

TESTİS TORSİYONUNDA FOSFODİESTERAZ 5 İNHİBİTÖRLERİ: DENEYSEL ÇALIŞMA

PHOSPHODIESTERASE 5 INHIBITORS IN TESTIS TORSION: AN EXPERIMENTAL STUDY

Turgay AKGÜL*, Hatice YAĞMURDUR**, Ali AYYILDIZ*, Ersagun KARAGÜZEL*, Elmas ÖĞÜŞ***, Hüseyin ÜSTÜN****

* S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Üroloji Kliniği, ANKARA

** S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Anesteziyoloji Kliniği, ANKARA

*** S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Bölümü, ANKARA

**** S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği, ANKARA

ABSTRACT

Introduction: Testicular torsion is a urological emergency that decreases ipsilateral testicular perfusion. Ischemia-reperfusion (IR) injury of the testis which induces testicular germ cell loss is caused by the twisted spermatic cord and then its release. Phosphodiesterase (PDE) 5 inhibitors have been developed for erectile dysfunction and they have now other medical indications. The decrease in using age of PDE5 inhibitors and probability of developing testicular torsion in adult men led us to investigate the effect of PDE 5 inhibitors, sildenafil citrate and vardenafil HCl, on IR injury formed after testicular torsion.

Materials and Methods: After obtaining the approval of the local ethics committee, forty-eight Wistar Albino rats, weighing between 210-262 g, were housed in individual cages. The rats were randomly assigned into four main groups and each group received drugs. Saline, sildenafil citrate and vardenafil HCl are given to each for one month and the last group received no drug as sham group. After one month, testicular torsion was created for 1 h of ischemia and the left testis was untwisted and replaced to the scrotum for 2 h of reperfusion. At the end of 3h, ipsilateral testes were removed for histopathologic and biochemical examinations. In sham group, left testis was brought through the incision and was then replaced back to original location and a suture was placed.

Results: Mean testicular malondialdehyde, nitrate and nitrite levels were increased in saline group according to sham group. In sildenafil and vardenafil groups; the mean MDA, nitrate and nitrite levels were significantly higher than saline group. After testicular torsion edema, congestion and hemorrhage between seminiferous tubules were main features in torsion groups.

Conclusion: Sildenafil citrate and vardenafil HCl caused an exaggerated testicular IR injury. This finding may prevent recreational use of PDE5 inhibitors among young men.

Key words: Ischemia reperfusion, Nitric oxide, Phosphodiesterase inhibitors, Testicular torsion, Testis

ÖZET

Bu çalışmamızda fosfodiesteraz (PDE) 5 inhibitörlerinden sildenafil sitrat ve vardenafil HCl'nin testis torsiyonunun ardından gelişen iskemi reperfüzyon (IR) hasarı üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

48 adet Wistar Albino sıçan randomize bir şekilde 4 gruba ayrıldı. Bir ay boyunca ilk gruba salin, ikinci gruba sildenafil sitrat, üçüncü gruba vardenafil HCl verildi. Son grup ise herhangi bir madde almayarak sham grubunu oluşturdu. Bir ayın sonunda ilk üç gruptaki sıçanların sol testisinde testis torsiyonu oluşturuldu ve 1 saat boyunca testis iskemik kalacak şekilde tutuldu. Ardından sol testis detorsiyone edilerek skrotuma yerleştirildi ve 2 saat reperfüzyon için beklendi. Sham grubunda ise sol testis torsiyone edilmeden insizyondan dışarı çıkarıldı ve tekrar yerine yerleştirilerek sütüre edildi. Üç saatin sonunda tüm gruplardaki sıçanların ipsilateral testisleri biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için çıkarıldı. Biyokimyasal incelemeler amacıyla malondialdehit (MDA), nitrit ve nitrat düzeyleri ölçüldü.

Ortalama testiküler MDA, nitrat ve nitrit seviyeleri salin grubunda sham grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. Sildenafil ve vardenafil gruplarında ortalama MDA, nitrat ve nitrit düzeyleri salin grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. Histopatolojik olarak testis torsiyonu sonrası seminifer tübüller arasında gözlenen ödem, konjesyon ve hemoraji baskın bulguları. Vardenafil ve sildenafil gruplarında ise seminifer tübüller arasında gözlenen ödem, konjesyon ve hemoraji bulgularının salin grubuna göre anlamlı oranda arttığı izlendi.

Sildenafil sitrat ve vardenafil HCl testiküler IR hasarını anlamlı derecede arttırmışlardır. Bu bulgu PDE5 inhibitörlerinin genç erkekler arasında popüler olan keyfi kullanımını kısıtlayabilir.

Anahtar kelimeler: Fosfodiesteraz 5 inhibitörleri, İskemi reperfüzyon, Nitrik oksit, Testis torsiyonu

GİRİŞ

Testis torsiyonu, erkeklerde testisin iskemik kalmasına neden olabilen ürolojik bir acil durumdur. Her ne kadar bu patolojinin genelde çocuk ve adolöslanlarda görüldüğü düşünülse de torsiyon gözlenen tüm olguların yaklaşık %39'u erişkin yaşlardadır¹. Torsiyon etkilenen testiste perfüzyonun azalmasına yol açar. Reperfüzyonun ardından ortamda oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR) sayesinde gelişen iskemi reperfüzyon hasarı ise testiküler doku yıkımının daha da artmasına neden olabilmektedir^{2,3}. Reoksijenizasyon ile hücre mitokondrilerinde süperoksit anyonları gibi SOR oluşumu gelişmektedir. Bu radikallerin ardından yağ hücreleri ve mitokondri membranları ile reaksiyona girerek lipid peroksidaz oluşumuna yol açar ve iskeminin oluşturduğu doku hasarından daha şiddetli bir hasar oluşumuna neden olurlar⁴. Peroksidasyonun son ürünü olan Malondialdehit (MDA), biyokimyasal olarak testiküler hasarın şiddetini tanyin etmede kullanılabilmektedir⁵.

Erektıl disfonksiyon (ED) tedavisinde kullanılan fosfodiesteraz (PDE) 5 inhibitörleri etkilerini sıklık guanozin monofosfatı artırarak ve nitrik oksit (NO) aracılı vazodilatasyona yol açarak götserirler⁶. Bu ilaçlar primer olarak ED tedavisi için ruhsatlandırılmış olsalar da günümüzde en çok reçete edilen ve de en çok suistimal edilen ilaçlar arasında yerlerini almışlardır.

PDE5 inhibitörlerini kullanma yaşının giderek düşmesi ve testis torsiyonunun yetişkinlerdeki anlamlı görülme oranı bizleri sildenafil sitrat (Viagra®; Pfizer Inc., ABD) ve vardenafil HCl'nin (Levitra®; Bayer HealthCare AG, Almanya) testis torsiyonunun ardından oluşan IR hasarı üzerine olan etkilerini biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeye yöntemleri ile araştırmaya yöneltti.

GEREÇ ve YÖNTEM

Lokal etik kurul kararının ardından çalışmaya 48 adet Wistar sıçan (210-262 gr) alındı. Sıçanlar ortalama sıcaklığı 22-24°C ve ortalama nem oranı %50 olan gün ışığı kontrollü (12 saat karanlık, 12 saat aydınlık) bir odadaki kafeslere yerleştirildi. Tüm kafeslerin yapısı sıçanların devamlı olarak suya ve yeme ulaşabilmelerine olanak sağlayacak şekilde idi. Sıçanların suları günlük olarak değiştirildi ve kafes zeminine temiz bir ortam sağlamak amacıyla haftada 3 kez değiştirilen odun talaşı se-

rildi. Sıçanlar, Tablo 1'de gösterildiği gibi randomize bir şekilde 4 gruba ayrıldı.

Tedavi: Grup 2 ve Grup 3'deki sıçanlara oral yoldan ilaç verilebilmesi amacıyla solüsyonlar hazırlandı. Grup 2'ye uygulanan vardenafil solüsyonu 20 mg tabletin 10 cc distile su ile homojen bir solüsyon oluşturacak şekilde karıştırılması, Grup 3'e uygulanan sildenafil sitrat solüsyonu ise 50 mg tabletin 10 cc distile su ile karıştırılması ile hazırlandı. Böylece her iki gruba bir ay boyunca Tablo 1'de belirtilen dozlarda ilaç uygulamaları yapıldı.

Tablo 1. Sıçan grupları ve torsiyon oluşturulmadan önce bir ay boyunca verilen ilaçlar	
Gruplar	Özellikler
Grup 1 (n=12)	Salin
Grup 2 (n=12)	Vardenafil HCl (oral, 0,5 mg/gün)
Grup 3 (n=12)	Sildenafil sitrat (oral, 1 mg/gün)
Grup 4 (n=12)	İlaç yok (Sham grubu)

T/D: Torsiyon/detorsiyon

Cerrahi işlem: Bir ayın sonunda cerrahi işlemler %5 ketamin hidroklorid anestezisi (50 mg/kg, intramüsküler) cerrahi luplar (x2.5, Heine™, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Skrotal bölgenin cildi tıraş edilerek %10' luk povidin iyodin ile temizlendi. Transskrotal uygulanan insizyonun ardından sol testise ulaşıldı ve sol testis kord elemanları ile beraber saat yönünde 720° çevrilerek torsiyon modeli oluşturuldu. Sol testis daha sonra bu haliyle skrotuma 4/0 ipek ile tespit edilerek sabitlendi ve bu durumda 1 saat tutuldu. Bir saat süren iskemik dönem sütürün kesilmesi ile sonlandırıldı ve testis skrotum içine yerleştirilerek 2 saat boyunca reperfüzyon için beklendi. Toplam 3 saatin sonunda tüm sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek testisleri histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler için çıkarıldı.

Sham grubunda sol testis torsiyone edilmeden insizyondan dışarı çıkarıldı ve tekrar yerine yerleştirilerek 4/0 ipek ile sütüre edildi.

Biyokimyasal Değerlendirme: Doku örnekleri tartılarak biyokimyasal incelemelerin yapılacağı güne kadar -70°C sıcaklıktaki dondurucuda saklandı. Dokular daha sonra tampon çözelti içinde homojenize edildi. Mihara ve Uchiyama'nın önceden tanımladıkları tiyobarbitürik asit reaksiyonu sayesinde MDA içerikleri ölçüldü⁷.

Biyolojik spesmenlerde NO ölçümünün zor olması nedeniyle testiküler dokudaki NO üretimi indirek yoldan nitrit (NO₂⁻)/ nitrat (NO₃⁻) olarak ölçüldü. Bu amaçla 2-10 µM sodyum nitrit veya sodyum nitrat standart kabul edilerek Griess yöntemi kullanıldı⁸.

Histopatolojik İnceleme: Testisler, Bovin solüsyonuna konularak +4°C'de 5 gün boyunca tutuldu. Ardından dokular önce parafin bloklarına gömüldü ve hazırlanan yaklaşık 5 µm'lik kesitler halinde deparafinize edilerek hematoksilin-eozin ile boyandı. Histopatolojik incelemeler ışık mikroskobu altında hangi gruba ait dokuyu incelediğini bilmeyen patoloji uzmanı tarafından gerçekleştirildi.

İstatistiksel Değerlendirme: Çalışmaya ait veriler bilgisayar ortamında *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, Chicago, IL, USA) version 13.0 programı kullanılarak değerlendirildi. Tanımlayıcı yöntemler uygun yerlerde (ortalama± standart deviasyon) karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi eşliğinde değerlendirildi. P değerinin 0.05'den küçük olması tüm testlerde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

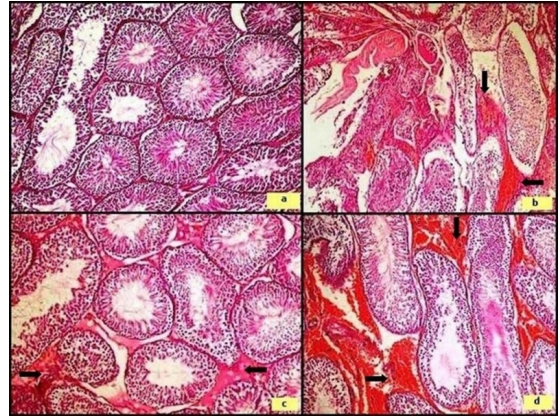
Biyokimyasal bulgular: Testiküler dokudaki ortalama MDA, nitrat ve nitrit seviyesi salin uygulanan grupta (Grup 1) sham grubuna (Grup 4) göre anlamlı olarak yüksekti. Vardenafil ve sildenafil alan gruplardaki (Grup 2 ve 3) sıçanların ortalama testiküler MDA, nitrat ve nitrit seviyeleri ise hem salin hem de sham grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (p<0.05). Grup 2 ve Grup 3'teki sıçanların ortalama biyokimyasal değerleri birbirine yakındı ve her iki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0.05) (Tablo 2).

Histopatolojik bulgular: Sham grubundaki (Grup 4) sıçanlarda anlamlı hemoraji bulgusu veya konjesyon gözlenmedi. Seminifer tübüller, germ

hücreleri, sertoli ve leydig hücreleri tamamen normal görünümde idi. Germinal hücreler, spermatogenezisin değişik evrelerini yansıtacak şekilde düzenli olarak sıralanmışlardı (Resim 1a).

Testis torsiyonu oluşturulmasının ardından histopatolojik görünüm anlamlı olarak değişti. Salin grubunda; seminifer tübüller arasında anlamlı oranda ödem, konjesyon ve hemoraji izlendi. Seminifer tübüllerin yapısının düzensizleşmesi ve tübüllerdeki germinal epitel hücrelerinin ayrılması dikkati çeken diğer bulguları (Resim 1b).

Vardenafil ve sildenafil gruplarında ise seminifer tübüller arasında gözlenen ödem, konjesyon ve hemoraji bulgularının salin grubuna göre anlamlı oranda arttığı izlendi (Resim 1c ve 1d).



Resim 1. Işık mikroskobu altında incelenen kesitlerde; **a)** Sham grubunda seminifer tübüllerin normal histolojik yapısı gözlenmektedir (HEx100); **b)** Salin grubunda testis torsiyonunun ardından seminifer tübüllerdeki germinal hücrelerin düzenli yapısının bozulduğu ve seminifer tübüller arasında testiküler ödem, konjesyon ve belirgin hemoraji (oklar) gözlenmektedir (HEx 50); **c)** Seminifer tübüller arasında gözlenen ödem, konjesyon ve hemoraji (oklar) vardenafil grubundaki belirgin özelliklerdi (HEx100); **d)** Sildenafil grubunda seminifer tübüller arasında artmış oranda konjesyon ve hemoraji (oklar) gözlenmektedir (HEx50)

Tablo 2. Biyokimyasal ölçütlerin karşılaştırması

	Grup 1 (Salin)	Grup 2 (Vardenafil HCl)	Grup 3 (Sildenafil sitrat)	Grup 4 (Sham)
MDA*	0.26 ± 0.02	0.45± 0.01	0.46± 0.02	0.07 ± 0.01
Nitrat**	0.32 ± 0.02	0.53±0.02	0.56± 0.03	0.08 ± 0.01
Nitrit***	0.34 ± 0.02	0.55±0.02	0.57± 0.02	0.11 ± 0.01

p < 0.05, Mann Whitney U testi; **T/D:** Torsiyon/detorsiyon; **MDA:** Malondialdehit

*: Grup 1 v grup 2 için p=0.02 ve grup 1 v grup 3 için p= 0.021 ve grup 1 v grup 4 için p= 0.022

** : Grup 1 v grup 2 için p=0.02 ve grup 1 v grup 3 için p= 0.032 ve grup 1 v grup 4 için p= 0.011

***: Grup 1 v grup 2 için p=0.02 ve grup 1 v grup 3 için p= 0.027 ve grup 1 v grup 4 için p= 0.031

TARTIŞMA

Kan akımının ve perfüzyon basıncının önemli bir düzenleyicisi olan NO, vasküler sistemi uygun fizyolojik uyarılara hazırlayarak etki gösterir⁹. Bu madde birçok organ üzerinde düzenleyici etkisi olan yüksek oranda reaktif serbest radikaldir ve düzensiz NO sentezi birçok patolojik duruma yol açabilmektedir^{10,11}. NO sentezi endotelial (eNOS), nöral (nNOS) ve indüklenebilen NO (iNOS) sentazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Shiraishi ve arkadaşları torsiyonun ardından gelişecek testiküler hasarın sıçanlarda iNOS sayesinde NO üretimine neden olacağını ve bununla apoptotik hücre ölümüne yol açacağını bildirmişlerdir¹². NO her ne kadar intrasellüler ve/veya ekstrasellüler mesajcı olarak işlev gösterse de artmış konsantrasyonlarda DNA replikasyonu ve lipid peroksidasyonu ile hücrelere toksik etki gösterebilmektedir¹³. Önceki yayınlarından NO seviyesinin testiküler IR sonrası azaldığı bilinmektedir². Aslında bu azalma muhtemelen NO'nun, O₂⁻ tarafından tüketilmesi sonucu oluşmaktadır. Süperoksit anyon ve NO, üçüncü bir serbest radikal olan peroksinitrit oluşturmak için reaksiyona girerler. Peroksinitrit ise oksidatif reaksiyonlara neden olarak mitokondriyal solunum enzimlerini inhibe eder, hücrel oksijen oluşumunu azaltır ve membran sodyum geçişini inhibe eder¹⁴. O halde peroksinitrit oluşumunun engellenmesi reperfüzyon hasarını azaltacaktır¹⁵.

NO'nun birçok biyolojik etkisi PDE'ler ile çok çabuk yıkılan siklik 3'5' guanozin monofosfat aracılığı ile olmaktadır¹⁶. Bu yüzden PDE'ler dokudaki NO seviyelerini artırır. PDE'ler, birçok organın fizyolojik işlevlerini düzenlerler ve 11 alt tipe ayrılırlar. PDE5'in beyin, kalp, böbrek, mesane, prostat, üretra, penis ve uterusu yaygın bir şekilde bulunduğu gösterilmiştir¹⁷. Testiste ise özellikle PDE8, PDE10 ve PDE11 yaygın olarak bulunmaktadır¹⁷.

Sildenafil sitrat, ED tedavisinde kullanılmak üzere 1998 yılında ABD'de onaylanan ilk ilaç olmuştur ve ardından vardenafilin onayı gerçekleşmiştir¹⁸. Vardenafilin moleküler yapısı sildenafille oldukça benzerdir ve bu iki PDE5 inhibitörü ajan vasküler sistemde düz kas relaksasyonuna neden olan siklik GMP'nin yıkımını önleyerek ED'nin düzelmesini sağlamaktadırlar¹⁹. Bu ilaçların asıl kullanım yerleri ED tedavisi olsa da sildenafilin hipertansif kardiyomiyopati²⁰, pulmoner hipertansi-

yon²¹ ve NO aracılığıyla oluşan böbrek yaralanmalarında¹⁶ koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), geçtiğimiz yıllarda sildenafilin pulmoner arteriyel hipertansiyonun her evresinde kullanımını onayladı²². Bu yeni endikasyonlar ve kullanım alanları bizleri PDE5 inhibitörlerinin testis torsiyonu sonrasında oluşan IR hasarı üzerine olan etkisini araştırmaya yöneltirdi. Çalışmamızda önceden bildirilen sildenafil sitrat dozunu uyguladık¹⁶. Ancak buna karşın elde ettiğimiz bulgular PDE5 inhibitörlerinin testis torsiyonu sonrası oluşan IR hasarını daha da artırdığını gösterdi. Bize göre PDE5 kullanımı sonrası testiküler dokuda artan NO düzeyi daha fazla peroksinitrit oluşumuna yol açtı ve bu madde de reperfüzyon hasarını artırdı. Ayrıca sıçan testisinde bulunan PDE5, sildenafil ve vardenafil için en önemli hedefler²³ ve sildenafil ve vardenafilin testiküler dokuda yaygın olarak bulunan PDE8, PDE10 ve PDE11 için de selektivitelerinin olduğu bilinmektedir²¹. Bu enzimlerin tümünün sildenafil ve vardenafil ile inhibisyonu testiküler dokudaki NO seviyesini artıracaktır. Bahsedilen tüm mekanizmalar PDE5 inhibitörlerinin testiküler IR hasarını şiddetlendirici etkilerini açıklayabilir. Bu olumsuz etki sıçan testilerinin histopatolojik incelemesinde de izlenmiştir.

Çalışmamızda diğer bir PDE5 inhibitörü olan tadalafilin kullanılmaması bir eksiklik olarak görülebilir. Bunun nedeni tadalafilin diğer PDE5 inhibitörlerine göre çok daha uzun olan yarılanma ömrü nedeniyle. Bize göre uzun yarılanma ömrü nedeniyle deneysel çalışmamızın ikincil amacı olan günlük kullanım etkisini araştırmak tadalafil ile diğer PDE5 inhibitörlerine kıyasla pratik olmayabilecekti. Bununla beraber günden güne çeşitli endikasyonlarda denenmeye başlanan tadalafil ile yapılacak benzer çalışmalar bu maddenin de testis torsiyonundaki etkisini daha iyi anlamamızı sağlayabilecektir.

Günümüzde PDE5 inhibitörlerinin cinsel performansı artırma amacıyla endikasyon dışı keyfi kullanımı genç erkekler arasında artış göstermektedir. Foxman ve ark., 18 ile 39 yaş arasındaki cinsel yönden aktif erkeklerin %15.1'inin cinsel deneyimini artırmak amacıyla sildenafil de dahil olmak üzere çeşitli ilaçlar kullandığını gösterdiler²⁴. PDE5 inhibitörlerinin kullanım yaşı, testis torsiyonunun asıl risk grubunu oluşturan genç erişkinler

arasındaki keyfi kullanımı ve yeni kullanım endikasyonları nedeniyle günden güne düşmüştür. Buna ek olarak ED nedeniyle PDE5 kullanan hasta grubundaki nispeten az da olsa testis torsiyonu gelişebilme riski göz önüne alındığında bu ilaçların erkeklerin günlük hayatlarında gitgide artan bir role sahip olduğunu söylemek yanlış olmayacaktır.

SONUÇ

Bu çalışmada NO sistemi üzerinden etkili oldukları bilinen sildenafil sitrat ve vardenafil HCl'nin testis torsiyonu sonrasında görülen testiküler IR hasarını biyokimyasal ve histopatolojik olarak artırdığı gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- 1- **Cummings JM, Boullier JA, Sekhon D, Bose K:** Adult testicular torsion. *J Urol*; 167: 2109-2110, 2002.
- 2- **Ozturk H, Buyukbayram H, Ozdemir E, et al:** The effects of nitric oxide on the expression of cell adhesion molecules (ICAM-1, UEA-1, and tenascin) in rats with unilateral testicular torsion. *J Pediatr Surg*; 38:1621-1627, 2003.
- 3- **Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A:** Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med*; 25: 199-210, 2004.
- 4- **Unsal A, Devrim E, Guven C, et al:** Propofol attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion. *World J Urol*; 22: 461-465, 2004.
- 5- **Salmasi AH, Beheshtian A, Payabvash S, et al:** Effect of morphine on ischemia-reperfusion injury: Experimental study in testicular torsion rat model. *Urology*; 66: 1338-1342, 2005.
- 6- **Fink HA, Mac Donald R, Rutks IR, et al:** Sildenafil for male erectile dysfunction: A systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*; 162: 1349-1360, 2002.
- 7- **Mihara M, Uchiyama M:** Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*; 86: 271-278, 1978.
- 8- **Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR:** Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*; 126: 131-138, 1982.
- 9- **Rodeberg DA, Chaet MS, Bass RC, Arkovitz MS, Garcia VF:** Nitric oxide: An overview. *Am J Surg*; 170: 292-303, 1995.
- 10- **Kuo PC, Schroeder RA:** The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg*; 221: 220-235, 1995.
- 11- **Moncada S, Palmer RM, Higgs EA:** Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*; 43: 109-142, 1991.
- 12- **Shiraishi K, Naito K, Yoshida K:** Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod*; 65: 514-21, 2001.
- 13- **Moon C, Ahn M, Kim S, Yasuzumi F, Shin T:** Increased expression of both constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in the delayed phase of acute experimental testicular torsion. *J Vet Med Sci*; 67: 453-6, 2005.
- 14- **Szabo C, Dawson VL:** Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci*; 19: 287-298, 1998.
- 15- **Schulz R, Wambolt R:** Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*; 30: 432-9, 1995.
- 16- **Rodriguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, et al:** Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. *Kidney Int*; 68: 2131-2142, 2005.
- 17- **Carson CC, Lue TF:** Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. *BJU Int*; 96: 257-280, 2005.
- 18- **Rastogi S, Rodriguez JJ, Kapur V, Schwarz ER:** Why do patients with heart failure suffer from erectile dysfunction? A critical review and suggestions on how to approach this problem. *Int J Impot Res*; 17 Suppl 1: 25-36, 2005.
- 19- **Kloner RA:** Cardiovascular effects of the 3 phosphodiesterase-5 inhibitors approved for the treatment of erectile dysfunction. *Circulation*; 110: 3149-3155, 2004.
- 20- **Ferreira-Melo SE, Yugar-Toledo JC, Coelho OR, et al:** Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardiomyopathy in NOS inhibitor-treated rats. *Eur J Pharmacol*; 542: 141-147, 2006.
- 21- **Dias-Junior CA, Tanus-Santos JE:** Hemodynamic effects of sildenafil interaction with a nitric oxide donor compound in a dog model of acute pulmonary embolism. *Life Sci*; 79: 469-474, 2006.
- 22- **Raja SG, Danton MD, MacArthur KJ, Pollock JC:** Treatment of pulmonary arterial hypertension with sildenafil: From pathophysiology to clinical evidence. *J Cardiothorac Vasc Anesth*; 20: 722-735, 2006.
- 23- **Morelli A, Filippi S, Mancina R, et al:** Androgens regulate phosphodiesterase type 5 expression and functional activity in corpora cavernosa. *Endocrinology*; 145: 2253-2263, 2004.
- 24- **Foxman B, Aral SO, Holmes KK:** Common use in the general population of sexual enrichment AIDS and drugs to enhance sexual experience. *Sex Transm Dis*; 33: 156-162, 2006.