

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİKLOFOSFAMİD İLE SİSTİT OLUŞTURULAN SIÇANLARIN
DETRUSOR DÜZ KASINDA KASILMA YANITLARININ
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Uzm. Ecz. Merve DENİZALTI

**Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2015

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİKLOFOSFAMİD İLE SİSTİT OLUŞTURULAN SIÇANLARIN
DETRUSOR DÜZ KASINDA KASILMA YANITLARININ
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Uzm. Ecz. Merve DENİZALTI

**Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. N. Tuğba KANDİLCİ**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İnci ERDEMLİ**


ANKARA


2015


Anabilim Dalı :Farmakoloji AbD
 Program :Farmakoloji Programı
 Tez Başlığı :Siklofosfamid ile Sistit Oluşturulan Sıçanların Detrusor Düz
 Kasında Kasılma Yanıtlarının Mekanizmasının İncelenmesi


Öğrenci Adı-Soyadı :Merve Denizaltı
 Savunma Sınavı Tarihi :25 Aralık 2015

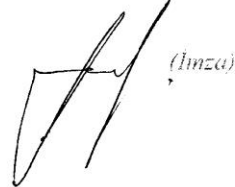
Bu çalışma jürimiz tarafından ~~yüksek lisans~~/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. M. Serdar Uma** 
 (Hacettepe Üniversitesi)

Tez danışmanı: **Doç. Dr. N. Tuğba Kandilci** 
 (Hacettepe Üniversitesi)

Üye: **Prof. Dr. Emine Demirel Yılmaz** 
 (Ankara Üniversitesi)

Üye: **Prof. Dr. Nuray Arı** 
 (Ankara Üniversitesi)

Üye: **Doç. Dr. Güray Soydan** 
 (Hacettepe Üniversitesi)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


 Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, desteğini ve ilgisini esirgemeyen değerli danışman hocalarım Prof. Dr. İnci Erdemli ve Doç. Dr. N. Tuğba Kandilci'ye,

Farmakoloji eğitimime katkıda bulunan tüm hocalarıma,

Histopatolojik bulgularımın değerlendirilmesinde bana yardımcı olan Doç. Dr. Sevgen Önder'e

Beni hayata hazırlayan, sevgi ve desteklerini eksik etmeyen anne ve babama her zaman yanımda olan kardeşime,

Çok teşekkür ederim.

ÖZET

Denizalti, M., Siklofosfamid ile Sistit Oluşturulan Sıçanların Detrusor Düz Kasında Kasılma Yanıtlarının Mekanizmasının İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2015. İnterstisyel sistit aşırı aktif mesane semptomları ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır ve mesane detrusor düz kasının kasılmasını etkilemektedir. Bu tez çalışmasında; 1., 4. ve 7. günlerde intraperitoneal olarak uygulanan siklofosfamid ile oluşturulan sistit modelinde β -eskin ile permeabilize edilmiş sıçan mesane detrusor düz kasında karbakol ile indüklenen kasılma yanıtında hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesi, hücre içi kalsiyum artışı ve kalsiyum sensitizasyonu mekanizmaları incelenmiştir. Sistitte permeabilize detrusor düz kasında karbakol ile elde edilen kasılma yanıtları artmaktadır. Sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum ile indüklenen kalsiyum salıverilmesinin indüklenmesinin yanı sıra Rho kinaz ve protein kinaz C (PKC) yolaklarının karbakol kasılmasındaki bu artışta rol oynadıkları gösterilmiştir. Ayrıca, sistitte arttığı görülen karbakol ile indüklenen kalsiyum sensitizasyonu yanıtının ise majör olarak PKC yolağı üzerinden aktive olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgular hem bu deney modelinin benzer çalışmalarda kullanılabilmesi açısından hem de sistit tedavisinde yeni ilaç moleküllerinin geliştirilebilmesi açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Siklofosfamid, mesane detrusor düz kası, karbakol, sıçan

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje No: 012D11301004) ve TÜBİTAK (Proje No: 112S352) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Denizaltı M., Investigation of Contraction Mechanisms in Detrusor Smooth Muscle of Rats Having Cyclophosphamide-Induced Cystitis, Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara 2015. Interstitial cystitis is a chronic inflammatory disease characterized by overactive bladder symptoms and it has been known to affect detrusor smooth muscle contraction. In the present study; calcium release from intracellular stores, intracellular calcium increase and calcium sensitization mechanisms were investigated on carbachol-induced contractions in permeabilized rat detrusor smooth muscle in cystitis induced by cyclophosphamide administered intraperitoneally on 1, 4 and 7 days. Carbachol-induced contractions were increased in permeabilized detrusor smooth muscle having cystitis. According to our data, both Rho kinase and protein kinase C (PKC) pathways and an induction in calcium induced calcium release from sarcoplasmic reticulum play a role in that increase. Furthermore, it was determined that PKC is a major pathway in carbachol-induced calcium sensitization that is increased in bladders of rats having cystitis. These findings are important in terms of using this experimental model in similar studies and further development of novel drug therapies in treatment of cystitis.

Key Words: Cyclophosphamide, bladder detrusor smooth muscle, carbachol, rat

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Foundation (Project No: 012D11301004) and TÜBİTAK (Project No: 112S352).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mesane Fizyolojisi	3
2.2. Mesane İnervasyonu	3
2.3. Mesane Fonksiyonunda Görülen Bozukluklar ve Sistit	5
2.4. Düz Kas Kasılma Mekanizmaları ve Kalsiyum Sensitizasyonu	6
2.5. Kimyasal Permeabilizasyon Yöntemi	7
3. GEREÇ ve YÖNTEM	9
3.1. İnterstisyel Sistitin Oluşturulması	9
3.2. Histopatoloji	9
3.3. Doku İzolasyonu	9
3.4. Deney Protokolü	10
3.5. Deneylede Kullanılan Solüsyonlar ve İlaçlar	11
3.6. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz	12
4. BULGULAR	13
4.1. Siklofosfamid ile Sistit Oluşturulan Sıçanlardan İzole Edilen Mesanelerde Histopatolojik Değişiklikler	13
4.2. İntakt (Permeabilize Edilmemiş) ve Permeabilize Detrusor Düz Kasında Karbakol ile Elde Edilen Kasılma Yanıtları	14
4.3. Karbakol ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarına Heparinin Etkisi	15
4.4. Karbakol ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarına Ryanodinin Etkisi	16
4.5. Kümülatif Kalsiyum Yanıtları	17
4.6. IP ₃ ile Elde Edilen Kasılma Yanıtları	18

4.7. Kafein ile Elde Edilen Kasılma Yanıtları	19
4.8. Karbakol ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarına Y-27632 ve GF-109203X'in Etkisi	20
4.9. Karbakol ile Elde Edilen Kalsiyum Sensitizasyonu Yanıtları	21
4.10. Karbakol ile Elde Edilen Kalsiyum Sensitizasyonu Yanıtlarına Y-27632 ve GF-109203X'in Etkisi	22
4.11. Protein Kinaz C Aktivatörü Forbol 12,13 Dibutirat ile Elde Edilen Kasılma Yanıtları	23
4.12. Karbakol ile Elde Edilen Kalsiyum Sensitizasyonu Yanıtlarına GTP- β -S'nin Etkisi	24
5. TARTIŞMA	25
6. SONUÇ ve YORUM	31
KAYNAKLAR	33
EK-1 Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler	
EK-2 Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	

SİMGELER ve KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
cADPR	Siklik adenozin difosfat riboz
CPA	Siklopiazonik asit
CPI-17	Fosfataz inhibitör protein-17 kDa
DMSO	Dimetilsülfoksit
FCCP	Karbonil siyanid p-triflurometoksifenilhidrazon
GTP	Guanizin-5'-trifosfat
GTP- β -S	Guanizin-5'-(β -tiyo) difosfat trilyum tuzu
IP ₃	İnozitol trifosfat
NAADP	Nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat
PKC	Protein kinaz C

ŞEKİLLER

	Sayfa
4.1. Siklofosfamid ile sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen mesanelerin hematoksilin-eozin boyaması sonrası örnek histopatolojik resimleri ((A) 4X, (B) 10X, (C) 20X büyütme ile).	13
4.2. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize edilmemiş (A) ve permeabilize (B) detrusor düz kasında karbakol (50 µM) ile elde edilen kasılma yanıtının kontrole göre değişimi.	14
4.3. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında karbakol (50 µM) ile elde edilen kasılma yanıtına heparinin (1 mg/mL) etkisi.	15
4.4. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında karbakol (50 µM) ile elde edilen kasılma yanıtına ryanodinin (10 µM) etkisi.	16
4.5. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında kümülatif (10^{-8} - 3×10^{-5} M) olarak elde edilen kalsiyum yanıtları.	17
4.6. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) IP ₃ ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrole göre değişimi.	18
4.7. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında farklı konsantrasyonlarda (5 ve 10 mM) kafein ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrole göre değişimi.	19
4.8. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında karbakol (50 µM) ile elde edilen kasılma yanıtına Y-27632 (1 µM), GF-109203X (5 µM) ve Y-27632+GF-109203X'in etkisi.	20

- 4.9. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında CPA (1 μ M) ve FCCP (1 μ M) varlığında karbakol (50 μ M) ile elde edilen kalsiyum sensitizasyonu yanıtının kontrole göre değişimi. 21
- 4.10. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında karbakol (50 μ M) ile elde edilen kalsiyum sensitizasyonu yanıtına Y-27632 (1 μ M), GF-109203X (5 μ M) ve Y-27632+GF-109203X'in etkisi. 22
- 4.11. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında CPA (1 μ M) ve FCCP (1 μ M) varlığında forbol 12,13 dibutirat (50 μ M) ile elde edilen kasılma yanıtının kontrole göre değişimi. 23
- 4.12. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında karbakol (50 μ M) ile elde edilen kalsiyum sensitizasyonu yanıtına GTP- β -S (1 μ M)'nin etkisi. 24
- 6.1 Düz kastaki agonist aracılı kasılma yolları 32

1. GİRİŞ

Sağlıklı ve genç bir bireyde mesane fonksiyonu; dolum fazı esnasında detrusor kasının gevşemesi ve üretral sfinkterin kasılması, miksiyon fazında ise bu durumun tersi ile sağlanmaktadır. Bu fonksiyonlar, omuriliğin sakral ve torakolumbar seviyelerinden çıkan 3 grup sinir (parasempatik, sempatik ve somatik) tarafından koordine edilmektedir (1, 2). Mesane duvarında yer alan detrusor düz kası mesanenin idrar depolamasında ve miksiyon esnasında idrarı boşaltmak için gerekli basıncı üretmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Detrusorun kasılmasında meydana gelen değişiklikler sonucunda mesanenin fizyolojik fonksiyonları etkilenmekte, işeme aciliyeti ve sıklığında artış gibi alt üriner sistem semptomları gelişebilmektedir. Bu da aşırı aktif mesane sendromunun oluşumunu tetikler. İnterstisyel sistit aşırı aktif mesane semptomları ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır ve detrusor düz kasının kasılmasını etkilemektedir. Siklofosfamid ile sistit oluşturulan sıçan mesanesinde karbakol ile indüklenen kasılma yanıtlarının arttığı bilinmektedir. Ancak bu değişimin hücresel mekanizmaları henüz aydınlatılmamıştır.

Kasılmanın hücresel mekanizmalarını incelemek için hücre membranına kimyasal ajanlar ile permeabilizasyon işlemi uygulanan çizgili ve düz kas preparatları kullanılmaktadır. Kimyasal olarak permeabilize edilmiş kas modeli ile kasılmada rol oynayan proteinlerin ve diğer hücre içi organellerin fonksiyonları araştırılabilir (3). Triton X-100, saponin, β -eskin, α -toksin gibi farklı kimyasal soyma maddeleri kullanılarak hücre membranının özellikleri bakımından farklı kas preparatları elde edilebilmektedir. Bu preparatlarda hücre dışı ve hücre içi ortamlar aynı iyonları içermekte ve bu iyonların konsantrasyonları kontrol edilebilmektedir. Kullanılan permeabilizasyon metoduna göre serbest kalsiyum konsantrasyonu arttırılarak veya hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesi başlatılarak kas aktive edilebilir. Hücre içi kalsiyum depolarından başlıcası olan sarkoplazmik retikulum, hem serbest kalsiyum konsantrasyonundaki artış ile aktive olan ryanodin reseptörlerine (kalsiyum ile indüklenen kalsiyum salıverilmesi) hem de agonist ile stimülasyon sonucunda üretilen inozitol trifosfat (IP_3) ile aktive olan IP_3 reseptörlerine sahiptir (IP_3 ile indüklenen kalsiyum salıverilmesi) (4, 5). Kas kasılmasının sarkoplazmik retikulumun hangi kanallarından kalsiyum salıverilmesi ile gerçekleştiği veya hücrede diğer bir kalsiyum

deposu olan mitokondrinin bu olaydaki rolü de permeabilizasyon işlemi kullanılarak araştırılabilir. Kalsiyum sensitizasyonuna yol açan mekanizmalar da permeabilize edilmiş düz kas preparatlarında incelenebilmektedir (6).

Bu tez çalışmasında, siklofosfamid ile sistit oluşturulmuş sıçanların detrusor düz kasında agonist aracılı kasılma yanıtlarında oluşabilecek farklılıklar plazma membranının β -eskin ile permeabilize edilmesi yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Sistit oluşturulmuş sıçanların detrusor düz kasında karbakol ile elde edilen kasılma yanıtlarında; kasılma proteinlerinin, hücre içi kalsiyum depolarının ve hücre içi kalsiyum salıverilme yollarının etkileşimi ile kalsiyum sensitizasyonu mekanizmaları incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Fizyolojisi

Mesane, üriner sistem için rezervuar görevi gören kas yapısında bir organdır. Mesane duvarı içten dışa doğru mukoza, submukoza, muskuler tabaka ve seröz tabakadan oluşur. Mesanenin düz kaslarını detrusor, trigon ve sfinkter kasları oluşturmaktadır. Detrusor kas lifleri içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler olmak üzere 3 kas tabakasından oluşur (7). Detrusor düz kasının birbirlerini serbestçe çaprazlayan düz kas demetleri; mesane boynunda dairesel özellik alarak fonksiyonel bir sfinkter özelliği kazanır. Mesane duvarında yer alan detrusor düz kası mesanenin idrar depolamasında ve miksiyon esnasında idrarı boşaltmak için gerekli basıncı üretmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Mesane fonksiyonu; dolum esnasında detrusor düz kasının gevşemesi ve üretral sfinkterin kasılması, boşaltım fazında ise bu durumun tersi ile sağlanmaktadır (8). Mesane yüksek hacimdeki idrarı (400-500 mL) mesane içi basıncında bir artış yapmaksızın depolayabilme kapasitesine sahiptir. Detrusor düz kas hücrelerinin uzunluğu tonustan bağımsız olarak değişebilmektedir (4). Depolama fazı boyunca giderek artan sempatik uyarı ve baskılanan parasempatik uyarı yolu ile mesane içi basınç düşük tutulur. Depolama fazında mesane içi basıncı (intravezikal basınç) intraüretral basınçtan düşük olduğu için kontinans sağlanır. Mesane dolmaya başlayınca mesane duvarı gerginliği artar. Mesane basıncı intraüretral basınçtan yüksek olduğu zaman sfinkter kaslarının gevşemesiyle birlikte detrusor kasılır ve boşaltım fazı gerçekleşir (8).

2.2. Mesane İnervasyonu

Mesanenin dolum ve boşaltım fonksiyonları omuriliğin sakral ve torakolumbar seviyelerinden çıkan 3 grup sinir (parasempatik, sempatik ve somatik) tarafından koordine edilmektedir. Sakral parasempatik sinirler mesanenin kolinerjik ve purinerjik (eksitatör), üretranın nitrerjik (inhibitör) inervasyonunu düzenlerler. Torakolumbar sempatik yollar ise mesane boynu ve üretranın eksitatör, mesane düz kasının inhibitör inervasyonunu sağlarlar (1, 2). Parasempatik postgangliyonik aksonlardan asetilkolin salınması mesane düz kasında muskarinik reseptörler üzerinden kasılmaya neden olmaktadır (7). Muskarinik reseptörler, G-proteini ile kenetli reseptör

ailesinden olup mesane detrusor düz kasında M_2 ve M_3 reseptör alt tiplerinin bulunduğu gösterilmiştir (9). M_2 reseptör alt tipi yoğunluğunun M_3 reseptör alt tipine göre daha fazla olmasına rağmen muskarinik agonistler aracılı meydana gelen detrusor kasılmalarından baskın olarak M_3 reseptör alt tipinin sorumlu olduğu bilinmektedir (9-12). Ancak muskarinik reseptör stimülasyonuna bağlı M_2 aracılı kasılmaların kobay ileumunda (13, 14) ve sıçan mesanesinde (15) selektif M_3 reseptör inaktivasyonu ve siklik adenosin monofosfat düzeylerindeki artışa bağlı olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. M_3 reseptörlerinin aktivasyonu hücre içi kalsiyum salıverilmesini tetiklemekte, M_2 reseptörlerinin aktivasyonu ise adenilat siklazı inhibe etmektedir (7). Asetilkolin ile stimüle edilen M_3 reseptörleri fosfoinositol hidrolizi, hücre içi kalsiyum salıverilmesi ve buna bağlı olarak kas kasılmasına neden olmaktadır (16).

Mesanede parasempatik postgangliyonik sinirlerin stimülasyonu nonkolinerjik kasılmalara da neden olmaktadır. Adenosin trifosfat (ATP) nonkolinerjik kasılmalara aracılık eden eksitatör transmitterdir. ATP mesane düz kasını ligand bağımlı iyon kanalları olan P2X pürinerjik reseptörleri üzerinden stimüle etmektedir (10, 17, 18).

Sempatik postgangliyonik sinirler salıverilen noradrenalin β_3 adrenerjik reseptörlerinin aktivasyonu ile mesane düz kasında gevşemeye ve üretra düz kasında α_1 adrenerjik reseptörler üzerinden kasılmaya neden olmaktadır (7).

Somatik aksonlardan salıverilen asetilkolin eksternal sfinkter kaslarda nikotinik kolinerjik reseptörleri aktive ederek kasılmaya neden olmaktadır (10, 19, 20).

Mesane fonksiyonlarının düzenlenmesinde santral yolaklar da rol oynamaktadır. Glutamaterjik, GABA-erjik ve peptiderjik mekanizmalar bu yolaklarda görev almaktadır. Glutamat işemenin refleks yolaklarında eksitatör nörotransmitter olarak görev almaktadır. GABA ise inhibitör nörotransmitterdir ve mesanenin refleks aktivitesini baskılar. Mesane afferent nöronlarda P maddesi, nörokinin-A, vazoaktif intestinal polipeptid, enkefalinler gibi pek çok nöropeptid bulunmaktadır. Mesaneden salıverilen bu peptidler mesane düz kas aktivitesindeki değişikliklere bağlı gelişen inflamatuvar cevaplarda rol oynamaktadırlar (1).

2.3. Mesane Fonksiyonunda Görülen Bozukluklar ve Sistit

Aşırı aktif mesane sendromu; işeme aciliyeti, işeme sıklığında artış ve idrar kaçırma gibi alt üriner sistem semptomları ile karakterize bir hastalıktır. Mesane fonksiyonunda görülen bozukluklar ve detrusorun aşırı aktivitesi aşırı aktif mesane sendromu belirtileri ile ilişkilidir (21). Detrusor düz kasının nörojenik kontrolden bağımsız olarak ürettiği spontan ritmik aktivitenin aşırı aktif mesane sendromunda arttığı bilinmektedir. Aşırı aktif mesane sendromu aynı zamanda interstisyel sistitin de altında yatan ve mesanenin dolumuna bağlı olarak suprapubik ağrı ile karakterize kronik bir hastalıktır. Üriner sistem infeksiyonlarının çoğunluğundan *Escherichia coli* sorumlu olup, bu etken de interstisyel sistite neden olabilmektedir. Dolayısı ile interstisyel sistit genellikle aşırı aktif detrusor ve mesanenin kronik inflamasyonu sonucu gelişen bir sendromdur ve mesane detrusor düz kasının kasılma fonksiyonunu değiştirebilmektedir. Patolojik şartlarda, mesanedeki muskarinik reseptör alt tiplerinin değiştiği (22-24) ve özellikle mesane inflamasyonunda kolinerjik yanıtların etkilenecek kontraktıl yanıtların azaldığı belirlenmiştir (25, 26). Detrusorun agonistlere karşı duyarlılığı; spontan aktivitesi ve kasılma proteinlerinin düzeyi, idrar yollarının obstrüksiyonu, inkontinans, aşırı aktif mesane sendromu, yaşlanma ve santral nörojenik bozukluklar gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Detrusorda meydana gelen bu değişiklikler sonucunda mesanenin normal fonksiyonları da bozulmaktadır. Bu nedenle, detrusorun inervasyonunda rolü olan mediyatörlerin hücresel etki mekanizmalarının incelenmesi mesanenin fonksiyon bozukluklarının tedavisinde önemlidir.

Rho kinaz inhibitörlerinin aşırı aktif detrusor tedavisinde kullanılabilirliğinin araştırılması yeni bir tedavi yaklaşımıdır. Bunun nedeni Rho kinazın mesane düz kas tonusu ve kasılmasındaki önemli rolünün birçok çalışmada gösterilmiş olmasıdır (27, 28). Rho kinaz yolağının düz kas kasılması dahil olmak üzere birçok hücresel fonksiyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Siklofosfamid ile interstisyel sistit oluşturulmuş sıçan detrusorunda karbakolün oluşturduğu kasılmaların Rho kinaz inhibitörü hidrosifasudil ile azaldığı gösterilmiştir (29). Ayrıca, Rho kinaz enzimi 1 ve Rho kinaz enzimi 2 mRNA ekspresyonlarının HCI ile indüklenen sistitte arttığı, Rho kinaz enzimi 1 mRNA ekspresyonundaki artışın hidrosifasudil ile inhibe olduğu bildirilmiştir (30). Protein kinaz C (PKC) yolağı ile ilgili olarak deneysel üriner

inkontinans modelinde elektriksel alan ile stimüle edilen detrusor kasılmalarının arttığı ve bu artışın da PKC inhibitörleri ile baskılanabildiği gösterilmiştir (31).

2.4. Düz Kas Kasılma Mekanizmaları ve Kalsiyum Sensitizasyonu

Düz kas kasılması normalde voltaja bağımlı kalsiyum kanalları aracılığı ile hücreye kalsiyum girişi veya sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesi sonucunda sitoplazmadaki kalsiyum artışı ile aktive olmaktadır. Düz kasın kasılması iskelet kasından farklıdır; kalsiyum kalmodulin bağlanması ve miyozin hafif zincir kinaz aktivasyonunu içerir. Düz kasın elektriksel veya hormonal uyarımı hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttıran olaylar zincirini başlatır. Depolarizasyon sonucu voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının açılması veya agonistlerle uyarılma sonucu reseptör aracılı kalsiyum kanallarının açılması ile hücre içine kalsiyum girişi sağlanır. Hücre içi kalsiyum depolarından başlıcası olan sarkoplazmik retikulum, hem serbest kalsiyum konsantrasyonundaki artış ile aktive olan ryanodin reseptörlerine (kalsiyum ile indüklenen kalsiyum salıverilmesi), hem de agonist ile stimülasyon sonucunda üretilen IP₃ ile aktive olan reseptörlere sahiptir (IP₃ ile indüklenen kalsiyum salıverilmesi) (4, 5). Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması kalsiyum-kalmodulin etkileşimi ve böylece kalsiyumun miyozin hafif zincir kinaza afinitesinin artması ile sonuçlanır. Bu enzim ile miyozin hafif zincir fosforillenir, bunu takiben çapraz köprüler gerim üretir ve kas kasılır (32).

G-proteinine kenetli reseptörler agonistler ile aktive olduklarında hücre içi kalsiyum miktarını arttırarak kalsiyum bağımlı miyozin hafif zincir fosforilasyonu ile düz kas kasılması gerçekleştirirken, bazı yan mekanizmalar ile de hücre içi kalsiyum miktarını değiştirmeksizin kasılma proteinlerinin ve düzenleyici proteinlerin kalsiyuma olan duyarlılıklarını arttırarak kas kasılmasına yol açabilirler. Kalsiyum ve miyozin hafif zincir kinaz aktivitesinin sabit olduğu koşullarda miyozin hafif zincir fosfataz aktivitesinin inhibe olması kalsiyuma verilen kasılma yanıtı eğrisinde sola kayma sağlar ve bu fizyolojik olaya da *kalsiyum sensitizasyonu* denir. Miyozin hafif zincir fosfataz 3 alt birimden oluşmaktadır. Bu alt birimler, 130 kDa büyüklüğündeki MYPT1 düzenleyici alt birimi, 37 kDa büyüklüğündeki PP1c katalitik alt birimi ve 20 kDa büyüklüğündeki M21 alt birimidir (33, 34).

Kalsiyum sensitizasyonu yolağının majör elemanı olarak G-proteinlerinin Ras grubuna ait Rho altbiriminin üyesi olan RhoA tanımlanmaktadır. RhoA aktif hale geçtiğinde sitoplazmadaki Rho kinaz enziminin aktive olmasını sağlar ve Rho kinaz da miyozin hafif zincir fosfatazın MYPT1 alt birimini fosforile ederek inhibe eder. Böylece miyozinin fosforilasyonu arttığı için kasın kasılması da artar. Kalsiyum sensitizasyonuna neden olan diğer bir yolak da yine miyozin hafif zincir fosfatazın başka bir alt birimi üzerinden çalışır. Bu ikinci yolakta rolü olan fosfataz inhibitör protein-17 kDa (CPI-17) endojen bir mediyatördür. PKC tarafından CPI-17 peptidinin fosforilasyonu miyozin hafif zincir fosfatazın PP1c alt birimini inhibe eder. Dolayısı ile fosforillenmiş miyozinin ortamda artması ile yine kalsiyum sensitizasyonu sonucu kas kasılması artar. Her iki yolak da hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun sabit tutularak miyozin hafif zincir fosforilasyonunun artması ile agonist aracılı kas kasılmasının elde edilmesinde yani kalsiyum sensitizasyonunda rol oynayan yolaklardır (6).

2.5. Kimyasal Permeabilizasyon Yöntemi

Kas kasılmasının hücrel mekanizmalarını incelemek, kasılmada rol oynayan proteinlerin ve hücre içi organellerin fonksiyonlarını araştırmak için hücre membranına kimyasal ajanlar ile permeabilizasyon işlemi uygulanabilmektedir. Kimyasal olarak permeabilize edilmiş kas modelinde, kasın plazma membranında kimyasal ajanlar aracılığı ile delikler oluşturularak hücre içi ortam ile hücre dışına uyguladığınız ortam aynı olabilmekte ve hücre içi iyon konsantrasyonu kontrol edilebilmektedir. Bu da düz kasın hücre içi depolarının, organellerinin ve sinyal transdüksiyon mekanizmalarının dış etkenlerden bağımsız bir şekilde incelenebilmesine olanak vermektedir (3). Yine bu yöntemde açılan deliklerin büyüklüğüne bağlı olarak yüksek molekül ağırlıklı bazı bloke edici/aktive edici ajanların ve antikörlerin hücre içine girişi de sağlanabilmektedir. Kimyasal permeabilizasyon için kullanılacak ajanlar arasında triton X-100, saponin, α -toksin ve β -eskin yer almaktadır. Farklı kimyasal permeabilizasyon ajanları kullanılarak hücre membranının koruduğu özellikler bakımından birbirinden değişik olan kas preparatları elde edilebilmektedir. Triton X-100, plazma membranını, reseptörler ile ilişkili olayları ve hücre içi depoları hasarlamakta ancak myofibrilleri intakt

bırakmaktadır (35, 36). Saponin, sarkoplazmik retikulum, mitokondri gibi kalsiyum depolarını etkilememekte (37) fakat reseptör-efektör kenetlenmesini selektif olarak bozmaktadır (38). β -eskin, hücre membranında 150 kDa'a kadar maddelerin geçişine izin verecek büyüklükte delikler oluşturmakta ve reseptör-efektör kenetlenmesini etkilememektedir (39). Bu yöntemle endojen guanizin-5'-trifosfat (GTP) ve kalmodulin hücre dışına kaçabilir ancak heparin ve IP_3 gibi büyük moleküllerin hücreye girişleri de bu yöntemle sağlanabilir (40, 41). α -Toksin ise β -eskine oranla daha küçük delikler (3 kDa'dan düşük molekül ağırlıklı maddelerin geçişine izin verecek büyüklükte) oluşturmakta, reseptör-efektör kenetlenmesi ve endojen kalmodulin etkilenmemektedir (40, 42).

Permeabilize kas preparatlarında hücre dışı ve hücre içi ortamlar aynı iyonları içerdiği için ortamdaki iyonların konsantrasyonları değiştirilerek hücre içi konsantrasyonlar ayarlanabilir. Kullanılan permeabilizasyon metoduna göre serbest kalsiyum konsantrasyonu artırılarak veya hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesi başlatılarak kas aktive edilebilir. Kas kasılmasının hücre içi kalsiyum depolarından başlıcası olan sarkoplazmik retikulumun hangi kanallarından kalsiyum salıverilmesi ile gerçekleştiği veya hücrede diğer bir kalsiyum deposu olan mitokondrinin bu olaydaki rolü de permeabilizasyon işlemi kullanılarak araştırılabilir. Permeabilize edilmiş kobay mesane detrusor düz kasında IP_3 reseptör blokörü heparinin karbakol ile indüklenen kasılma yanıtını inhibe ettiği (43), diğer bir çalışmada da kobay üreterinde kafein ile indüklenen kasılma yanıtının ryanodin ile bloke olduğu ancak sıçan üreterinde karbakol yanıtlarında ryanodin etkisiz olduğu gösterilmiştir (44).

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu sabit tutularak agonist aracılı kas kasılmasına (kalsiyum sensitizasyonu) yol açan mekanizmalar da permeabilize edilmiş düz kas preparatlarında incelenebilmektedir (6). Rho kinaz aracılı kalsiyum sensitizasyonu inhibisyonunun permeabilize edilmiş sıçan bronşiyal düz kasında asetilkolin aracılı kasılma yanıtını azalttığı gösterilmiştir (45). Karbakol ile indüklenen kalsiyum sensitizasyonu, sıçan mesane düz kasında Rho kinaz inhibitörü Y-27632 ve PKC inhibitörü GF 109203X varlığında inhibe olmaktadır (46).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyleerde 200-250 g ağırlığında Sprague-Dawley dişi albino sıçanlar kullanıldı. Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Etik Kurulu'ndan 2011/36-7 ve 2012/15-2 no'lu izinler alındı.

3.1. İnterstisyel Sistitin Oluşturulması

Sistit oluşturulacak sıçanlara intraperitoneal yol ile 1., 4. ve 7. günlerde günde bir kez 150 mg/kg siklofosfamid, kontrol grubuna siklofosfamidin çözücüsü olarak serum fizyolojik uygulandı.

3.2. Histopatoloji

Histopatolojik incelemeler için 8. gün sıçanlar karbondioksit gazı solutulduktan sonra karotid arterleri kanatılarak öldürüldü. Abdomen açılarak izole edilen mesane %10'luk formaldehit içerisinde konuldu. Bu solüsyon içerisinde oda sıcaklığında en az 24 saat fikse edildi. Fiksasyonu takiben parafin ile bloklanan dokular 5 µm kesitlere ayrılıp hematoksilin-eozin ile boyandı. Histopatolojik olarak epitel hasarı, hemoraji, inflamatuvar hücre filtrasyonu ve ödem değerlendirildi.

3.3. Doku İzolasyonu

8. gün sıçanlar karbondioksit gazı solutulduktan sonra karotid arterleri kanatılarak öldürüldü. Sıçanlardan mesane izole edildikten sonra HEPES tamponlu modifiye Krebs' solüsyonu içeren diseksiyon kabına alındı. Diseksiyon mikroskobu altında sıçan mesanesinin mukozası temizlenerek mesane duvarından detrusor düz kası segmentleri izole edildi. Bu segmentlerden yaklaşık 150-250 µm çapında ve 3-4 mm uzunluğunda kas preparatları hazırlandı. Bu preparatların bir ucuna 5/0 cerrahi ipek suture kullanılarak bir kement yapıldı, diğer ucuna ise 9/0 ipek mikrosuture kullanılarak halka yapıldı. Deneyleerde Perspex bir blok üzerinde bulunan 1 mL hacimdeki bir seri küçük banyodan oluşan deney düzeneği kullanıldı. HEPES tamponlu modifiye Krebs' solüsyonu içeren banyoya preparatlar kement yapılan ucu ile fikse edildi. Halka yapılan uç aracılığı ile de preparat transdüsura (*Sensitive Isometric Force Transducer*,

Biopac Data Acquisition System) bağlanarak bilgisayar aracılığı ile gerimdeki değişiklikler kayıt edildi.

3.4. Deney Protokolü

Preparatlar deney başlangıcında 100 mg bazal gerim uygulanarak HEPES tamponlu modifiye Krebs' solüsyonu içeren banyoda 30 dakika dinlendirildi. Preparatlarda 80 mM K⁺ ve 50 µM karbakol ile stabil kasılmalar alındıktan sonra kimyasal permeabilizasyon işlemine geçildi. Kas segmentleri birer dakika aralıklar ile iki kez 4 mM EGTA içeren hücre içi ortamın içeriğine benzer hücre içi solüsyon bulunan banyoda yıkandıktan sonra 40 µM β-eskin ile 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında preparatlar tekrar hücre içi solüsyon içeren banyoda birer dakika aralıklar ile 1 kez 4 mM EGTA, 3 kez 0.05 mM EGTA içeren hücre içi solüsyon ile yıkandı. Bu kimyasal permeabilizasyon işlemi takiben;

- Preparatlar 0.05 mM EGTA, 1 µM kalsiyum ve 1 µM kalmodulin içeren hücre içi solüsyon ile 10 dakika inkübe edilerek hücre içi depoların kalsiyum ile dolması ve preparatların kasılmasının stabil hale gelmesi sağlandı. Daha sonra 100 µM GTP varlığında 50 µM karbakol ile ilave kasılma yanıtı alındı. Sarkoplazmik retikulum IP₃ kanalı inhibitörü heparin (1 mg/mL), sarkoplazmik retikulum kalsiyum kanalı inhibitörü ryanodin (10 µM), Rho kinaz inhibitörü Y-27632 (1 µM), PKC inhibitörü GF-109203X (5 µM) varlığında 15 dakika inkübasyon sonrasında aynı protokol tekrarlandı.

- Kalsiyum sensitizasyonu yanıtlarını incelemek için sarkoplazmik retikulum Ca⁺²-ATPaz pompası inhibitörü siklopiazonik asit (CPA) (1 µM) ve mitokondri proton pompası inhibitörü karbonil siyanid p-triflurometoksifenilhidrazon (FCCP) (1 µM) varlığında preparatlar 0.05 mM EGTA, 1 µM kalsiyum ve 1 µM kalmodulin içeren hücre içi solüsyon ile 10 dakika inkübe edildikten sonra 100 µM GTP varlığında 50 µM karbakol ile ilave kasılma yanıtları alındı. Bu kasılma yanıtları Rho kinaz inhibitörü Y-27632 (1 µM) ve PKC inhibitörü GF-109203X (5 µM) ve G-protein inhibitörü guanozin-5'-β-tiyo)difosfat trilyum tuzu (GTP-β-S) (1 µM) varlığında 15 dakika inkübasyon sonrasında tekrarlandı.

- Sarkoplazmik retikulum Ca⁺²-ATPaz pompası inhibitörü CPA (1 µM) ve mitokondri proton pompası inhibitörü FCCP (1 µM) varlığında preparatlar 0.05 mM

EGTA, 1 μ M kalsiyum ve 1 μ M kalmodulin içeren hücre içi solüsyon ile 10 dakika inkübe edildikten sonra 100 μ M GTP varlığında PKC aktivatörü forbol-12,13-dibutirat (50 μ M) ile ilave kasılma yanıtları alındı.

- Preparatlar 0.05 mM EGTA, 1 μ M kalsiyum ve 1 μ M kalmodulin içeren hücre içi solüsyon ile 10 dakika inkübe edilerek hücre içi depoların kalsiyum ile dolmasından sonra 25, 50 μ M IP₃ ve 5, 10 mM kafein ile ilave kasılma yanıtları alındı.

- Kas segmentlerinde kalsiyuma verilen kasılma yanıtını incelemek için 10^{-8} - 3×10^{-5} M kalsiyum içeren hücre içi solüsyonlar kullanılarak konsantrasyona bağımlı kasılma yanıt eğrileri elde edildi.

3.5. Deneyleerde Kullanılan Solüsyonlar ve İlaçlar

Tüm solüsyonların hazırlanmasında 18 M Ω -cm deiyonize su (*MP Mini Pure Dest Up*) kullanıldı. İntakt preparatlarda standart fizyolojik solüsyon olarak HEPES tamponlu modifiye Krebs' solüsyonu (mM): NaCl 126; KCl 6, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1.2, glukoz 14 ve HEPES 10.5 kullanıldı. Solüsyonun pH'sı NaOH ile 7.2'ye ayarlandı. 80 mM K⁺ solüsyonu NaCl'nin ekivalan miktarda KCl ile değiştirilmesi ile hazırlandı.

Permeabilizasyondan sonra kullanılan hücre içi solüsyon (mM): K propionat 130, MgCl₂ 4, Na₂ATP 4, tris-maleat 20, kreatin fosfat 10, kreatin fosfokinaz 3.3 ünite/mL ve proteaz inhibitörü löpeptin (1 μ M). Deney protokolüne göre hücre içi solüsyona 0.05 ve 4 mM EGTA eklendi. Hücre içi solüsyonun pH'sı KOH ile 6.8'e ayarlandı.

Kullanılan ilaçlar genellikle hücre içi solüsyonlarda çözüldü. İlaçlardan siklofosamid serum fizyolojik; FCCP etanol; ryanodin metanol; CPA, GF-109203X ve forbol 12,13 dibutirat dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. Bu çözücüler tek başına kullanıldıklarında kasılma yanıtlarını etkilemediler.

Deneyleerde kullanılan Endoxan (Siklofosamid, 1 gr) Pfizer'den; β -eskin (aescin), karbamilkolin klorür (karbakol), kreatin fosfokinaz, löpeptin, EGTA, adenozin 5'trifosfat (Na₂ATP), ryanodin, heparin sodyum tuzu, GTP, CPA, kalmodulin, FCCP, D-myo-inositol 1,4,5-trisfosfat, kafein, GTP inhibitör GTP- β -S, forbol 12,13 dibutirat, DMSO Sigma (St. Louis, Missouri)'dan ve kreatin fosfat disodyum tuzu, (R)-(s)-trans-N-(4-piridil)-4-(1-aminoetil)-sikloheksankarboksamid

2HCl (Y-27632), bisindolilmaleimid I (GF-109203X) Calbiochem (Nottingham, İngiltere)'den alınmıştır.

3.6. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz

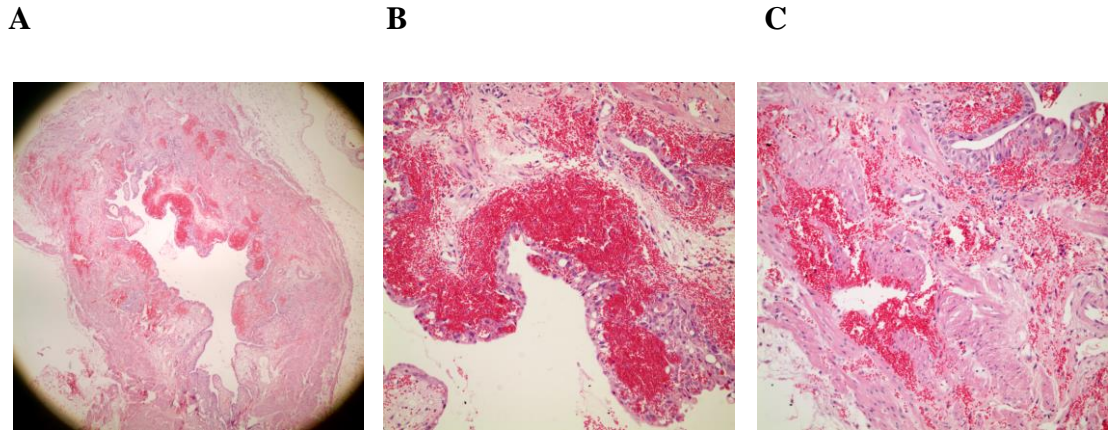
Permeabilizasyondan sonra elde edilen kasılma yanıtları intakt preparatlarda elde edilen 80 mM K⁺ kasılmasının %'si olarak ifade edildi. Değerler ortalama±standart hata olarak verildi. İntakt preparatlarda elde edilen 80 mM K⁺ kasılmaları kontrol ve sistit grubunda karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı değildir (kontrol grubu 208.8 mg ± 11.2, sistit grubu 219.9 mg ± 10.4; N=50-52).

İstatistiksel anlamlılık Student's *t*-testi ve iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. $P < 0.05$ ise ortalamalar arasındaki fark anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Siklofosfamid ile Sistit Oluşturulan Sıçanlardan İzole Edilen Mesanelerde Histopatolojik Değişiklikler

Siklofosfamid ile sistit oluşturulan sıçanlardan izole edilen mesanelerde epitel hasarı, mukoza ve kas (muskularis propria) tabakasında hemoraji, subepitelyal tabakada ise inflamatuvar hücre filtrasyonu gözlenmektedir (Şekil 4.1. A, B ve C).



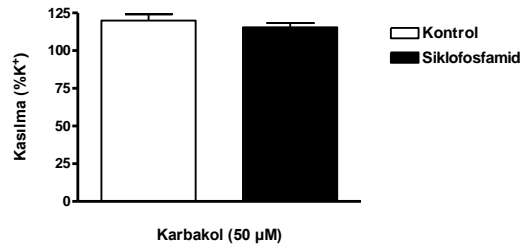
Şekil 4. 1. Siklofosfamid ile sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen mesanelerin hematoksilin-eozin boyaması sonrası örnek histopatolojik resimleri ((A) 4X, (B) 10X, (C) 20X büyütme ile). Mukoza ve kas (muskularis propria) tabakasında belirgin hemoraji gözlenmektedir (A, B, C). Ayrıca hücresel polarizasyon kaybı, çekirdek/sitoplazma oranında artış ve çekirdek hiperkromazisi ile karakterize epitel hasarı gözlenmektedir (B).

4.2. İntakt (Permeabilize Edilmemiş) ve Permeabilize Detrusor Düz Kasında Karbakol ile Elde Edilen Kasılma Yanıtları

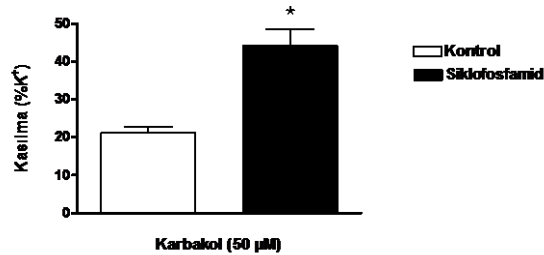
İntakt sıçan mesanesinde kalsiyum içermeyen ancak 10^{-5} M EGTA içeren modifiye Krebs solüsyonu ile 15 dk inkübasyon sonrasında hücre içi kalsiyum depoları tamamen boşaldığı için karbakol ($50 \mu\text{M}$) ile kasılma yanıtı alınamamıştır. Bir başka deney grubunda ise, β -eskin ile permeabilizasyon işleminden sonra yine hücre içi kalsiyum depoları boşaldığı için karbakol ($50 \mu\text{M}$) ile kasılma yanıtı elde edilememiştir. Agonist aracılı kasılma yanıtı alabilmek için permeabilizasyon sırasında boşalan kalsiyum depolarının 10^{-6} M kalsiyum ile 10 dk inkübasyon ile doldurulması gerekmiştir.

Siklofosfamid ile oluşturulan sistit modelinde permeabilize edilmemiş sıçan detrusorunda karbakol ($50 \mu\text{M}$) ile elde edilen kasılma yanıtı değişmezken permeabilize sıçan detrusorunda kasılma yanıtı anlamlı olarak artmaktadır (Şekil 4.2. A ve B).

A



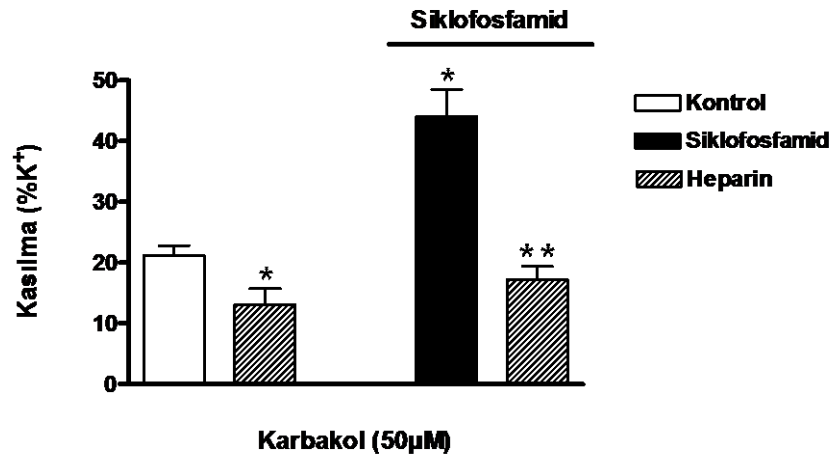
B



Şekil 4.2. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize edilmemiş (A) ve permeabilize (B) detrusor düz kasında karbakol ($50 \mu\text{M}$) ile elde edilen kasılma yanıtının kontrole göre değişimi (n=6-21, * $P < 0.05$ kontrole göre anlamlı).

4.3. Karbakol ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarına Heparinin Etkisi

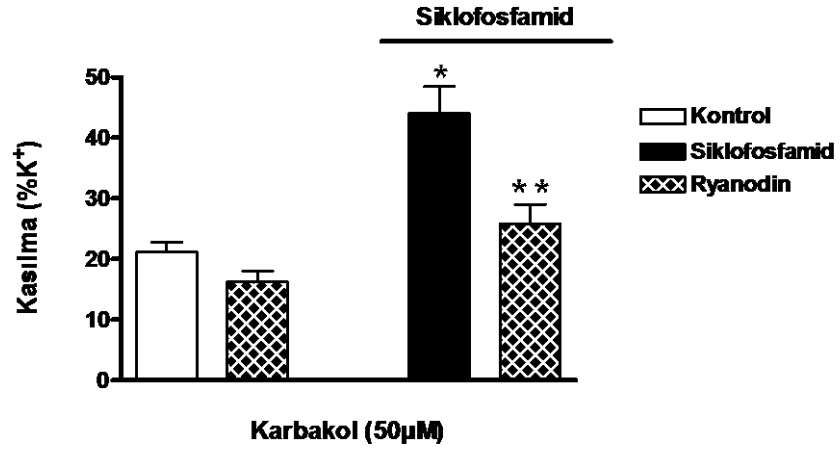
Sistit oluşturulmuş sıçanlarda karbakol ile elde edilen kasılma yanıtlarındaki değişimin hücre içi hangi mekanizmalar aracılığı ile oluştuğunun gösterilmesi için bazı inhibitörler varlığında yanıtlar incelenmiştir. Karbakol ile elde edilen kasılma yanıtı hem kontrol grubu hem de sistit oluşturulmuş sıçanların permeabilize detrusor düz kasında sarkoplazmik retikulum IP₃ kanalı inhibitörü heparin (1 mg/mL) varlığında anlamlı olarak azalmaktadır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında karbakol (50 µM) ile elde edilen kasılma yanıtına heparinin (1 mg/mL) etkisi (n=6-10, * $P < 0.05$ kontrol yanıtına göre anlamlı, ** $P < 0.05$ siklofosfamid yanıtına göre anlamlı).

4.4. Karbakol ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarına Ryanodin Etkisi

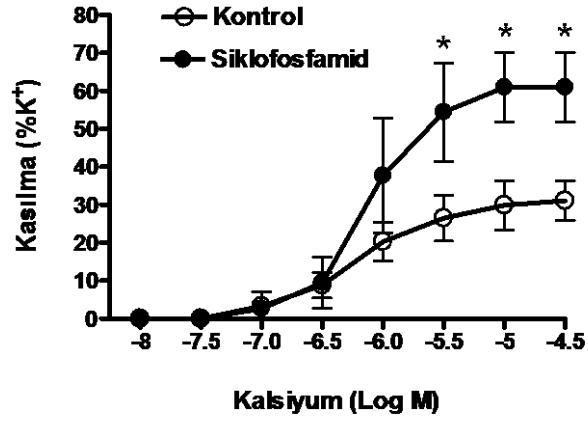
Kontrol grubu sıçanlardan izole edilen permeabilize sıçan detrusorunda sarkoplazmik retikulum kalsiyum kanalı inhibitörü ryanodin (10 μ M) varlığında karbakol ile elde edilen kasılma yanıtı değişmezken, sistit oluşturulmuş grupta bu inhibitör varlığında karbakol kasılma yanıtı anlamlı olarak azalmaktadır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında karbakol (50 μ M) ile elde edilen kasılma yanıtına ryanodin (10 μ M) etkisi (n=6-8, * P <0.05 kontrol yanıtına göre anlamlı, ** P <0.05 siklofosfamid yanıtına göre anlamlı).

4.5. Kümülatif Kalsiyum Yanıtları

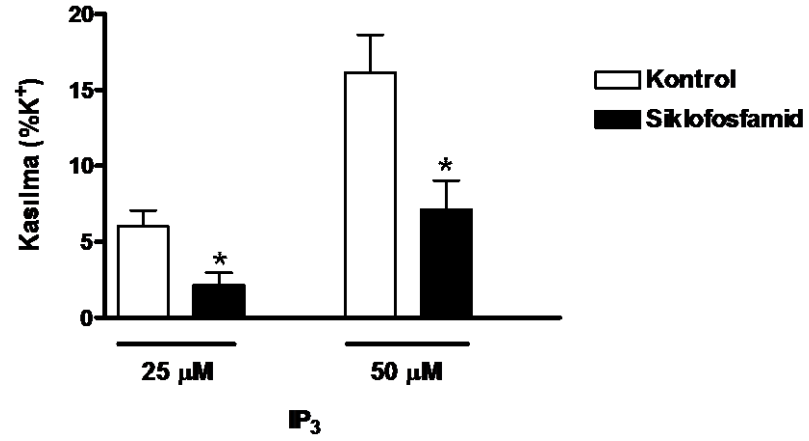
Siklofosfamid ile oluşturulan sistitte permeabilize sıçan detrusorunda konsantrasyon- bağımlı kalsiyum kasılma yanıtları kontrol grubuna göre artmaktadır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında kümülatif (10^{-8} - 3×10^{-5} M) olarak elde edilen kalsiyum yanıtları (n=6, * $P < 0.05$ kontrol yanıtına göre anlamlı).

4.6. IP₃ ile Elde Edilen Kasılma Yanıtları

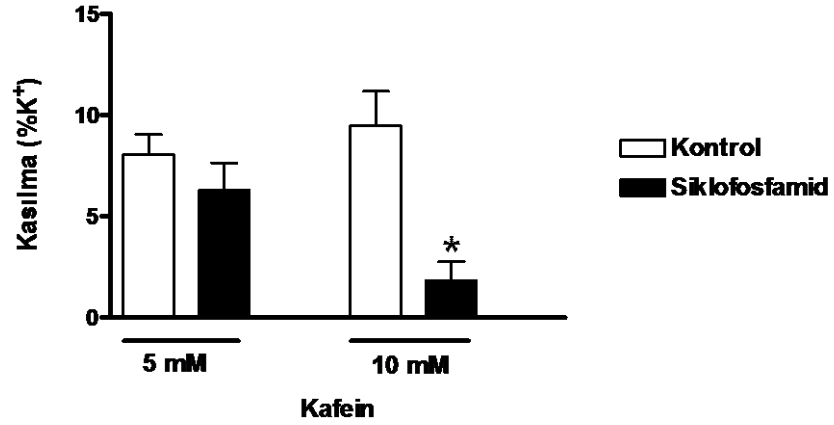
Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş permeabilize sıçan detrusor düz kasında farklı konsantrasyonlarda (25, 50 μ M) IP₃ ile kasılma yanıtları elde edildi. Sistit oluşturulmuş sıçanlarda her iki konsantrasyonda da IP₃ ile elde edilen kasılma yanıtları anlamlı olarak azalmaktadır (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) IP₃ ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrole göre değişimi (n=6-9, * P <0.05 kontrol yanıtına göre anlamlı).

4.7. Kafein ile Elde Edilen Kasılma Yanıtları

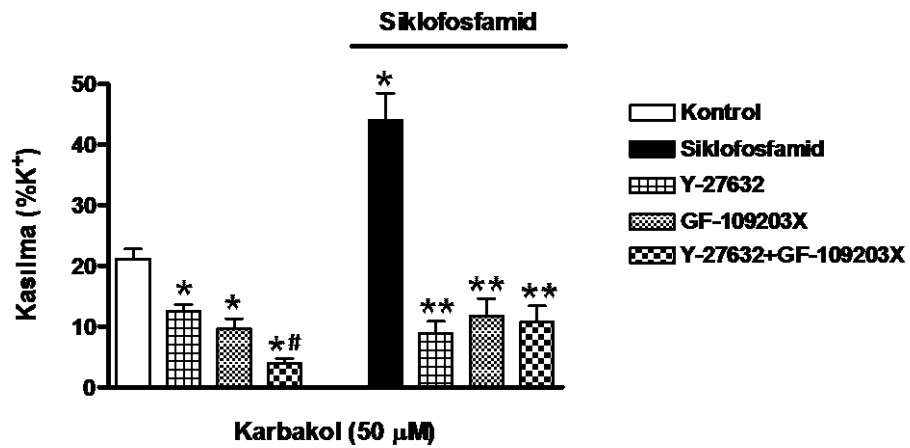
Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş permeabilize sıçan detrusor düz kasında farklı konsantrasyonlarda (5 ve 10 mM) kafein ile kasılma yanıtları elde edildi. Sistit oluşturulmuş sıçanlarda 5 mM kafein ile elde edilen kasılma yanıtı değişmezken; 10 mM kafein ile elde edilen kasılma yanıtı anlamlı olarak azalmaktadır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında farklı konsantrasyonlarda (5 ve 10 mM) kafein ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrole göre değişimi (n=6-9, * $P < 0.05$ kontrol yanıtına göre anlamlı).

4.8. Karbakol ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarına Y-27632 ve GF-109203X'in Etkisi

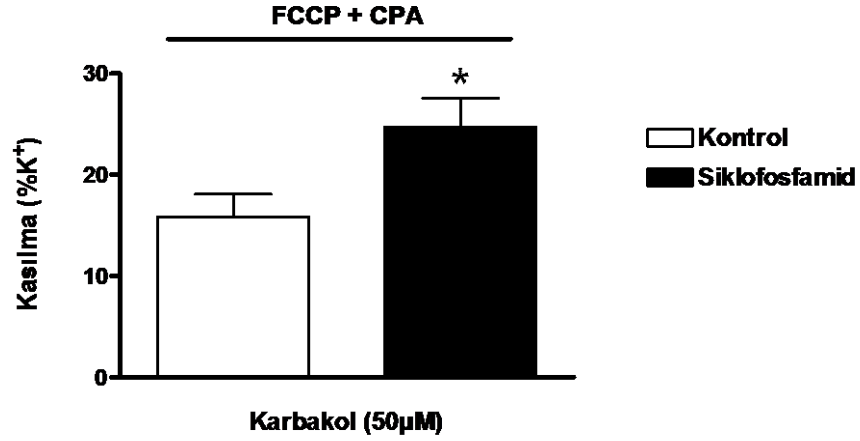
Sistit oluşturulmuş permeabilize sıçan detrusorunda karbakol ile elde edilen kasılma yanıtı artmaktadır. Sistit grubunda artmış kasılma yanıtı Rho kinaz inhibitörü Y-27632 (1 μ M) ve PKC inhibitörü GF-109203X (5 μ M) ile anlamlı olarak inhibe olmaktadır. Kontrol grubunda da karbakol ile elde edilen kasılma yanıtları Y-27632 ve GF-109203X ile anlamlı olarak inhibe olmaktadır. Bu iki inhibitör beraber verildiklerinde de kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş grupta yanıtlar anlamlı olarak inhibe olmaktadır. Kontrol grubunda beraber verildiklerinde elde edilen kasılma yanıtı ayrı ayrı verildiklerinde elde edilen kasılma yanıtları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalma görülmektedir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında karbakol (50 μ M) ile elde edilen kasılma yanıtına Y-27632 (1 μ M), GF-109203X (5 μ M) ve Y-27632+GF-109203X'in etkisi (n=6-8, * P <0.05 kontrol yanıtına göre anlamlı, ** P <0.05 siklofosfamid yanıtına göre anlamlı, # P <0.05 Y-27632 veya GF-109203X varlığındaki kontrol yanıtına göre anlamlı).

4.9. Karbakol ile Elde Edilen Kalsiyum Sensitizasyonu Yanıtları

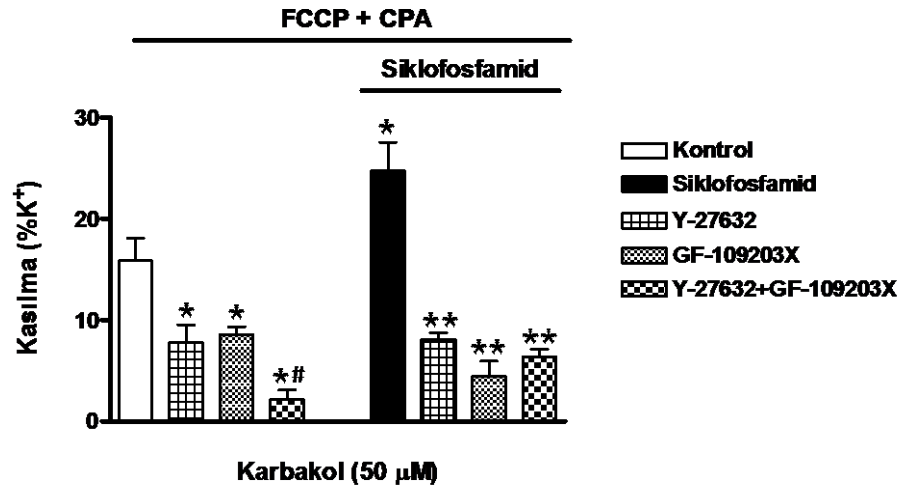
Sistit oluşturulmuş permeabilize sıçan detrusorunda sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} -ATPaz pompası inhibitörü CPA (1 μ M) ve mitokondri proton pompası inhibitörü FCCP (1 μ M) varlığında karbakol ile elde edilen kalsiyum sensitizasyonu yanıtı anlamlı olarak artmaktadır (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında CPA (1 μ M) ve FCCP (1 μ M) varlığında karbakol (50 μ M) ile elde edilen kalsiyum sensitizasyonu yanıtının kontrole göre değişimi (n=8, * P <0.05 kontrol yanıtına göre anlamlı).

4.10. Karbakol ile Elde Edilen Kalsiyum Sensitizasyonu Yanıtlarına Y-27632 ve GF-109203X'in Etkisi

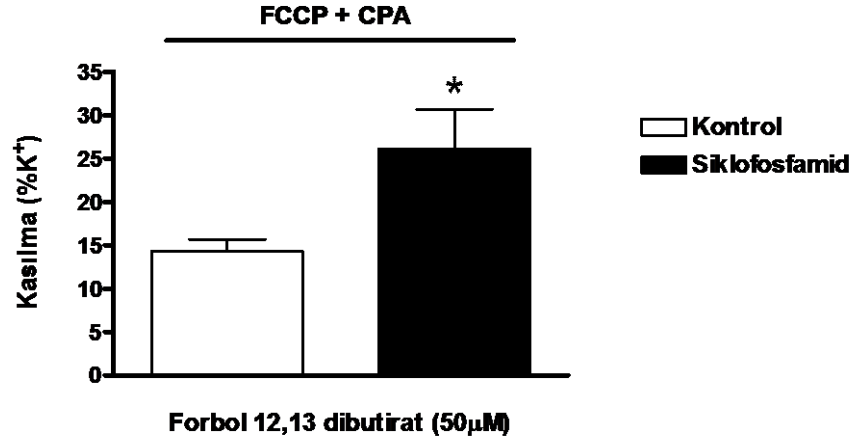
Sistit oluşturulmuş permeabilize sıçan detrusorunda CPA (1 μ M) ve FCCP (1 μ M) varlığında karbakol ile elde edilen kalsiyum sensitizasyonu yanıtı artmaktadır. Kalsiyum sensitizasyonu yanıtı hem kontrol grubu hem de sistit oluşturulmuş sıçanlarda Rho kinaz inhibitörü Y-27632 (1 μ M) ve PKC inhibitörü GF-109203X (5 μ M) ile anlamlı olarak inhibe olmaktadır. Bu iki inhibitör beraber verildiklerinde de kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş grupta yanıtlar anlamlı olarak inhibe olmaktadır. Kontrol grubunda beraber verildiklerinde elde edilen kasılma yanıtı ayrı ayrı verildiklerinde elde edilen kasılma yanıtları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalma görülmektedir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında karbakol (50 μ M) ile elde edilen kalsiyum sensitizasyonu yanıtına Y-27632 (1 μ M), GF-109203X (5 μ M) ve Y-27632+GF-109203X'in etkisi (n=6-8, * P <0.05 kontrol yanıtına göre anlamlı, ** P <0.05 siklofosfamid yanıtına göre anlamlı, # P <0.05 Y-27632 veya GF-109203X varlığındaki kontrol yanıtına göre anlamlı).

4.11. Protein Kinaz C Aktivatörü Forbol 12,13 Dibutirat ile Elde Edilen Kasılma Yanıtları

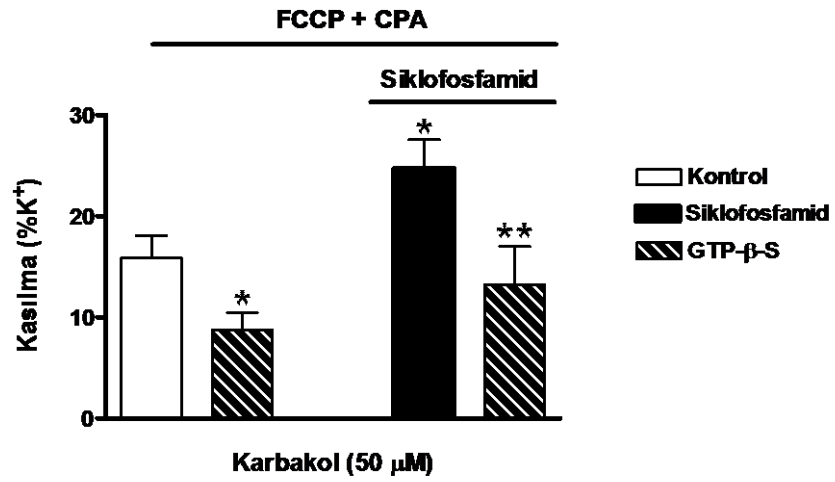
Sistit oluşturulmuş permeabilize sıçan detrusorunda CPA (1 μM) ve FCCP (1 μM) varlığında PKC aktivatörü forbol 12,13 dibutirat (50 μM) ile elde edilen kasılma yanıtı anlamlı olarak artmaktadır (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında CPA (1 μM) ve FCCP (1 μM) varlığında forbol 12,13 dibutirat (50 μM) ile elde edilen kasılma yanıtının kontrole göre değişimi (n=6, * P <0.05 kontrol yanıtına göre anlamlı).

4.12. Karbakol ile Elde Edilen Kalsiyum Sensitizasyonu Yanıtlarına GTP- β -S'nin Etkisi

Sistit oluşturulmuş permeabilize sıçan detrusorunda karbakol ile elde edilen kalsiyum sensitizasyonu yanıtı artmaktadır. G-protein inhibitörü GTP- β -S (1 μ M) varlığında karbakol ile elde edilen kalsiyum sensitizasyonu yanıtı hem kontrol grubunda hem de sistit oluşturulmuş grupta anlamlı olarak azalmaktadır (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Kontrol grubu ve sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen permeabilize detrusor düz kasında karbakol (50 μ M) ile elde edilen kalsiyum sensitizasyonu yanıtına GTP- β -S (1 μ M)'nin etkisi (n=6-8, * P <0.05 kontrol yanıtına göre anlamlı, ** P <0.05 siklofosfamid yanıtına göre anlamlı).

5. TARTIŞMA

İnterstisyel sistit, mesanede gelişen inflamasyonun yanı sıra, işeme aciliyetinde ve işeme sıklığında artış ile karakterize kronik bir sendromdur. İnterstisyel sistit gibi inflamasyona yol açan kronik hastalıkların mesane fonksiyonları üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar literatürde yer almaktadır (22-26). Ancak, siklofosfamid ile indüklenen sistit modelinde mesane düz kasında oluşabilecek değişikliklerin permeabilizasyon yöntemi ile incelendiği bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında mesane detrusor düz kası permeabilizasyonu için kullanılan β -eskin, reseptör-efektör kenetlenmesini bozmadan plazma membranında delikler açarak agonist ile indüklenen düz kas kasılmasının hücre içi moleküler mekanizmalarının, özellikle de hücre içi depolardan kalsiyum salıverilme yollarının incelenmesine olanak vermiştir.

Siklofosfamid enjeksiyonu fare ve sıçanlarda deneysel sistit oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (47). Siklofosfamid karaciğerde ürotoksik metaboliti akroleine dönüşen bir antitümör ajandır. Kanser tedavisinde kullanılan siklofosfamid yaygın bir komplikasyonu olan sistit oluşmasında akroleinin sorumlu ajan olduğu bilinmektedir. Akrolein mesane duvarında ödem, ülserasyon, hemoraji ve nekroz gelişimine yol açmaktadır (47-49). Siklofosfamid uygulamasından sonra da epitel hasarı, hemoraji, hücresel filtrasyon ve ödem gibi histopatolojik değişiklikler gözlenmektedir (50-52). Bu tez çalışmasında da, literatürdeki bu bulgulara paralel olarak, siklofosfamid ile sistit oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen mesanelerde hematoksilen-eozin boyaması sonrası epitel hasarı, ödem, mukoza ve kas (muskularis propria) tabakasında hemoraji ile subepitelyal tabakada inflamatuvar hücre filtrasyonu gözlenmektedir.

Sistit, mesane detrusor düz kasının kasılma fonksiyonunu değiştirebilmekte ve buna bağlı olarak mesanenin normal işlevleri bozulabilmektedir (22, 23, 25, 26). Bu nedenle, siklofosfamid ile oluşturulan sistit modelinde mesane detrusor düz kasının agonist aracılı kasılmasında meydana gelen değişikliklerin hücre içi mekanizmalarının incelenmesi yeni ilaçların geliştirilebilmesi açısından önemlidir. Bu tez çalışmasında sistit modelinde permeabilize edilmemiş sıçan detrusorunda karbakol ile elde edilen kasılma yanıtları değişmezken permeabilize sıçan detrusorunda karbakol kasılma

yanıtları anlamlı olarak artmaktadır. Düz kaslardaki kasılma mekanizmaları voltaja bağımlı kalsiyum kanalları aracılığı ile hücreye kalsiyum girişi ile veya sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesi sonucunda sitozolik kalsiyumdaki artış ile aktive olmaktadır. Permeabilize düz kaslarda plazma membranındaki iyon kanalları ortadan kaldırıldığı için sadece hücre içi depoların kasılma mekanizmaları incelenebilir. Dolayısı ile bu bulgu bize hücre içi kalsiyum salıverilmesi yolaklarının veya hücre içi kalsiyum depolarının sistit oluşumundan etkilendiğini ve buna bağlı olarak daha fazla kalsiyum salıverildiğini düşündürmektedir. Literatürde *E.coli* ile indüklenen sistitte karbakol kasılma yanıtlarının mesanede arttığını bildiren bir çalışma bulunmaktadır (53). Ayrıca, intravezikal olarak LPS uygulamasından sonra sıçan detrusor şeritlerinde elektriksel alan uyarısı ile elde edilen kasılma yanıtlarının arttığı da bilinmektedir (31). Yine siklofosamid ile indüklenen sistitte erkek Sprague-Dawley sıçanlarda işeme refleksinde bir artış olduğu gösterilmiştir (54).

Permeabilize edilmemiş detrusor düz kasında karbakol kasılmasının değişmemesi, hücre içi kalsiyumun artmasına rağmen hücre membranındaki iyon kanalları gibi bazı faktörlerin etkinliği sonucunda ortamdaki kalsiyum konsantrasyonunun aynı kalması nedeni ile olabilir. Yine mesane detrusor düz kasi için de geçerli olan bir başka durum hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesinin global kalsiyum konsantrasyonu üzerine çok küçük bir etki yapması, buna karşılık lokal kalsiyum konsantrasyonunda anormal bir artışa neden olabilmesidir. Kalsiyum “spark”ları olarak bilinen bu lokal kalsiyum salıverilmesi hemen yakınında bulunan kanalları veya yolakları aktive etmektedir (55, 56). Bizim çalıştığımız deney koşullarında da sistit ile aktive olan hücre içi sinyal transdüksiyon yolaklarının sadece sitoplazmadaki kalsiyum salıverilmesini arttırması olasıdır.

Detrusor düz kasının başlıca hücre içi kalsiyum deposu olan sarkoplazmik retikulum, hem serbest kalsiyum konsantrasyonundaki artış ile aktive olan ryanodin reseptörlerine (kalsiyum ile indüklenen kalsiyum salıverilmesi), hem de agonist ile stimülasyon sonucunda üretilen IP_3 ile aktive olan reseptörlere sahiptir (IP_3 ile indüklenen kalsiyum salıverilmesi) (57-59). Dolayısı ile sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilme mekanizmalarını incelemek için IP_3 kanalı inhibitörü heparin ile kalsiyum kanalı inhibitörü ryanodinin karbakol ile elde edilen kasılma yanıtları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Heparin molekül ağırlığı yüksek bir inhibitördür

ancak β -eskin ile permeabilize edilmiş düz kaslara girebilmektedir. Bu tezdeki deney koşulları altında heparin hem kontrol grubunda hem de sistit oluşturulmuş grupta karbakol ile elde edilen kasılma yanıtlarını anlamlı olarak azaltmaktadır. Ryanodin varlığında ise kasılma yanıtları kontrol grubunda değişmezken sistit oluşturulmuş grupta anlamlı olarak azalmaktadır. Buna göre sistit oluşturulmuş grupta karbakol ile elde edilen kasılma yanıtlarında hem IP_3 ile indüklenen hem de kalsiyum ile indüklenen kalsiyum salıverilmesinin rolü olduğu görülmektedir. Heparin ile elde edilen inhibisyon oranının kontrol grubunda % 38, sistit grubunda % 61 olması, artmış karbakol kasılmasında IP_3 'ün rolünü vurgulamaktadır. Buna ilave olarak, ryanodin ile kontrol grubunda karbakol yanıtında anlamlı bir inhibisyonun olmaması (% 23), sistit grubunda ise % 41 azalma olması, artmış karbakol yanıtında kalsiyum ile indüklenen kalsiyum salıverilmesinin rolünü göstermektedir.

Kalsiyum, kalmoduline bağlanarak kas kasılmasını başlatmaktadır (6). β -eskin ile permeabilize edilmiş detrusor düz kası mikromolar konsantrasyondaki kalsiyuma duyarlıdır ve kasılması beklenir. Bu tez kapsamında da 10^{-8} - 3×10^{-5} M aralığında artan konsantrasyonlarda elde edilen kalsiyum yanıt eğrisi sistitli grupta yüksek konsantrasyonlarda anlamlı artış göstermiştir. Kalsiyum ile indüklenen bu kasılma öncelikle düşük konsantrasyonlarda hücre içi kontraktıl proteinlerin duyarlılığını, sonrasında da yüksek konsantrasyonlarda kalsiyum ile indüklenen kalsiyum salıverilmesini göstermektedir (60). Ortama eklenen kümülatif kalsiyum konsantrasyonu arttıkça, sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum ile indüklenen kalsiyum salıverilmesinin de potansiyalize olduğu bilinmektedir. Dolayısı ile bulgularımız, sistitte mesane detrusor düz kasında kontraktıl proteinlerde bir farklılık olmadığını ancak kalsiyum ile indüklenen kalsiyum salıverilmesinde bir artış olduğunu düşündürmektedir. Bu da sistitli grupta artmış karbakol yanıtının ryanodin ile inhibe olması ile uyumlu bir bulgudur.

Ancak burada ortama hem IP_3 hem de kalsiyum kanalının aktivatörü olarak farklı iki konsantrasyonda sırası ile IP_3 ve kafein eklendiğinde şaşırtıcı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Heparin ve ryanodinin sistit grubunda karbakol kasılmasındaki artışı inhibe etmesi sarkoplazmik retikulumun her iki kanalının da bu yanıtta etkin olduğunu düşündürmekte; dolayısı ile bu kanalların aktivatörü IP_3 ve kafein ile alınan kasılma yanıtlarında da sistit grubunda artış beklenmekteydi. Buna karşılık, iki farklı

konsantrasyonda IP_3 ile elde edilen kasılma yanıtları sistit grubunda inhibe olmaktadır. Sistitte IP_3 reseptör dansiteleri azalıyor olabilir. Sistitte muskarinik reseptörlerin ekspresyonlarının ve dansitelerinin değiştiğini gösteren çalışmalar vardır (22, 23, 24). Ayrıca bu beklenmedik sonuç kullanılan heparin konsantrasyonunun sadece IP_3 kanallarını inhibe etmediğini de düşündürmektedir. Heparinin yüksek konsantrasyonlarda kalsiyumu şelate ederek kasılmayı inhibe edici bir etkisi bulunmaktadır (41). Kafein ile elde edilen kasılma yanıtlarına bakıldığında ise 5 mM ile elde edilen kasılma yanıtının sistitte değişmediği ancak 10 mM ile elde edilen kasılmanın bloke olduğu görülmektedir. Bu sonuç da ilginçtir ancak kafein sarkoplazmik retikulumdan IP_3 ile indüklenen kalsiyum salıverilmesini de inhibe edebilmektedir ve 10 mM gibi yüksek bir konsantrasyondaki etkisinin spesifik olup olmadığı bilinmemektedir (66, 67). Ayrıca sistitte IP_3 reseptörlerinde olduğu gibi ryanodin reseptörlerinin dansitelerinde de azalma meydana gelmiş olabilir.

Karbakol yanıtındaki artıştan sorumlu olabilecek hücre içi diğer ikincil ulaklar son zamanda bazı düz kaslarda fizyolojik kasılmalarda yer aldıkları bilinen siklik adozin difosfat riboz (cADPR) ve nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat (NAADP)'dır (61-63). cADPR sarkoplazmik retikulum ryanodin kanallarından kalsiyum salıverilmesini (62, 64), NAADP ise hücre içi asidik organellerden (lizozom gibi) kalsiyum salıverilmesini (65) tetiklemektedir. Bu ikincil ulakların hem birbirleri ile hem de IP_3 ile etkileşerek sistitte artmış karbakol yanıtında yer almış olmaları muhtemeldir.

Hücre içi kalsiyum salıverilmesinde rolü olan Rho kinaz ve PKC yollarının sistitteki karbakol kasılmasındaki artıştan sorumlu olup olmadıklarını anlamak için bu iki yolağın inhibitörleri kullanıldı. Kontrol grubunda karbakol kasılma yanıtlarının Rho kinaz inhibitörü Y-27632 ve PKC inhibitörü GF-109203X ile ayrı ayrı inhibe olduğu ve bu iki inhibitör birlikte verildiğinde de inhibisyonun potansiyalize olduğu görülmektedir. Literatürde de farklı türlerde indüklenen inflamasyona bağlı mesane disfonksiyonlarında altta yatan mekanizmaların farklılığı gösterilmiştir. Weng ve ark. da yaptıkları çalışmada sıçan detrusor düz kasında LPS uygulamasından sonra artan kasılma yanıtını PKC inhibitörü Ro32-0432'nin inhibe ettiğini göstermişlerdir (31). Buna karşılık, dişi Sprague-Dawley sıçanlarda Rho kinaz inhibitörü hidrokisfasudil tedavisinin HCl ile indüklenen sistitin mesane düz kasında yaptığı sistometrik

disfonksiyondan ve histopatolojilerden koruduğu belirtilmiştir (30). Ancak deney şartlarımız altında, sistit grubunda yine her iki inhibitör ayrı ayrı uygulandığında karbakol kasılmalarını inhibe etmekte iken, bu iki inhibitörün birlikte verilmeleri daha fazla bir inhibisyona yol açmamıştır. Bu bulgu bize sistitte Rho kinaz ve PKC yolağı arasında birbirlerinin kasılmalarını potansiyalize ettikleri bir “crosstalk” olduğunu düşündürmektedir. Sarkoplazmik retikulumdan IP_3 aracılı kalsiyum salıverilmesindeki artışın kalsiyum aracılı kalsiyum salıverilmesini daha da arttırdığı bilinmektedir (56, 68, 69). Dolayısı ile iki inhibitörün bir arada verilmesi ile tek tek verilmeleri arasında bir fark olmaması bu şekilde açıklanabilir.

Düz kasın hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış ile kasılmasından bağımsız olarak bir de kalsiyum sensitizasyonu ile kasıldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (32, 34). Buna göre, hücre içi kalsiyum ve miyozin hafif zincir kinaz aktivitesinin sabit olduğu durumda agonistler ile aktive edilen G-protein kenetli reseptörler kasılmaya neden olabilirler ve bu duruma da *kalsiyum sensitizasyonu* denir (70, 71). Düz kasta kalsiyum sensitizasyonu iki yolak aracılığı ile miyozin hafif zincir fosfataz inhibisyonuna yol açmaktadır. Miyozin hafif zincir fosfataz inhibisyonu direkt Rho kinaz tarafından veya PKC üzerinden fosfataz inhibitörü CPI-17'nin fosforilasyonu ile indüklenir (72, 73). Bu mekanizmalar kimyasal olarak permeabilize edilmiş düz kas preparatlarında hücre içi ortam ile hücre dışına uyguladığımız ortam aynı olduğundan hücre içi iyon konsantrasyonu kontrol edilebildiği için kolaylıkla incelenebilmektedir.

Siklofosfamid ile oluşturulan sistitte permeabilize sıçan detrusorunda karbakol ile indüklenen kalsiyum sensitizasyonu yolakları da incelenmiştir. Sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} -ATPaz pompası inhibitörü CPA ve mitokondri proton pompası inhibitörü FCCP varlığında, ortamda kalsiyum sabit iken karbakol ile indüklenen kalsiyum sensitizasyonu yanıtları sistit oluşturulmuş sıçanlarda artmaktadır. Kontrol grubunda da siklofosfamid grubunda da kalsiyum sensitizasyonu yanıtları hem Rho kinaz inhibitörü Y-27632 hem de PKC inhibitörü GF-109203X ile inhibe olmaktadır. Kalsiyum sensitizasyonu yanıtları GF-109203X ile kontrol grubunda % 46 inhibe olurken, sistit grubunda ise % 82 inhibe olmuştur. Y-27632 varlığında ise kalsiyum sensitizasyon yanıtları kontrol grubunda % 51 inhibe olurken, sistit grubunda ise % 67 inhibe olmuştur. Her iki gruba da inhibitörler birarada uygulandığında, kontrol

grubunda inhibisyonun potansiyalize olduğu ancak sistit grubunda bu iki inhibitörün birlikte verilmesinin inhibisyon oranını daha fazla arttırmadığı görülmüştür. Bu da bir önceki bölümde bahsettiğimiz “crosstalk” olasılığını güçlendirmektedir. Burada, sistit grubunda her iki inhibitörün ayrı ayrı yaptığı inhibisyonlar karşılaştırıldığında PKC inhibitörünün Rho kinaz inhibitörüne göre karbakol yanıtını anlamlı olarak daha fazla inhibe ettiği görülmüştür. Bu bulgumuz sistitte kalsiyum sensitizasyonu oluşturulan şartlarda PKC yolağının daha fazla aktive olabileceğini düşündürmektedir.

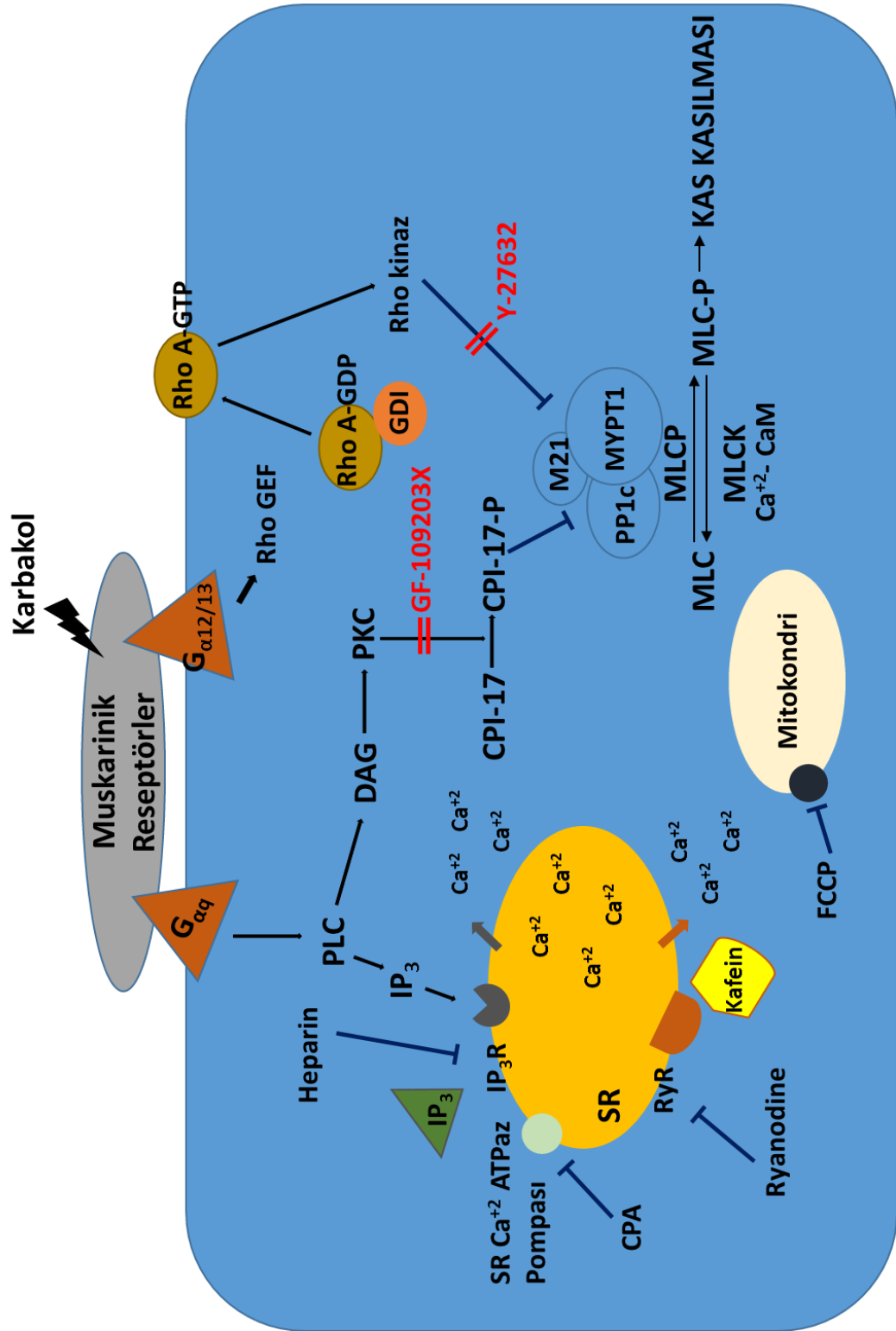
PKC yolağının sistitte aktive olup olmadığını görebilmek için PKC aktivatörü forbol 12,13-dibutirat ile kasılma yanıtı elde edildi. Sistitte permeabilize sıçan detrusorunda CPA ve FCCP varlığında forbol 12,13-dibutirat ile elde edilen kasılma yanıtının arttığı gözlenmiştir. Bu da PKC inhibitörü ile elde ettiğimiz önceki bulgumuzu desteklemektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada forbol 12,13 dibutirat uygulamasının detrusor düz kasında elektriksel alan stimülasyonu ile elde edilen kasılma yanıtlarını arttırdığı gösterilmiştir (31). Ancak, kobay mesanesinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise obstrüksiyon sonucu gelişen disfonksiyonda karbakol ile indüklenen kalsiyum sensitizasyonu kasılmasının yanıtının arttığı ancak bu artıştan PKC yolağına göre Rho kinaz yolağının daha fazla sorumlu olduğu belirtilmiştir (74).

Tüm deneylerin sonucunda karbakol ile elde edilen kasılma yanıtının G-proteine kenetli reseptörler aracılığı ile meydana geldiğini doğrulamak için G-protein inhibitörü GTP- β -S ortama eklenmiştir. Bulgularımıza göre kalsiyum sensitizasyonu yanıtlarının hem kontrol hem de sistit oluşturulmuş grupta GTP- β -S varlığında azalması da kasılma yanıtlarının G-proteini aracılığı ile oluştuğunu vurgulamaktadır.

6. SONUÇ ve YORUM

Bu tez çalışmasında siklofosfamid ile oluşturulan sistit modelinde β -eskin ile permeabilize edilmiş sıçan mesane detrusor düz kasında karbakol ile indüklenen kasılma yanıtında hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesi, hücre içi kalsiyum artışı ve kalsiyum sensitizasyonu mekanizmaları incelenmiştir. Sistitte permeabilize detrusor düz kasında karbakol ile elde edilen kasılma yanıtları artmaktadır. Sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum ile indüklenen kalsiyum salıverilmesinin indüklenmesinin yanı sıra Rho kinaz ve PKC yolaklarının karbakol kasılmasındaki bu artışta rol oynadıkları gösterilmiştir. Ayrıca, sistitte arttığı görülen karbakol ile indüklenen kalsiyum sensitizasyonu yanıtının ise majör olarak PKC yolağı üzerinden aktive olduğu belirlenmiştir.

Literatüre uyumlu olarak bu tez çalışmasında da sistitin mesane detrusor düz kasının kasılma fonksiyonunu etkilediği gösterilmiştir. Elde edilen bulgular hem bu deney modelinin benzer çalışmalarda kullanılabilmesi açısından hem de sistit tedavisinde yeni ilaç moleküllerinin geliştirilebilmesi açısından önemlidir. Ürogenital hastalıkların altında yatan farklı moleküler mekanizmalar birçok araştırmacı tarafından incelenmekte ve elde edilen sonuçlar ise her geçen gün yeni ilaç molekülü adaylarının ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Çalışmamız özellikle siklofosfamidin kanser tedavisinde kullanılışı ve yan etki olarak sistit görülme sıklığı değerlendirildiğinde, mesane fizyolojisinde oluşabilecek değişikliklerin öngörülerek engellenmesine de katkı sağlayabilecektir.



Şekil 6.1. Düz kastaki agonist aracılı kasılma yolları

KAYNAKLAR

1. de Groat, W.C., Yoshimura, N. (2001) Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 691-721.
2. Fry, C.H. (2004) Experimental models to study the physiology, pathophysiology, and pharmacology of the lower urinary tract. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 49 (3), 201-210.
3. Nasu, T. (1989) Actions of some drugs on skinned smooth muscle preparations. *Gen Pharmacol*, 20 (2), 123-131.
4. Andersson, K.E. (1993) Pharmacology of Lower Urinary Tract Smooth Muscles and Penile Erectile Tissues. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 45 (3), 253-308.
5. Wibo, M., Godfraind, T. (1994) Comparative localization of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in intestinal smooth muscle: an analytical subfractionation study. *Biochem J*, 297 (Pt 2), 415-423.
6. Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, 83 (4), 1325-1358.
7. Andersson, K.E., Arner, A. (2004) Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 84 (3), 935-986.
8. Turner, W.H., Brading, A.F. (1997) Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Pharmacol Ther*, 75 (2), 77-110.
9. Wang, P., Luthin, G.R., Ruggieri, M.R. (1995) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. *J Pharmacol Exp Ther*, 273 (2), 959-966.
10. de Groat, W.C., Griffiths, D., Yoshimura, N. (2015) Neural control of the lower urinary tract. *Compr Physiol*, 5 (1), 327-396.
11. Matsui, M., Motomura, D., Fujikawa, T., Jiang, J., Takahashi, S., Manabe, T. ve diğeri. (2002) Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci*, 22 (24), 10627-10632.

12. Schneider, T., Fetscher, C., Krege, S., Michel, M.C. (2004) Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of human urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther*, 309 (3), 1148-1153.
13. Reddy, H., Watson, N., Ford, A.P., Eglen, R.M. (1995) Characterization of the interaction between muscarinic M2 receptors and beta-adrenoceptor subtypes in guinea-pig isolated ileum. *Br J Pharmacol*, 114 (1), 49-56.
14. Thomas, E.A., Baker, S.A., Ehlert, F.J. (1993) Functional role for the M2 muscarinic receptor in smooth muscle of guinea pig ileum. *Mol Pharmacol*, 44 (1), 102-110.
15. Hegde, S.S., Choppin, A., Bonhaus, D., Briaud, S., Loeb, M., Moy, T.M. ve diğeri. (1997) Functional role of M2 and M3 muscarinic receptors in the urinary bladder of rats in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 120 (8), 1409-1418.
16. Harriss, D.R., Marsh, K.A., Birmingham, A.T., Hill, S.J. (1995) Expression of muscarinic M3-receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis in human detrusor cultured smooth muscle cells. *J Urol*, 154 (3), 1241-1245.
17. Burnstock, G. (2001b). Purinergic signalling in the lower urinary tract. M. Williams, Abbracchio, M.P. (Ed.). Handbook of Experimental Pharmacology (s. 423). Berlin: Springer Verlag
18. Ralevic, V., Burnstock, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50 (3), 413-492.
19. de Groat, W.C. (2006) Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 2, S25-40.
20. Morrison, J.B., L.; Craggs, M. (2005). Neural control. P. C. Abrams, L.; Khoury, S.; Wein, A. (Ed.). Incontinence (s. 363-422). Plymouth, UK: Health Publication Ltd
21. Abrams, P., Cardozo, L., Fall, M., Griffiths, D., Rosier, P., Ulmsten, U. ve diğeri. (2003) The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology*, 61 (1), 37-49.
22. Braverman, A., Legos, J., Young, W., Luthin, G., Ruggieri, M. (1999) M2 receptors in genito-urinary smooth muscle pathology. *Life Sci*, 64 (6-7), 429-436.

23. Giglio, D., Ryberg, A.T., To, K., Delbro, D.S., Tobin, G. (2005) Altered muscarinic receptor subtype expression and functional responses in cyclophosphamide induced cystitis in rats. *Auton Neurosci*, 122 (1-2), 9-20.
24. Somogyi, G.T., de Groat, W.C. (1999) Function, signal transduction mechanisms and plasticity of presynaptic muscarinic receptors in the urinary bladder. *Life Sci*, 64 (6-7), 411-418.
25. Mok, M.H., Knight, G.E., Andrews, P.L., Hoyle, C.H., Burnstock, G. (2000) The effects of cyclophosphamide on neurotransmission in the urinary bladder of *Suncus murinus*, the house musk shrew. *J Auton Nerv Syst*, 80 (3), 130-136.
26. Palea, S., Artibani, W., Ostardo, E., Trist, D.G., Pietra, C. (1993) Evidence for purinergic neurotransmission in human urinary bladder affected by interstitial cystitis. *J Urol*, 150 (6), 2007-2012.
27. Bing, W., Chang, S., Hypolite, J.A., DiSanto, M.E., Zderic, S.A., Rolf, L. ve diğeri. (2003) Obstruction-induced changes in urinary bladder smooth muscle contractility: a role for Rho kinase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285 (5), F990-997.
28. Wibberley, A., Chen, Z., Hu, E., Hieble, J.P., Westfall, T.D. (2003) Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 138 (5), 757-766.
29. Masago, T., Watanabe, T., Saito, M., Kinoshita, Y., Sato, K., Miyagawa, I. (2009) Effect of the rho-kinase inhibitor hydroxyfasudil on bladder overactivity: an experimental rat model. *Int J Urol*, 16 (10), 842-847.
30. Shimizu, N., De Velasco, M.A., Umekawa, T., Uemura, H., Yoshikawa, K. (2013) Effects of the Rho kinase inhibitor, hydroxyfasudil, on bladder dysfunction and inflammation in rats with HCl-induced cystitis. *Int J Urol*, 20 (11), 1136-1143.
31. Weng, T.I., Chen, W.J., Liu, S.H. (2005) Bladder instillation of *Escherichia coli* lipopolysaccharide alters the muscle contractions in rat urinary bladder via a protein kinase C-related pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*, 208 (2), 163-169.
32. Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., Morgan, K.G. (1996) Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*, 76 (4), 967-1003.
33. Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M., Cohen, P. (1992) The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in

- avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem*, 210 (3), 1023-1035.
34. Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, 522 Pt 2, 177-185.
35. Cortijo, J., Foster, R.W., Small, R.C. (1987) Differentiation of calcium antagonists with respect to their effects in normal and skinned taenia caeci preparations. *J Pharm Pharmacol*, 39 (4), 283-289.
36. Sparrow, M.P., Pfitzer, G., Gagelmann, M., Ruegg, J.C. (1984) Effect of calmodulin, Ca²⁺, and cAMP protein kinase on skinned tracheal smooth muscle. *Am J Physiol*, 246 (3 Pt 1), C308-314.
37. Comte, J., Maisterrena, B., Gautheron, D.C. (1976) Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochim Biophys Acta*, 419 (2), 271-284.
38. Somlyo, A.V., Bond, M., Somlyo, A.P., Scarpa, A. (1985) Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 (15), 5231-5235.
39. Iizuka, K., Ikebe, M., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1994) Introduction of high molecular weight (IgG) proteins into receptor coupled, permeabilized smooth muscle. *Cell Calcium*, 16 (6), 431-445.
40. Kitazawa, T., Kobayashi, S., Horiuti, K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1989) Receptor-coupled, permeabilized smooth muscle. Role of the phosphatidylinositol cascade, G-proteins, and modulation of the contractile response to Ca²⁺. *J Biol Chem*, 264 (10), 5339-5342.
41. Kobayashi, S., Kitazawa, T., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1989) Cytosolic heparin inhibits muscarinic and alpha-adrenergic Ca²⁺ release in smooth muscle. Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. *J Biol Chem*, 264 (30), 17997-18004.
42. Nishimura, J., Kolber, M., van Breemen, C. (1988) Norepinephrine and GTP-gamma-S increase myofilament Ca²⁺ sensitivity in alpha-toxin permeabilized arterial smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 157 (2), 677-683.

43. Tugba Durlu-Kandilci, N., Brading, A.F. (2007) Intracellular calcium stores in beta-escin skinned rat and guinea-pig bladders. *Eur J Pharmacol*, 566 (1-3), 172-180.
44. Burdyga, T.V., Taggart, M.J., Crichton, C., Smith, G.L., Wray, S. (1998) The mechanism of Ca²⁺ release from the SR of permeabilised guinea-pig and rat ureteric smooth muscle. *Biochim Biophys Acta*, 1402 (1), 109-114.
45. Chiba, Y., Takeyama, H., Sakai, H., Misawa, M. (2001) Effects of Y-27632 on acetylcholine-induced contraction of intact and permeabilized intrapulmonary bronchial smooth muscles in rats. *Eur J Pharmacol*, 427 (1), 77-82.
46. Durlu-Kandilci, N.T., Brading, A.F. (2006) Involvement of Rho kinase and protein kinase C in carbachol-induced calcium sensitization in beta-escin skinned rat and guinea-pig bladders. *Br J Pharmacol*, 148 (3), 376-384.
47. Bjorling, D.E., Elkahwaji, J.E., Bushman, W., Janda, L.M., Boldon, K., Hopkins, W.J. ve diğ erleri. (2007) Acute acrolein-induced cystitis in mice. *BJU Int*, 99 (6), 1523-1529.
48. Batista, C.K., Brito, G.A., Souza, M.L., Leitao, B.T., Cunha, F.Q., Ribeiro, R.A. (2006) A model of hemorrhagic cystitis induced with acrolein in mice. *Braz J Med Biol Res*, 39 (11), 1475-1481.
49. Cox, P.J. (1979) Cyclophosphamide cystitis--identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol*, 28 (13), 2045-2049.
50. Golubeva, A.V., Zhdanov, A.V., Mallel, G., Dinan, T.G., Cryan, J.F. (2014) The mouse cyclophosphamide model of bladder pain syndrome: tissue characterization, immune profiling, and relationship to metabotropic glutamate receptors. *Physiol Rep*, 2 (3), e00260.
51. Joshi, S.K., Mikusa, J.P., Weaver, B., Honore, P. (2008) Morphine and ABT-594 (a nicotinic acetylcholine agonist) exert centrally mediated antinociception in the rat cyclophosphamide cystitis model of visceral pain. *J Pain*, 9 (2), 146-156.
52. Korkmaz, A., Topal, T., Oter, S. (2007) Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol Toxicol*, 23 (5), 303-312.

53. Yildiz, N., Alpay, H., Tugtepe, H., Ozdemir Kumral, Z.N., Akakin, D., Ilki, A. ve diğeri. (2015) Intravesical hyaluronic acid treatment improves bacterial cystitis and reduces cystitis-induced hypercontractility in rats. *Int J Urol*, 22 (6), 598-603.
54. Aronsson, P., Carlsson, T., Winder, M., Tobin, G. (2015) Cyclophosphamide-induced alterations of the micturition reflex in a novel in situ urinary bladder model in the anesthetized rat. *Neurourol Urodyn*, 34 (4), 375-380.
55. Birder, L.A., Barrick, S.R., Roppolo, J.R., Kanai, A.J., de Groat, W.C., Kiss, S. ve diğeri. (2003) Feline interstitial cystitis results in mechanical hypersensitivity and altered ATP release from bladder urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285 (3), F423-429.
56. Gomez-Viquez, L., Guerrero-Serna, G., Garcia, U., Guerrero-Hernandez, A. (2003) SERCA pump optimizes Ca²⁺ release by a mechanism independent of store filling in smooth muscle cells. *Biophys J*, 85 (1), 370-380.
57. Iino, M. (1990) Calcium release mechanisms in smooth muscle. *Jpn J Pharmacol*, 54 (4), 345-354.
58. Iino, M., Kobayashi, T., Endo, M. (1988) Use of ryanodine for functional removal of the calcium store in smooth muscle cells of the guinea-pig. *Biochem Biophys Res Commun*, 152 (1), 417-422.
59. Wray, S., Burdyga, T. (2010) Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev*, 90 (1), 113-178.
60. Endo, M., Yagi, S., Iino, M. (1982) Tension-pCa relation and sarcoplasmic reticulum responses in chemically skinned smooth muscle fibers. *Fed Proc*, 41 (7), 2245-2250.
61. Aley, P.K., Noh, H.J., Gao, X., Tica, A.A., Brailoiu, E., Churchill, G.C. (2010) A functional role for nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate in oxytocin-mediated contraction of uterine smooth muscle from rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 333 (3), 726-735.
62. Boittin, F.X., Dipp, M., Kinnear, N.P., Galione, A., Evans, A.M. (2003) Vasodilation by the calcium-mobilizing messenger cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem*, 278 (11), 9602-9608.

63. Boittin, F.X., Galione, A., Evans, A.M. (2002) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate mediates Ca²⁺ signals and contraction in arterial smooth muscle via a two-pool mechanism. *Circ Res*, 91 (12), 1168-1175.
64. Jude, J.A., Wylam, M.E., Walseth, T.F., Kannan, M.S. (2008) Calcium signaling in airway smooth muscle. *Proc Am Thorac Soc*, 5 (1), 15-22.
65. Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S., Galione, A. (2002) NAADP mobilizes Ca(2+) from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell*, 111 (5), 703-708.
66. Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H., Himpens, B., Casteels, R. (1994) Inhibition of inositol trisphosphate-induced calcium release by caffeine is prevented by ATP. *Biochem J*, 300 (Pt 1), 81-84.
67. Prestwich, S.A., Bolton, T.B. (1995) Inhibition of muscarinic receptor-induced inositol phospholipid hydrolysis by caffeine, beta-adrenoceptors and protein kinase C in intestinal smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 114 (3), 602-611.
68. Missiaen, L., De Smedt, H., Droogmans, G., Casteels, R. (1992) Ca²⁺ release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca²⁺ in permeabilized cells. *Nature*, 357 (6379), 599-602.
69. Sitsapesan, R., Williams, A.J. (1994) Regulation of the gating of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel by luminal Ca²⁺. *J Membr Biol*, 137 (3), 215-226.
70. Artamonov, M.V., Momotani, K., Stevenson, A., Trentham, D.R., Derewenda, U., Derewenda, Z.S. ve diğeri. (2013) Agonist-induced Ca²⁺ sensitization in smooth muscle: redundancy of Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs) and response kinetics, a caged compound study. *J Biol Chem*, 288 (47), 34030-34040.
71. Somlyo, A.V. (2002) New roads leading to Ca²⁺ sensitization. *Circ Res*, 91 (2), 83-84.
72. Giglio, D., Tobin, G. (2009) Muscarinic receptor subtypes in the lower urinary tract. *Pharmacology*, 83 (5), 259-269.
73. Takahashi, R., Nishimura, J., Hirano, K., Seki, N., Naito, S., Kanaide, H. (2004) Ca²⁺ sensitization in contraction of human bladder smooth muscle. *J Urol*, 172 (2), 748-752.

74. Shahab, N., Kajioka, S., Takahashi-Yanaga, F., Onimaru, M., Matsuda, M., Seki, N. ve diğeri. (2012) Obstruction enhances rho-kinase pathway and diminishes protein kinase C pathway in carbachol-induced calcium sensitization in contraction of alpha-toxin permeabilized guinea pig detrusor smooth muscle. *Neurol Urolog*, 31 (4), 593-599.

EK-1

TEZ ÇALIŞMASI İLE İLGİLİ BİLDİRİLER

Ulusal Bildiriler:

N.T. Durlu-Kandilci, **M. Denizalti**, T.E. Bozkurt, İ. Şahin-Erdemli. Permeabilize sıçan detrusor düz kasında karbakol ile indüklenen kasılma yanıtlarının siklofosfamid ile oluşturulan kronik sistit modelinde incelenmesi. Türk Farmakoloji Derneği 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 19-21 Ekim 2011, Eskişehir (sözlü sunum).

M. Denizalti, N.T. Durlu-Kandilci, T.E. Bozkurt, İ. Şahin-Erdemli. Siklofosfamid ile sistit oluşturulmuş permeabilize sıçan mesanesinde karbakol ile indüklenen kasılma yanıtlarında protein kinaz C ve Rho kinaz yollarının rolü. Türk Farmakoloji Derneği 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7 Kasım 2013, Antalya (poster sunumu).

Uluslararası Bildiriler:

Denizalti, M., Durlu-Kandilci N.T., Bozkurt, T.E., Sahin-Erdemli, I. Chronic cystitis enhances carbachol-induced calcium release in permeabilized rat detrusor smooth muscle. EPHAR 2012, 17-20 July 2012, Granada, Spain (poster sunumu).

Denizalti, M., Durlu-Kandilci N.T., Bozkurt, T.E., Sahin-Erdemli, I. Protein kinase C is involved in carbachol-induced calcium release in permeabilized rat detrusor having interstitial cystitis. Winter Meeting 2012 (British Pharmacological Society), 18-20 December, 2012, London, UK (poster sunumu).

EK-2

TEZ ÇALIŞMASI İLE İLGİLİ ETİK KURUL İZİNLERİ



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/

56

12 Temmuz 2011

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 05.07.2011 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2011/4
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2011/36
KARAR NUMARASI	: 2011/36-7
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Yrd. Doç. Dr. N. Tuğba Kandilci
HAYVAN DENEYLERİNDEN	Prof. Dr. İnci Erdemli, Öğrt. Gör. Dr. T. Emrah
SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Bozkurt, Uzm. Ecz. Merve Denizaltı
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 96 adet Sprague Dawley sıçan
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ	: 12 ay

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. N. Tuğba Kandilci'nin yürütücüsü olduğu 2011/36 dosya numaralı ve "*Siklofosfamid ile Oluşturulmuş Sıçan İnterstisyel Sistit Modelinde Mesane Detrusor Düz Kasının Kasılma Mekanizmasındaki Değişikliklerin İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Etik Kurul Başkanı



Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/ 30

02 Nisan 2012

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 30.03.2012 (CUMA)
TOPLANTI SAYISI	: 2012/3
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2012/15
KARAR NUMARASI	: 2012/15-2
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	Yrd. Doç. Dr. N. Tuğba Kandilci
HAYVAN DENEYLERİNDEN	
SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Prof.Dr. İnci Erdemli, Dr.T. Emrah Bozkurt, Uzm.Ecz. Merve Denizaltı
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: -
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	
SAYISI	: 72 adet Dişi Sprague-Dawley sıçan
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ	: 12 ay

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. N. Tuğba Kandilci'nin araştırma yürütücüsü olduğu 2012/15 kayıt numaralı "*Siklofosamid ile Sistit Oluşturulan Sıçanların Detrusor Düz Kasında Kasılma Yanıtlarının Mekanizmasının İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Etik Kurul Başkanı

