kontrol: herhangi bir antagonist yok, GAL: guanetidin (10^{-5} M) + atropin (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-3} M), GALY: GAL + Y-27632 (10^{-5} M). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ (grup içi, kontrole göre), ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ (gruplar arası)

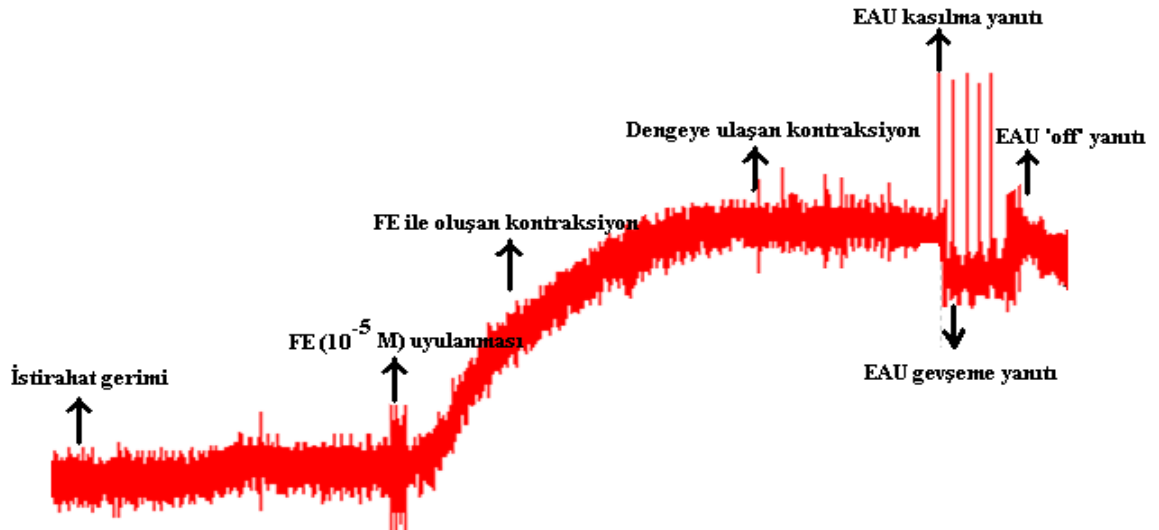
“Off” Yanıtları: Herhangi bir antagonist uygulanmayan (kontrol) vajen preparatlarında EAU sonrası oluşan *off* yanıtlarının, genç ile sham gruplarında yine benzer biçimde ve belirgin, yaşlı ile ooferektomi gruplarında ise benzer biçimde ve azalmış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11). Genç ve sham gruplarındaki yanıtlar ooferektomi grubundan anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla, $19,0 \pm 2,70$ ve $19,25 \pm 2,05$ vs $7,50 \pm 2,16$, $P < 0,05$). GAL ve GALY inkübasyonları, *off* yanıtlarını genç, sham ve yaşlı gruplarında daha belirgin olmak üzere tüm gruplarda azalttı. EAU, GAL ve GALY inkübasyonu sonrasında gruplar arasında belirgin fark oluşturmadı.



Şekil 4.11. Bazal gerim (istirahat gerimi) altındaki sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan *off* yanıtları. Kontrol: herhangi bir antagonist yok, GAL: guanetidin (10^{-5} M) + atropin (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-3} M), GALY: GAL+ Y-27632 (10^{-5} M). * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ (grup içi, kontrole göre), # $P<0,05$ (gruplar arası)

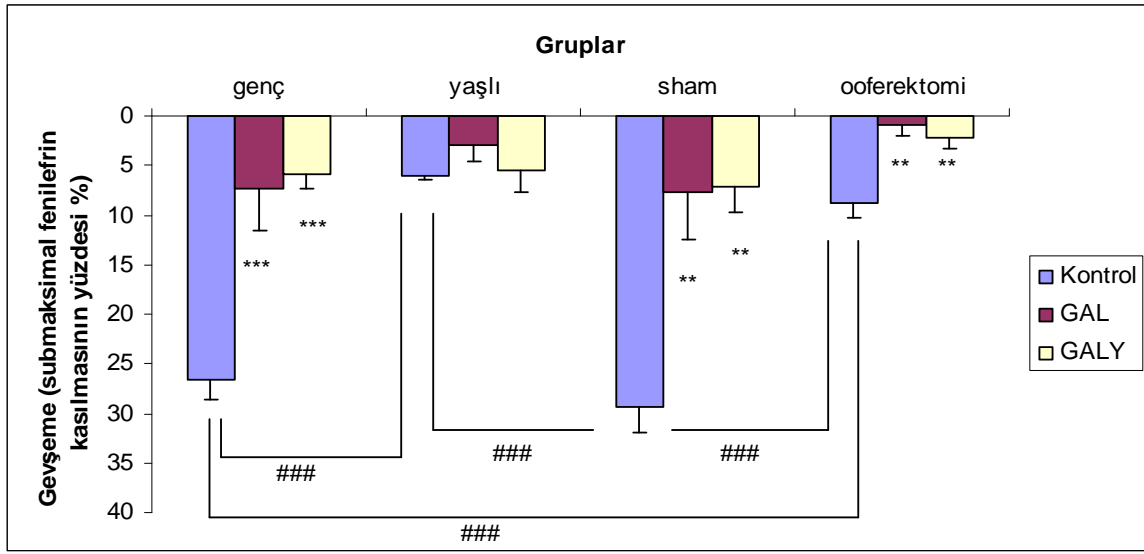
4.2.2 Prekontrakte Sıçan İzole Vajen Düz Kasında EAU'nun Etkisi

Fenilefrin (FE; 10^{-5} M) ile ön-kasılma oluşturulan sıçan izole vajen dokularında EAU, kasılmış dokuda önce gevşeme, sonra kasılma ve *off* yanıtı oluşturdu (Şekil 4.12).



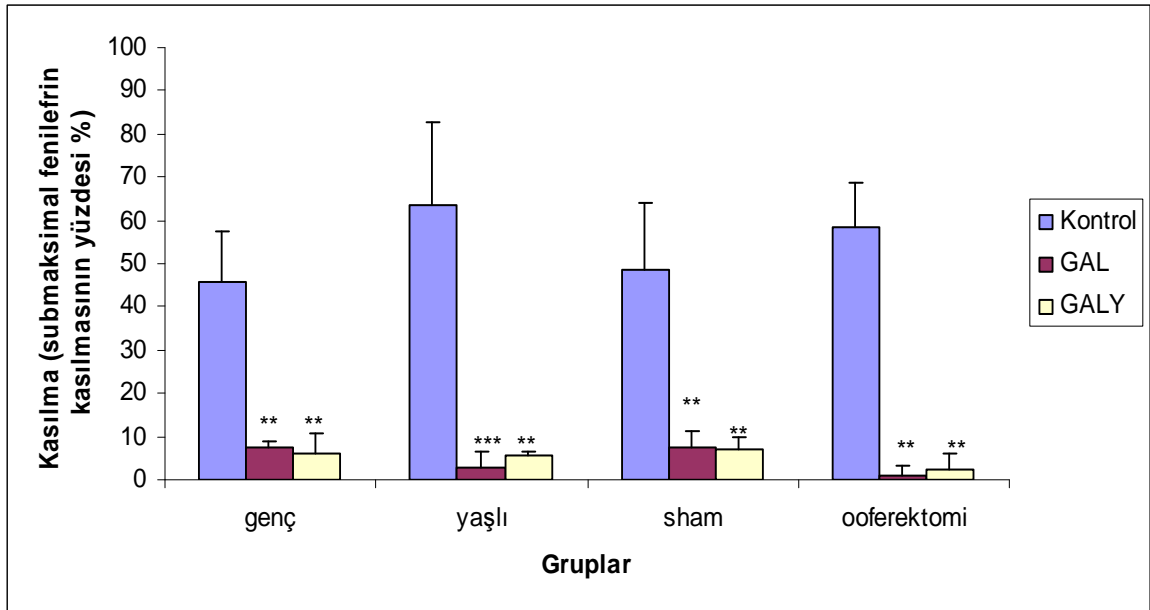
Şekil 4.12. FE (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen sıçan izole vajen düz kasında EAU ile oluşan izometrik gerim değişikliklerini gösteren örnek trase.

Gevşeme Yanıtları: Herhangi bir antagonist uygulanmayan (kontrol), prekontrakte durumdaki vajen preparatlarında EAU oluşan gevşemeler, genç ile sham gruplarında benzer biçimde belirgin (sırasıyla, $26,66 \pm 1,9$ ve $29,29 \pm 2,67$), yaşlı ile ooferektomi gruplarında ise benzer biçimde düşük (sırasıyla, $6,05 \pm 0,33$ ve $8,83 \pm 1,42$) bulundu (Şekil 4.13). Genç ve sham gruplarında gözlenen gevşemeler, yaşlı ve ooferektomi gruplarından anlamlı olarak fazlaydı ($P < 0,001$). GAL ve GALY inkübasyonları, yaşlı grup hariç tüm gruplarda gevşeme yanıtlarını anlamlı olarak azalttı, ooferektomi grubunun yaşlı gruptan farklı yanıtı dikkat çekiciydi (Şekil 4.13).



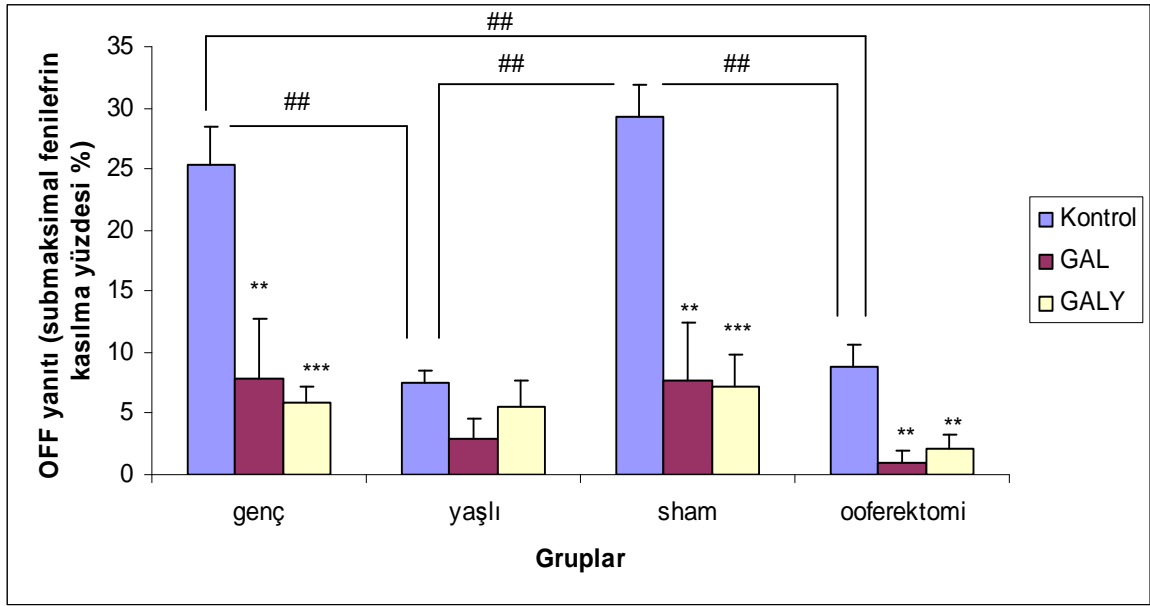
Şekil 4.13. Fenilefrin (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan gevşeme yanıtları. Kontrol: herhangi bir antagonist yok, GAL: guanetidin (10^{-5} M) + atropin (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-3} M). GALY: GAL + Y-27632 (10^{-5} M). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (grup içi, kontrole göre), ### $P < 0,001$ (gruplar arası)

Kasılma Yanıtları: Fenilefrin ile prekontrakte edilen sıçan izole vajen dokularında EAU sonrası gevşeme yanıtını takiben oluşan kasılma yanıtlarında grupların arasında bir fark gözlenmedi (Şekil 4.14). GAL inkübasyonu tüm gruplarda kasılma yanıtlarını anlamlı olarak azaltırken, GALY inkübasyonunun ek bir inhibisyon oluşturmaması prekontrakte dokuda EAU'ya bağlı kasılmalarda Rho-kinaz yolağının rolü olmadığını düşündürdü (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Fenilefrin (10^{-5} M) ile prekontakte edilen sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan kasılma yanıtları. Kontrol: herhangi bir antagonist yok. GAL: guanetidin (10^{-5} M) + atropin (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-3} M). GALY: GAL+ Y-27632 (10^{-5} M). ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ (grup içi, kontrole göre)

“Off” yanıtları: Herhangi bir antagonist uygulanmayan (kontrol), prekontrakte durumdaki vajen preparatlarında EAU oluşan *off* yanıtları genç ile sham gruplarında benzer biçimde belirgin (sırasıyla, $25,34\pm3,04$ ve $29,29\pm2,67$), yaşlı ve ooferektomi gruplarında ise benzer biçimde düşük (sırasıyla, $7,59\pm0,93$ ve $8,80\pm1,78$) bulundu (Şekil 4.15). Genç ve sham gruplarında gözlenen *off* kasılmaları, yaşlı ve ooferektomi gruplarından anlamlı olarak fazlaydı ($P<0,01$). GAL ve GALY inkübasyonlarının, yaşlı grup hariç tüm gruplarda *off* kasılmalarını anlamlı olarak azaltması, yaşlılarda prekontrakte dokuda EAU ile oluşan *off* kasılmalarında adrenerjik, kolinerjik, nitreerjik sistemlerin ve Rho-kinaz yolağının rol oynamadığını düşündürdü (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Fenilefrin (10^{-5} M) ile prekontakte edilen sıçan izole vajen dokusunda EAU ile oluşan *off* yanıtları. Kontrol: herhangi bir antagonist yok. GAL: guanetidin (10^{-5} M) + atropin (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-3} M). GALY: GAL+ Y-27632 (10^{-5} M). ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ (grup içi, kontrole göre), ## $P<0,01$ (gruplar arası)

5. TARTIŞMA

Son yıllarda erkeklerdeki ereksiyon fizyolojisinin daha iyi anlaşılması, erektil disfonksiyonda psikojenik oranın tahmin edilenin çok altında tesbit edilmesi ve erektil disfonksiyonun PDE5 inhibitörleriyle %60-70 gibi yüksek oranlarda tedavi edilmesi araştırmaları kadın cinsel işlev bozukluğuna (KCİB) yönlendirmiştir. KCİB, kadınların önemli bir kısmını etkileyen, yaş ile ilişkili ve ilerleyici bir sağlık problemidir (62). ABD’de yapılan bir çalışmada, Ulusal Sağlık ve Sosyal Yaşam Araştırmasına katılan 1749 kadının %43’ü cinsel işlev bozukluğu ile ilgili yakınmalar bildirmiştir (1). KCİB vajinal lubrikasyon ve vajinal duvar gevşemesinde azalma ve klitoral genişlemenin bozulması ile karakterizedir ve tüm bu durumlar düz kas gevşemesindeki bozulmayla ilişkilidir (62).

Yapılan araştırmalar düz kas kasılma fizyolojisinde, Ca^{2+} -bağımlı mekanizmaların dışında bir mekanizmanın olduğunu ve bunun hücre içi Ca^{2+} artışından bağımsız olarak düz kasta kasılmaya yol açtığını göstermiştir (9, 10). Bu mekanizma Rho-kinaz yolağı ile ilişkilidir ve MHZ fosfataz üzerinden etki göstermektedir (11). Birçok doku düz kasında Rho proteinleri gösterilmiş ve farmakolojik ajanlara yanıtı incelenmiştir (20-22). Bu dokuların başında vasküler ve penil kavernoza düz kaslar gelmektedir (13, 21, 29). Araştırmacılar, ilerleyen yaşla birlikte artan vasküler hastalıklardan Rho-kinaz yolağının aktivitesindeki artışın sorumlu olabileceğini belirtmektedirler (24) . KCİB’da oldukça önemli olan vajinal düz kasın bu yolakla olan fonksiyonel ilişkisi hakkında tek çalışma Celtek tarafından yapılmıştır (50).

Son yıllarda Rho kinaz yolağının erkek cinsel fonksiyon bozukluğundaki rolüyle ilgili yapılan çalışmalarda bir artış görülmektedir. Bu ilgi, PDE5 inhibitörlerini kullanıp da fayda göremeyen %30-40’lık bir hasta grubunda “acaba farklı bir medikal tedavi imkanı var mıdır” sorusuna cevap arayan araştırmacıların ilgisini Rho-kinaz yolağına çevirmesinden kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalarda ereksiyon bozukluğunun etyolojisinde yer alan hipertansiyon, diyabet, hipogonadizm gibi tablolarda Rho-kinaz aktivitesinde ciddi bir artış olduğu gözlenmiştir (39, 40). Spesifik Rho-kinaz antagonisti Y-276232’nin verilmesiyle penil kavernoza düz kas gevşeme yanıtlarında düzelme gözlenmiştir. Yazarlar Rho-kinaz antagonistlerinin ümit verici bir tedavi alternatifi olduğu konusunda görüş birliğine varmışlardır (39, 40).

“Acaba erkek cinsel disfonksiyonunda olduğu gibi, kadın cinsel disfonksiyonunda da Rho-kinaz yolağının aktivitesinde artıştan söz edilebilir mi? Seks steroidlerinin Rho-kinaz yolağının düzenlenmesindeki rolü nedir?” Çalışmamızda bu soruların yanıtını bulmaya çalıştık.

Yapılan araştırmalar kadın cinsel fonksiyonunda seks steroidlerinin oldukça önemli rol oynadığını göstermiştir. Seks steroidlerinin azaldığı fizyolojik ve cerrahi menopoza birlikte kadın cinsel işlev bozukluğunda ciddi bir artış tespit edilmiştir (44). Seks steroidleri genital organlarda yapısal düzenlemenin yanı sıra santral ve periferik reseptörler düzeyinde de düzenlemeler yaparak düz kas gevşeme ve kasılma yanıtlarını etkilemektedir (44).

Cerrahi menopoza fizyolojik açıdan metabolizmada ciddi bir strese neden olmaktadır. Kastre edilen kadında overlerin çıkartılmasına bağlı olarak sadece östrojen düzeyi değil, aynı zamanda androjen düzeyinde de belli bir oranda düşüş meydana gelir. Ortaya çıkan bu ani farklılaşma sadece klinik olarak değil, metabolik olarak da kadını etkilemektedir. Cerrahi menopoza, doğal menopoza görülen ve kadının bu duruma belli oranda uyum göstermesini sağlayan geçiş süreci hiç yaşanmamaktadır. Periferik kandaki testosteron düzeyi overektomize kadınlarda overleri olan postmenopozal kadınlara göre düşük düzeydedir. Bu konuyla ilgili 2009 yılında yayınlanan bir makalede Korse ve ark. 35’i cerrahi, 40’ı fizyolojik menopoza olan toplam 75 kadın hastadan almış oldukları kanda testosteron düzeylerini incelemişler ve sonucunda cerrahi menopoza kadınlarda testosteron düzeylerinin doğal menopozdaki kadınlara göre çok daha düşük olduğunu ve fizyolojik menopoza kadınlarda overlerin direkt veya indirekt testosteron üretimine ciddi katkısının olduğunu belirtmişlerdir (3). Bir başka çalışmada ise Stahl ve arkadaşları kadınlarda dolaşımdaki testosteronun ana kaynağının overler olduğunu belirtmektedirler (94).

Son zamanlarda, kastrasyonla ilişkili ereksiyon bozukluğu gelişiminde Rho-kinaz sinyal yolağının rolü araştırılmıştır (40). Bu deneylerde, kavernoza dokudaki Rho-kinaz proteininin kastre edilmiş sıçanlarda önemli ölçüde *up-regüle* olduğunu göstermiştir. Testosteron hormonunun Rho-kinaz yolağı üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olabileceği ve bu hormonun azalmasıyla Rho-kinazın aktivasyonunun artabileceği ve hipogonadizmdeki erektil disfonksiyonda bunun sorumlu olabileceği belirtilmiştir. Rajesekaran ve ark.yaşlı erkek sıçanlarda Rho-kinaz yolağının aktivitesindeki artışın

yaşlanmayla ortaya çıkan ereksiyon bozukluğunun sorumlusu olabileceğini belirtmişlerdir (106).

Bu tez çalışmasında fenilefrin ile prekontrakte edilen vajen dokusunda Rho-kinaz antagonisti Y-27632 ile konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları gözlemlendi. Bu bulgu, Cellek'in tavşan izole vajen ve klitoris dokusunda yaptığı çalışma ile uyumlu bulundu. Cellek izole ettiği tavşan vajen ve klitoral dokularında izole organ banyosu deneyleri ile Y-27632 ile konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtlarını ilk gözlemleyen araştırmacıdır (50).

Bu tez çalışmasında genç gruptaki Y-27632 gevşemesiyle yaşlı grup arasında anlamlı bir fark bulunmazken, genç grupla ooforektomize grup arasında anlamlı fark gözlemlendi. Bu da testosteronun azalmasıyla gevşeme yanıtlarının azaldığını ve testosteronun vajen dokusunda gevşeme yanıtları üzerine östrojen'den daha etkili olduğunu düşündürdü. Bu bulguyu destekler nitelikte, Kim ve arkadaşlarında (62) ooforektomi yaptıkları tavşanları 2 hafta sonra, 2 gruba ayırıp bir gruba testosteron, diğer gruba östrojen replasmanı uygulamıştır. Replasmanı takiben vajen dokusunda yapılan EAU ve izole organ banyosu çalışmalarında testosteronun gevşeme yanıtlarında öncelikli etkili steroid olduğunu ve östrojenin ise gevşeme yanıtlarını değiştirmedeğini fakat vajinal epitelin sağlığı açısından oldukça önemli bir steroid olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında da ooforektomi yapılan grupta Y-27632 ile oluşan gevşeme yanıtlarının diğer gruplara kıyasla oldukça düşük olması ve yaşlı gruptaki gevşeme yanıtlarının genç grup ile arasında anlamlı fark olmaması, testosteronun Rho kinaz yolağında da asıl etkili seks steroidi olduğunu düşündürmektedir. Testosteron azaldığı zaman Rho kinaz aktivasyonu artmakta ve ooforektomize sıçanlarda Y-27632 yeterli düzeyde gevşeme yapamamaktadır. Bu bulgu literatürdeki hipogonad sıçanlarla yapılan çalışmalarla uyumludur.

Sempatik (S), parasempatik (PS) ve nitrejik (N) yolların blokajıyla ooforektomi grubu dışındaki tüm gruplarda gevşeme yüzdeleri arttı. Bu da S, PS ve N yollardan bir veya birkaçının vajende bazal bir kasılma tonusu yarattığını düşündürdü. (genç, yaşlı ve sham de). Oh ve ark.'nın tavşanlarda yaptığı bir çalışmada EAU ile sağlanan kontraksiyonların metoprolol (beta adrenerjik reseptör blokörü) ve prazosin (alfa adrenerjik reseptör blokörü) tarafından engellenirken, atropin (kolinerjik muskaninik reseptör antogonisti) ile engellenmediği gözlenmiş, sonuç olarak tavşan vajinasındaki kontraktıl fonksiyonun esas

olarak sempatik sistemin kontrolünde olduğunu belirtilmiştir (95). Azadzo ve ark. da tavşan vajen ve klitoral düz kasında EAU ve fenilefrinle elde edilen kontraktıl yanıtların prazosin ile belirgin olarak inhibe edildiğini, yohimbin (non-selektif alfa adrenerjik reseptör blokörü) ve propranolol (beta adrenerjik reseptör blokörü) ile kasılma yanıtında önemli bir azalma meydana gelmediğini saptamışlardır (96). Bu bilgiler ışığında bu tez çalışması da kasılma tonusundan sempatik sistemin sorumlu olduğunu ve bu sistemin blokajıyla tonusun azaldığını düşündürmektedir. Genç grupta diğer gruplara göre bu yolların blokajıyla gevşeme yüzdesindeki artışın daha belirgin olması bu grupta adrenerjik aktivitenin daha aktif rol oynadığını düşündürmektedir.

Ayrıca, NO yolağının blokajına rağmen Y-27632 aracılı gevşeme yanıtlarının artması, Rho kinaz yolağının nitrerjik yolaktan bağımsız olabileceğini ve vajen dokusunda NO'nun gevşemeden sorumlu öncelikli aracı olmadığını düşündürmektedir. Nitrerjik yolağın Rho kinaz ile olan ilişkisi ve penil kavernoza dokuda gevşeme yanıtlarında oldukça etkili olan NO'nun vajende aynı düzeyde etkili olmaması oldukça güncel konulardır. Bu konulardaki literatür incelendiğinde, RK yolağının vajen ve klitoral dokuda araştıran tek çalışmayı yapan Cellek, organ banyosuna eklediği NOS inhibitörünün Y-27632 ile oluşan gevşeme yanıtlarında herhangi bir değişikliğe yol açmadığını göstermiş ve bu tez çalışması ile uyumlu biçimde Rho kinaz ile nitrerjik yolağın birbirinden bağımsız olduğunu belirtmiştir (50). Yine, aynı çalışmada, vajen dokusunda NO'nun NANC gevşeme yanıtlarının görece az bir kısmından sorumlu olmasına rağmen, klitoral kavernoza dokuda bu oranın oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir (50). Vajen dokusu dışında yapılan çalışmalarda ise NO'nun Rho kinaz aktivasyonunu inhibe ettiği fonksiyonel ve moleküler düzeyde gösterilmiş ve birçok yazar bu iki yolağın birbirini etkilediklerini ve aralarında bir denge olduğunu belirtmişlerdir. Bunu destekler nitelikte en önemli çalışmalardan bir tanesinde Chitaley ve ark. endoteli uzaklaştırılmış aorta dokusunda, endoteli sağlam olanlara göre Y-27632'nin daha az gevşeme yanıtına yol açtığını, endoteli olmayan aortaya NO ilavesiyle gevşeme yanıtlarının arttığını göstermişlerdir. Yazarlar bu bulgular sonucunda intakt sıçan aortasında nitrik oksidin Rho-kinazın kastırıcı aktivitesini inhibe ederek gevşeme oluşturduğunu ve böylece iki yolak arasında direkt bir bağlantı olduğunu belirtmişlerdir (30).

Ön deneylerimiz sırasında vajenden sirküler ve longitudinal, ayrıca distal ve proksimal vajen olmak üzere çeşitli kesitler alınıp izole organ banyosunda FE ile kasılma, papaverin

ile gevşeme yanıtları incelendi. Longitudinal ve proksimal kesitlerde yeterli bir kasılma ve gevşeme yanıt görülmezken, distal vajenden alınan sirküler kesitlerin FE ve papaverine oldukça iyi yanıt verdiği saptandı. Literatürde Girdali ve arkadaşları da distal vajenden almış oldukları sirküler kesitin FE ve karbakol ile kasıldığını fakat aynı yanıtı proksimal vajen kesitlerinin vermediğini belirtmişlerdir (45). Aynı bulguları Önel ve arkadaşları da teyit etmişler fakat distal vajende karbakole karşı herhangi bir yanıt görememişlerdir (97). Yazarlar farklı embriyolojik kökenler doğrultusunda proksimal ve distal vajen inervasyonunda farklılıklar bulunduğunu ve her iki bölgenin kasılma ve gevşeme yanıtlarında farklı nörotransmitterlerin rol aldığını belirtmişlerdir.

Bu tez çalışmasında, vajen dokusunda EAU yanıtları trifazik olarak gözlemlendi. Öncesinde gevşeme, ardından bir kasılma ve *off* yanıtı gözlemlendi. Literatürde daha önceki çalışmaların hiç birinde *off* yanıtından bahsedilmemektedir. Bu tez çalışması bu yönden bir ilktir. Girdali ve Önel, çalışmamızdaki bulgulara paralel olarak vajen dokusuna EAU uygulayarak önce gevşeme, ardından kasılma yanıtı gözlemlemişlerdir (45, 97). Günümüzde kadın cinsel fonksiyonunda vajenin gevşemesi kadar kasılmasının da önemli olduğu bilinmektedir. Bohlen ve ark. tarafından manüel yolla kendini uyararak orgazm olan kadınlarda vajinanın düzenli kontraksiyonları gösterilmiştir(98). Yazarlar kasılmanın vajinal düz kasın gevşemesi kadar önemli olduğunu ve kasılma paterninin anlamlı olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışma vajenin kasılma yanıtlarının da iyi değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasında EAU 'ya yanıt olarak vajen dokusunun genç grupta yaşlı ve cerrahi menopoz gruplarına göre daha iyi gevşediği fakat kasılma yanıtlarının tüm gruplarda birbirine yakın olduğu saptandı. Bu da seks steroidlerinin vajen dokusunda gevşeme yanıtları üzerinde düzenleyici etkilerinin olmasına rağmen, kasılma yolağı (adrenerjik aktivite) üzerinde belirgin bir değişiklik yapmadıklarını düşündürmektedir. Kim ve arkadaşlarının steroid hormonların vajinal düz kas üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmaları da bu bulguyu destekler niteliktedir. Yazarlar adrenerjik kasıcı yanıtın seks steroid hormon değişikliklerine dirençli olduğunu belirtmişlerdir (62). Bu tez çalışmasında sempatik blokaj sonrası kasılma yanıtlarının belirgin olarak azalmasına rağmen tamamen kaybolmaması, kasılma yanıtında adrenerjik sistem dışında başka nörotransmitterlerin de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Yine, nitrenerjik blokaj sonrası gevşeme yanıtlarının tüm gruplarda azalmasına rağmen tamamen kaybolmaması, vajen dokusunda NO dışında

gevşemeden sorumlu yolaklar olduğunu düşündürmektedir. Azadzo ve ark.'nın tavşanda yaptıkları çalışmalarda VIP ve NO donörleriyle vajen dokusunda belirgin bir yanıtın oluştuğu ancak EAU ile sağlanan gevşeme yanıtında NOS ve VIP reseptör antagonistleri ile azalma oluşmadığı saptanmış, vajen dokusunun gevşemesinde NO ve VIP dışındaki başka sistemlerin rol oynayabileceği belirtilmiştir (96). Oh ve ark. tarafından tavşanda yapılan başka bir izole organ banyosu çalışmasında NANC aracılı vajinal düz kas gevşeme yanıtının L-NAME veya L-NNA (NOS inhibitörü) ile tam olarak inhibe edilemediği ve NO donörleriyle artırılmadığı saptanmış ve NANC aracılı gevşeme yanıtında rol oynayan başka majör nörotransmitter sistemlerinin bulunduğu belirtilmiştir (95).

Bu tez çalışmasında, gevşeme yanıtlarındaki genç grupla yaşlı ve ooferektomi grupları arasındaki farkın sempatik, parasempatik, nitrerjik sistemlerin blokajına rağmen devam ettiği fakat bu yolakların üstüne bir de Rho-kinaz enzim inhibisyonu eklendiğinde gruplar arasındaki farkın ortadan kalktığı gözlemlendi. Bu bulgu da gruplar arasında oluşan bu farkın Rho kinaz yolağı aracılığıyla sağlandığını düşündürmektedir.

Kadınlarda genital ve üriner sistem organları seks steroidlerine karşı oldukça duyarlıdır. Bunun muhtemel sebebi embriyolojik oluşum sırasındaki yakın ilişkidir (2). Kadında alt üriner sistemi oluşturan pelvik bölge, üretra ve mesane, taşıdıkları östrojen reseptörleri nedeniyle östrojene duyarlıdır. Menopoz sonrası östrojenin azalmasıyla alt üriner ve genital sistemde kan akımında azalma, mukozal atrofi ve adrenerjik yanıtlara karşı azalma gözlenmektedir. Kadınlarda iritatif üriner semptomların yaşla birlikte özellikle de postmenopozal dönemde artması, bu semptomların temelinde östrojen hormonunun eksikliği olduğunu düşündürmektedir. Iosif ve Bekassy 1200 postmenopozal kadında iritatif semptom oranını oldukça yüksek (%49) bulmuşlardır (2). Östrojenin bu iritatif semptomları gidermede etkinliği sıkça araştırılmış, subjektif olarak bir iyileşmeden bahsedilse de bu objektif verilerle desteklenememiştir.

Wibberly ve ark. sıçan mesane şeritlerinde karbakol, ATP ve nörokinin ile oluşturulan kasılma yanıtlarının Y-27632 ile gevşediğini göstermişler ve mesanedeki Rho-kinazın diğer sıçan dokularından (beyin, böbrek, karaciğer, çizgili kas gibi) daha fazla düzeyde olduğunu belirtmişlerdir (72). Bing ve ark. ise mesanede Rho-kinazı göstermişlerdir (99).

Normotansif sıçanlarla kıyaslandığında hipertansif sıçanların artmış işeme sıklığı, azalmış mesane kapasitesi ve işeme volümü ve artmış sempatik sistem aktivasyonuna sahip oldukları Persson ve ark. tarafından gösterilmiştir (100). Rajesekaran ve ark. hipertansif sıçanlarda gözlenen bu iritatif üriner semptomlardan, artmış Rho-kinaz aktivasyonunun sorumlu olduğunu göstermişlerdir (101).

Vasküler patolojilerin ortaya çıkmasında Rho-kinaz yolağının aktivasyonundaki artışın önemli olduğu gösterilmiştir. Hiroki ve arkadaşları östrojenin vasküler düz kasta Rho-kinazı baskıladığını ve bunun da postmenopozal artan kardiyovasküler hastalıklardan sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir (102). Aynı mantık postmenopozal artan iritatif işeme semptomları için alt üriner sistemde de geçerli olabilir.

Bu tez çalışmasında mesane şeritlerinde karbakol kasıcı yanıtı üzerine Y-27632 ile konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları gözlemlendi. Genç ve yaşlı grup arasında gevşeme yanıtlarında anlamlı fark olmamasına rağmen, genç ve ooferektomi grubu arasında anlamlı fark saptandı. Testosteronun Rho-kinaz üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu, ooferektomi ile azalan testosteronun bu etkisinin ortadan kalktığı düşünüldü. Böylelikle Rho-kinaz yolağının aktivasyonunun arttığı, mesanede kasılma ve gevşeme dengesinin kasıcı yollar lehine değiştiği iddia edilebilir. Literatürde testosteronun mesane fonksiyonları üzerinde düzenleyici bir etkisinin olduğundan bahseden çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Lin ve ark. tavşanlara ooferektomi yapmadan oral letrozol (östrojen sentezini önleyen kuvvetli bir aromataz inhibitörü) tedavisi uygulamışlar ve sonuçta testosteronun mesane kasılması ve histomorfolojisi üzerinde etkili bir hormon olduğunu belirtmişlerdir (103). Literatürde testosteronun mesane üzerindeki bu etkisini destekler diğer bir çalışmada Madeiro ve ark., androjenlerle kombine verilen östrojenin mesanede kanlanmayı artırdığını, epitelde kalınlaşmaya ve kas liflerinin kalitesinde artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir (107).

Yaşlanma ile mesane kasılması üzerine yapılan hayvan deneylerinde ortak bir görüş yoktur ve çelişkili sonuçlar mevcuttur. Lieu ve ark, izometrik gerime getirilmiş sıçan detrusor kasının asetilkoline karşı yanıtında yaşla ilgili bir farkın olmadığını tespit etmişlerdir (90). Buna karşı, Munro ve arkadaşları, yaşlanan detrusor kası şeritlerinde karbakole karşı oluşan maksimum kasılma yanıtında azalma olduğunu göstermişlerdir (91).

Bu tez çalışmasında yaşlı sıçanlarda Y-27632 ile olan gevşeme yanıtlarının genç gruptan farklı olmaması testosteron için öne sürülen iddianın östrojen içinde geçerli olmasını engellemektedir. Ancak, Hong ve arkadaşları ooferektomi ve östrojen replasman tedavisinin sıçan mesanesindeki Rho-kinaz yolağı üzerine etkisini araştırdıkları çalışma sonucunda östrojenin mesanede Rho-kinaz aktivitesini inhibe ettiğini belirtmektedirler (104). Bu çalışmayı destekler nitelikte diğer bir çalışmada ise Lin ve ark. ooferektomi sonrası tavşan mesanesinde Rho-kinaz- α ekspresyonunda artış olduğunu ve östrojen replasmanı ile bu artışın azaldığını belirtmektedir (105).

Sempatik, parasempatik, nitrejik sistemlerin blokajı sonrasında ooferektomi grubu dışındaki gruplarda Y-27632 bağılı gevşeme yanıtlarının azaldığı ve tüm grupların gevşemelerinin hemen hemen birbirlerine paralel seyrettiği gözlemlendi. Bu sistemlerin blokajıyla Y-27632 bağılı gevşeme yanıtlarının azalması mesanede gevşeme yanıtından sorumlu olduğu bilinen sempatik ve/veya nitrejik sistemlerinin Rho-kinaz yolağı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Çünkü vasküler düz kas dokusunda NO'nun etkisini Rho-kinaz yolağını baskılayarak gösterdiği yukarıda belirtilmişti. Mesanede NO'nun baskılanmasıyla Rho-kinaz yolağının aktivasyonun arttığı ve gevşeme yanıtlarının azaldığı iddia edilebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Rho-kinaz enzimlerinin spesifik antagonisti olan Y-27632 uygulanmasıyla vajen ve mesane düz kaslarında konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları gözlemlendi. Bu da Ca^{2+} -bağımsız kasılmaya yol açan Rho-kinaz aktivitesinin bu dokularda var olduğunu kanıtladı.

Kadın yaşamında oldukça önemli olan östrojen ve testosteron gibi iki seks steroid düzeyinin değişimi, vajen ve mesane düz kaslarının gevşeme ve kasılma yanıtlarını değiştirdi. Östrojen düzeyi değişiminin Rho-kinaz yolağı üzerinde herhangi bir etkisi görülemezken, testosteron düzeyinin azalması Rho-kinaz aktivitesinde artışa yol açmakta, bu da vajen ve mesane düz kaslarındaki kasılma-gevşeme dengesini kasılma lehinde değiştirmektedir. Vajen ve mesane düz kaslarındaki kasılma-gevşeme dengesinin değişmesi iritatif üriner semptomlar ve cinsel fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır.

Seks steroidlerinin yanı sıra, mesanede NO düzeyinin azalması da Rho-kinaz aktivitesinin artışına yol açarken, vajende NO ve Rho-kinaz yolları arasında böyle bir etkileşim görülmedi.

Spesifik Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 kullanılarak veya testosteron düzeyi düşük hastalarda testosteron replasmanı yapılarak Rho-kinaz aktivitesi azaltılıp, iritatif üriner semptomlarda ve cinsel disfonksiyonda düzelmenin olacağı öne sürülebilir. Ancak bu tedavi yaklaşımının klinik düzeyde uygulanması için ileri çalışmalara gerek vardır.

Sonuç olarak,

- Rho-kinaz sıçan vajen ve mesane dokusunda gevşeme yanıtı oluşturdu.
- Östrojen ile Rho-kinaz arasında bir etkileşim görülmedi.
- Testosteronun Rho-kinaz yolağı üzerinde suprese edici etkisi olduğu görüldü.
- Vajende NO ile Rho-kinaz arasında etkileşim görülmedi.
- Mesanede NO düzeyinin azalması Rho-kinaz aktivitesinin de artışa yol açtı.

7. KAYNAKLAR

- 1- Laumann E, Paik A, Rosen R. Seksual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *JAMA*. 281: 537-544, 1999
- 2- Iosif CS, Bekassy Z. Prevalence of genito-urinary symptoms in the late menopause *Acta Obstetrica Gynecologica and Scandinavica*. 63(3): 257-60, 1984
- 3- Korse CM, Bonfrer JM, van Beurden M, Verheijen RH, Rookus MA. Estradiol and Testosterone Levels Are Lower after Oophorectomy than after Natural Menopause. *Tumour Biol*. 30(1): 37-42, 2009
- 4- Parek MH, Chichester P, Lobel RW, Aikawa K, Levin RM. Effects of castration on female rabbit bladder physiology and morphology. *Urology*. 64:1048-1051, 2004
- 5- Somlyo AP, Wu X, Walker LA, Somlyo AV. Pharmacomechanical coupling; the role of calcium, G proteins, kinases and phosphates. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 134:201-34, 1999
- 6- Wang H, Eto M, Steers WD, Somlyo AP, Somlyo AV. Rho-mediated Ca^{2+} sensitization in erectile function. *J Biol Chem*. Aug 23;227(34): 30614-30621, 2002
- 7- Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF, et. al. Rho/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: A mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 9121-9126, 2004
- 8- Weber L.P, Van Lierop J.E, Walsh M.P. Ca^{2+} independent phosphorylation of myosin in rat caudal artery and chicken gizzard myofilaments. *J. Physiol*. 516: 805-824, 1999
- 9- Defeo TT, Morgan KK. Calcium-force relationships as detected with Aequorin in two different vascular smooth muscles of the ferret. *J Physiol*. Dec; 369: 268-282, 1985
- 10- Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S. Involvement of rho p21 in the GTP enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem*, 267: 8719-8722, 1992
- 11- Gong MC, Iizuka K, Nixon G, et. al. Role of guanine nucleotid-binding proteins-ras-family or trimeric proteins or both--in Ca^{2+} sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:1340-1345, 1996
- 12- Takai Y, Sasaki T, Matzaki T. Small GTP-Binding Proteins. *Physiol Rev*. 81-1,153-208, 2001
- 13- Fukata Y, Amano M and Kaubuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*. 22: 1, 32-39, 2001

- 14- Miao L, Calvert JW, Tang J et al. Upregulation of small GTPase RhoA in the basilar artery from diabetic (mellitus) rats. *Life Sci.* 71: 1175-1185, 2002
- 15- Boettner B, Aelst LV. The role of Rho GTPases in disease development. *GENE* 286: 155-174, 2002
- 16- Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S. Involvement of rho p21 in the GTP enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem.* 267:8719-8722, 1992
- 17- Miura Y, Kikuchi A, Musha T, et al. Regulation of morphology by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem.* 268: 510-515, 1993.
- 18- Kimura K, Ito M, Amano M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science.* 273: 245-248, 1996
- 19- Chitaley K, Webb RC. Microtubule depolymerization facilitates contraction of rat aorta via activation of Rho-kinase. *Vasc Pharmacol.* 38:157-161, 2002
- 20- Büyükafsar K, Levent A. Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and neurotransmitter release in the mouse gastric fundus contractile. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 777– 781, 2003
- 21- Büyükafsar K, Ün . Effects of the Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil on the corpus cavernosum from diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 472: 235-238, 2003
- 22- Büyükafsar K, Levent, A, Ark M. Expression of Rho-kinase and its functional role in the contractile activity of mouse vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 140: 743–749, 2003
- 23- Amano M, Fukata Y and Kaibuchi K. Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by the small GTPase Rho and its targets. *Trends Cardiovasc Med.* 8: 162-168, 1998
- 24- Mukai Y, Shimokawa H, Mataba T et. al. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease—a novel therapeutic target in hypertension. *The FASEB J.* 20, 2001
- 25- Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an Important Therapeutic Target in Cardiovascular Medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1767-1775, 2005
- 26- Ishizaki T., Uehata M., Tamechika I. Ark. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol.* 57: 976-983, 2000
- 27- Iizuka K., Shimizu Y., Tsukagoshi H. ve ark. Evaluation of Y-27632, a rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 406: 273-279, 2000
- 28- Jin L, Burbett AL. RhoA/Rho-kinase in erectile tissue: mechanisms of disease and therapeutic insights. *Clinical Science (London).* Feb;110(2):153-165, 2006

- 29- Sward K., Mita M., Wilson D.P. ve ark. The role of RhoA and Rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction. *Curr Hypertens Rep.* 5:66-72, 2003
- 30- Chitale K, Webb RC. Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of Rho-kinase signaling. *Hypertension.* 39: 2, 438-442, 2002
- 31- Coussin F, Scott RH, Wise A, et. al. Comparison of sphingosine 1- phosphate-induced intracellular signaling pathways in vascular smooth muscles differential roles in vasoconstriction. *Circ Res.* 91:151-157, , 2002
- 32- Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, et. al. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase mediated Ca²⁺ sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circ Res.* 91:112-119, 2002
- 33- Chitale K., Wingard CJ., Clinton Webb R., Branam H., Stoper VS., Lewis RW., Mills TM. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide independent pathway. *Nat Med.* Jan;7(1):119-122, 2001
- 34- Rees RW., Ralph DJ., Royle M., Moncada S., Celtek S. Human and rabbit cavernosal smooth muscle cells Express Rho-kinase. *Int J Impot Res.* Feb;14(1): 1-7, 2002
- 35- Mills TM, Chitale K, Lewis RW, et al. Nitric oxide inhibits RhoA/Rho-kinase signaling to cause penile erection. *Eur J Pharmacol.* 439: 173-174, 2002
- 36- Chitale K., Webb RC., Mills TM. RhoA/Rho-kinase: a novel player in the regulation of penile erection. *Int J Impot Res.* Apr;13(2):67-72, 2001
- 37- Park K, Kim SW, Rhu KS, Paick JS. Chronic administration of an oral Rho-kinase inhibitor prevents the development of vasculogenic erectile dysfunction in rat model. *J Sex Med.* 3:996-1003, 2006
- 38- Dai Y., Lewis RW., Stoper VS., Mills TM. Androgenic maintenance of the veno-occlusive mechanism during penile erection in the rat. *Asian J Androl.* 1: 53-59, 1999
- 39- Mills TM. ,Lewis RW. The role of androgens in the erectile response: A 1999 perspective. *Mol Urol.* 3(2): 75-86, 1999
- 40- Wingard CJ., Johnson JA., Holmes A., Prikosh A. Improved erectile function following Rho-kinase inhibition in a rat castrate model of erectile dysfunction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Jun;284(6): R1572-1579, 2003
- 41- Baljet B, Drukker J. The extrinsic innervation of the pelvic organs in the female rat. *Acta Anat.* 107:241-267, 1980
- 42- Marson L. Central nervous system neurons identified after injection of pseudorabies virus into the rat clitoris. *Neurosci. Lett.* 190: 41-44, 1995

- 43- Mckenna KE., Nadelhaft I. The organization of the pudental nevre in the male and female rat. *J Comp Neurol.* 248:532-549, 1986
- 44- Munarriz R., Kim NM., Golstein I., Traish AM. Biology of female sexual function. *Urol Clinics North Am.* 29:685-693, 2002
- 45- Giraldi A, Alm P, Werstrom V, Myllymaki L, Wagner G, Andersson KE. Morphological and functional characterization of a rat vaginal smooth muscle sphincter. *Int J Impot Res.* 14:271-282, 2002
- 46- Kim NN, Min K, Huang YH, Goldstein I, Traish AM. Biochemical and functional characterization of alpha-adrenergic receptors in the rabbit vagina. *Life Sci.* Nov 1;71(24):2909-2920, 2002
- 47- Celtek S, Moncada S. Nitreergic neurotransmission mediates the non-adrenergic non-cholinergic responses in the clitoral corpus cavernosum of the rabbit. *Br J Pharmacol.* 125:1627-1629, 1998
- 48- Wagner G., Levin RJ: Effect of atropina and methyl atropine on human vaginal blood flow, sexual arousal and climax. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 46: 321-325, 1980
- 49- Meston CM., Heiman JR: Ephedrine-activated physiological sexual arousal in women. *Arch Gen Psychiatry.* 55:652-656, 1998
- 50- Celtek S. The Rho-kinase inhibitor Y-27632 and the soluble guanylyl cyclase activator BAY41-2272 relax rabbit vaginal wall and clitoral corpus cavernosum. *Br J Pharmacol.* Jan;138(2):287-90, 2003
- 51- Ziessen T, Moncada S, Celtek S: Characterization of the non nitreergic NANC relaxation responses in the rabbit vaginal wall. *Br J Pharmacol.* 135: 546-554, 2002
- 52- Al Hijji J., Larsson B., Batra S: Nitric oxide synthase in the rabbit uterus and vagina: hormonal regulation and functional sgnificance. *Biol Reprod.* 62:1387-1392, 2000
- 53- Blank MA., GU J., Allen JM., Huang WM., Yiangou Y Cheng et al: The regional distribution of NPY-, PHM-, and VIP-containing nerves in the human female genital tract. *Int J Fertil.* 31:218-222, 1986
- 54- Hauser-Krokenberger C, Cheung A, Hacker GW, Graf AH, Frick J: Peptidergic innervation of the human clitoris. *Peptides.* 20:539-543, 1999
- 55- Damati G., Di Giagora DJ., Bologna M., Giordano D., Giorgi M., Dolci S. et al: Type 5 phosphodiesterase expression in the human vagina. *Urology.* 60:191-195, 2002
- 56- Ottesen B: Vasoactive İntestinal Polipeptide as a neurotransmitter in the female genital tract. *Am J Obstet Gynecol.* 147:208-224, 1983

- 57- Giuliano F, Allard J, Compagnie S, Alexandre L, Drouply S, Bernabe J: Vaginal physiological changes in a model of sexual arousal in anesthetized rats. *Am J Physiology*. 281:R140-R149, 2001
- 58- Min K, Kim NM, Mcauley I, Stankowicz M, Goldstein I, Traish AM: Sildenafil augments pelvic nerve mediated female genital sexual arousal in the anesthetized rabbit. *Int J Impot Res*. 12:S32-S39, 2000
- 59- Park K, Moreland RB, Goldstein I, Atala A, Traish A: Sildenafil inhibits phosphodiesterase type 5 in the human clitoral corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 49:612-617, 1998
- 60- Min K, Munarriz R, Kim NN, Choi S, Oconnel L, Goldstein I, Traish AM: Effects of ovariectomy and estrogen replacement on basal and pelvic nerve stimulated vaginal lubrication in an animal model. *J Marital and Sex Therapy*. 29(Suppl 1):77-84, 2003
- 61- AL-Hijji J, Batra S: Down regulation by estrogen of nitric oxide syntase activity in the female rabbit lower urinary tract. *Urology*. 53:637-641, 1999
- 62- Kim NN, Min K, Pessina M, Munarriz R, Goldstein I, Traish AM: Effects of ovariectomy and streoid hormones on vaginal smooth muscle contractility. *Int J Impot Res*. Feb;16(1): 43-50, 2004
- 63- Davis SR, Burger HG: The rationale for physiological testosterone replacement in women. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 12: 391-405, 1998
- 64- Kennedy TG, Armstrong DT: Induction of vaginal mucification in rats with testosterone and 17beta-hydroxy 5alpha-androstan-3-one. *Steroids*. 27:423-430, 1976
- 65- Min K, Munarriz R, Kim NN, Choi S, Oconnel L, Goldstein I, Traish AM: Effects of ovariectomy and estrogen and androgen treatment on sildenafil mediated changes in female genital blood flow and vaginal lubrication in the animal model. *Am J Obstet Gynecol*. 187:1370-1376, 2003
- 66- Traish A, Moreland RB, Huang YH, Kim NN, Berman J, Goldstein I: Development of human and rabbit vaginal smooth muscle cell cultures: effects of vasoactive agents on intracellular levels of cyclic nucleotides. *Mol Cell Biol Res Commun*. 2:131-137, 1999
- 67- Traish AM, Kim NN, Huang YH, Min K, Munarriz R, Goldstein I: Sex steroid hormones differentially regulate nitric oxide synthase and arginase activities in the proksimal and distal rabbit vagina. *Int J Impot Res*. 15:397-404, 2003
- 68- Gebhart JB, Rickart DJ, Baret T, Lesnick TG, Webb MJ, Spelsberg TC: Expression of estrogen receptor isoforms alpha and beta Messenger RNA in vaginal tissue of

- premenopausal and postmenopausal woman. *Am J Obstet Gynecol.* 185:1325-1330, 2001
- 69- Andersson K.E., Anders, A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology *Physiol Rev.* 84: 935–986, 2004
- 70- Creed K.E., Callahan S.M. Prostaglandin and neurotransmission at the guinea pig and rabbit urinary bladder *European Journal of Physiology.* 413:299-302, 1989
- 71- Schneider T., Hein T., Michel M.C. Signal transduction underlying carbachol- induced contraction of rat urinary bladder. I. Phospholipases and Ca²⁺ sources *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 308: 47-53, 2004
- 72- Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble J.P. Expression and functional role of Rho- kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 138: 757–766, 2003
- 73- Jezior J.R., Brady J.D., Rosenstein D.I., McCammon K.A. Dependency of detrusor contractions on calcium sensitization and calcium entry through LOE-908- sensitive channels. *Br J Pharmacol.* 134: 78–87, 2001
- 74- Igawa Y., Yamazaki Y., Takeda H., Kaidoh K., Akahane M. Relaxant effects of isoprenaline and selective beta3-adrenoceptor agonists on normal, low compliant and hyperreflexic human bladders. *J Urol.* 165: 240–244, 2001
- 75- Hashitani, H., Bramich, N.J., Hirst, G.D. Mechanisms of excitatory neuromuscular transmission in the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol.* 524: 565–579, 2000
- 76- Braverman A, Legos J, Young, W. M2 receptors in genito-urinary smooth muscle pathology. *Life Sci.* 64:429–436, 1999
- 77- Andersson, K.E. Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev.* 45: 253–308, 1993
- 78- Lepor H, Gup D, Shapiro E, Baumann M: Muscarinic cholinergic receptors in the normal and neurogenic human bladder. *J Urol.* 142:869, 1989
- 79- Truss MC, Uckert S, Stief CG, et al: Effects of various phosphodiesterase inhibitors, forskolin and sodium nitroprusside on porcine detrusor smooth muscle tonic responses to muscarinic stimulation and cyclic nucleotide levels in vitro. *Neurourol Urodyn.* 15:59-64, 1996
- 80- Ozawa H, Chancellor MB, Jung SY, et al: Effect of intravesical nitric oxide therapy on cyclophosphamide-induced cystitis. *J Urol.* 162:2211-2218, 1999
- 81- Ishizuka O, Igawa Y, Lecci A, et al: Role of intratechal tachykinins for micturition in unanaesthetized rats with and without bladder outlet obstruction. *Br J Pharmacol* 113:111-117, 1994

- 82- Saenz de Tejade I, Müeller JD, et al: Endothelin in the urinary bladder: Synthesis of endothelin-1 by epithelia, smooth muscle and fibroblasts suggests autocrine and paracrine cellular functions. *J Urol.* 148:1290, 1992
- 83- Levin RM, Shofer FS, Wein AJ: Estrogen-induced alterations in the autonomic responses of the rabbit urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther.* 215:614, 1980
- 84- Elliot RA, Castleden CM, Miodrag A: The effects of in vivo estrogen pretreatment on the contractile response of rat isolated detrusor muscle. *Br J Pharmacol.* 107:766, 1992
- 85- Palea S, Angel I: The effect of ovariectomy on the contractile response of the rat isolated detrusor muscle and urethra. *Life Sci.* 61:21, 1997
- 86- Ekstrom J, Josif CS, Malmberg L: Effect of long term treatment with estrogen and progesterone on in vitro muscle responses of the female rabbit urinary bladder and urethra to autonomic drugs and nerve stimulation. *J Urol.* 15:1284, 1993
- 87- Ehren I, Hammarstrom M, Adolfsson J, Wiklund NP: Induction of calcium-dependent nitric oxide synthase by sex hormones in the guinea pig urinary bladder. *Acta Physiol Scand.* 153:393, 1995
- 88- Kurz C, Nagele F, Sevelde P,ENZELSBERGER H: Intravesical administration of estriol in sensory urge incontinence-a prospective study. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* Aug;53(8):535-8, 1993
- 89- Andersson KE: Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev.* 45:253, 1993
- 90- Lieu P.K, Saadu A, Orugun E, et al: The influence of age on isometric and isotonic rat detrusor contractions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 52:94, 1997
- 91- Munro D.D, Wendt I.R: Contractility and metabolic properties of longitudinal smooth muscle from rat urinary bladder and the effects of aging. *J Urol.* 150:529, 1993
- 92- Diep N, Constantinou C.E: Age dependent response to exogenous estrogen on micturition, contractility and cholinergic receptors of the rat bladder. *Life Sci.* 64:279, 1999
- 93- Hotta H, Morrison J.F, Sato A, et al: The effects of aging on the rat bladder and its innervation. *Jpn J Physiol.*;45:823, 1995
- 94- Stahl F, Gotz F, Dorner G: The influence of fetal adrenals on the androgen levels during brain differentiation in human subjects and rats. *Exp Clin Endocrinol;* 98:131, 1991
- 95- Oh SJ, Hong SK, Kim SW, Paick JS. Histological and functional aspects of different regions of the rabbit vagina. *Int J Impot Res;* 15: 142-150. 2003

- 96-Azadzoi KM, Choi M, Shuker JMB, Goldstein I, Tarcan T. Neurogenic control of clitoral and vaginal tissue contractility in the rabbit. 15th Congress of European society for Urological Research, Istanbul, Turkey, October 5-7 (Eur Urol 2000; 38 (Suppl): 526A)
- 97-Onol FF, Ercan F, Tarcan TT. The effect of ovariectomy on rat vaginal tissue contractility and histomorphology. *J Sex Med*; 3(2):233-241, 2006
- 98-Bohlen JG, Held JP, Sanderson MO, Ahlgren A. The female orgasm: pelvic contractions. *Arch Sex Behav*;11: 367-386, 1982
- 99-Bing W, Chang S, Hypolite JA, DiSanto ME, Zderic SA, Rolf L, Wein AJ, Chacko S. Obstruction-induced changes in urinary bladder smooth muscle contractility: a role for Rho kinase. *Am J Physiol Renal Physiol*. Nov;285(5):F990-7, 2003. Epub Jul 8, 2003
- 100-Persson K, Pandita RK, Spitzbergen JM, Steers WD, Tuttle JB, Andersson KE. Spinal and peripheral mechanisms contributing to hyperactive voiding in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. Oct;275(4 Pt 2): R1366-73, 1998
- 101-Rajasekaran M, Mehta N, Baquir A, Kuntz S. Rho-kinase inhibition suppresses potassium chloride-induced bladder hyperactivity in a rat model. *Urology*. Apr;69(4): 791-794, 2007
- 102-Hiroki J, Shimokawa H, Higashi M, Morikawa K, Kandabashi T, Kawamura N, Kubota T, Ichiki T, Amano M, Kaibuchi K, Takeshita A. Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human coronary vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. Aug;37(2):537-546, 2004
- 103-Lin WY, Rehfuss A, Whitbeck C, Juan YS, Chichester P, Mannikarottu A, Levin RM. Effect of letrozole on urinary bladder function in the female rabbit. *BJU Int*. Dec;100(6):1391-5, 2007. Epub Sep 10, 2007
- 104-Hong SK, Yang JH, Kim TB, Kim SW, Paick JS. Effects of ovariectomy and oestrogen replacement on the function and expression of Rho-kinase in rat bladder smooth muscle. *BJU Int*. Nov;98(5):1114-1147, 2006
- 105-Lin AD, Levin RM, Kogan BA, Whitbeck C, Leggett RE, Kearns C, Mannikarottu A. Alteration of contractile and regulatory proteins in estrogen-induced hypertrophy of female rabbit bladder. *Urology*. Nov;68(5):1139-1143, 2006
- 106-Rajasekaran M, White S, Baquir A, Wilkes N. Rho-kinase inhibition improves erectile function in aging male Brown-Norway rats. *J Androl*. Mar-Apr;26(2):182-188, 2005
- 107-Madeiro A, Girão M, Sartori M, Acquaroli R, Baracat E, Rodrigues De Lima G.

Clin Exp Obstet Gynecol. Effects of the association of androgen/estrogen on the bladder and urethra of castrated rats. 29(2):117-120, 2002