

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇAN DENEYSEL ÜRETRAL TRAVMA MODELİNDE
LOSARTAN, RAPAMİSİN, DOKSİSİKLİN VE BOTULİNUM
TOKSİN A'NIN ETKİLERİ**

Dr. MÜCAHİT BALTİK

**ÜROLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. OSMAN ERGÜN**

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: TTU-2020-8219).

ISPARTA - 2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, bu çalışmanın oluşturulmasının her alanında emek veren, sadece eğitim alanında değil özel hayatımda da benden desteğini esirgemeyen ve bugüne kadar olduğu gibi bunda sonra da ihtiyacım olduğunda var olduğunu bildiğim, hekimliğin ancak sevilerek yapılabileceğini belirten ve kendisini örnek aldığım, asistanı olmaktan gurur duyduğum hocam Doç.Dr. Osman ERGÜN'e teşekkür ederim.

Eğitim sürem boyunca her alanda bana büyük katkıları olan hocalarım Prof. Dr. Alim KOŞAR, Prof. Dr. A. Sedat SOYUPEK, Prof. Dr. Taylan OKSAY, Prof.Dr. Alper ÖZORAK, Prof. Dr. Tekin Ahmet SEREL, Doç. Dr. Sefa Alperen ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Bu çalışmanın her aşamasında benden desteklerini esirgemeyen hocalarım; Pınar ASLAN KOŞAR, Kanat GÜLLE, M. Yusuf TEPEBAŞI ve İbrahim ONARAN'a teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Beş yıl boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım başta servis sorumlu hemşiremiz Selma SÖNMEZ olmak üzere bütün hemşire ve personel çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

TUS sürecinden bu yana her zaman yanımda olan, büyük bir sabırla zorlukları benimle paylaşan eşim, hayat arkadaşım Şebnem ŞAHİN BALTİK'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLERİN DİZİNİ.....	vi
RESİMLERİN DİZİNİ.....	vii
TABLoların DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Üretra Anatomisi	2
2.2. Rat Üretrası.....	4
2.3. Üretra Embriyolojisi	4
2.4. Üretra Darlığında Tanım ve Terimler	4
2.5. Üretra darlığı Epidemiyolojisi	6
2.6. Üretra Darlığı Etyolojisi.....	6
2.7. Üretra Darlığında Klinik Değerlendirme.....	7
2.8. Üretra Darlığında Tedavi.....	8
2.8.1. Üretra Dilatasyonu.....	8
2.8.2. Üretral Stent.....	9
2.8.3. İnternal Üretrotomi.....	10
2.8.4. Üretroplasti.....	11
2.9. İlaçların Genel Özellikler.....	12
2.9.1. Doksisisiklin.....	12
2.9.2. Losartan	13
2.9.3. Rapamisin.....	13

2.9.4. Botulinum Toksin A.....	14
3. MATERYAL VE METOD.....	16
3.1. Hayvan ve Grupların Seçimi.....	16
3.2. Cerrahi Prosedür ve Deneyin Yapılması.....	16
3.3. Histopatolojik Çalışmalar.....	18
3.3.1. Materyal.....	18
3.3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	18
3.3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
3.3.2. Metod.....	19
3.3.2.1. Doku Örneklerinde Histokimyasal Çalışmalar.....	19
3.3.2.1.1. Fiksasyon ve Yıkama.....	19
3.3.2.1.2. Doku Takibi	19
3.3.2.1.3. Kesit Alma.....	20
3.3.2.1.4. H-E Boyama.....	20
3.3.2.1.5. Masson Trikrom Boyama.....	20
3.3.2.1.5.1. Bouin's Solüsyonu.....	21
3.3.2.1.5.2. %1 Asetik Asit Solüsyonu	21
3.3.2.1.5.3. Weigert's Demirli Hematoksilen Boyama Solüsyonu.....	22
3.3.2.1.5.3.1. Solüsyon A	22
3.3.2.1.5.3.2. Solüsyon B.....	22
3.3.2.1.5.4. Ponceau S/Asit Fuksin Solüsyonu.....	22
3.3.2.1.5.5. Orange G Solüsyonu.....	22
3.3.2.1.5.6. Light Green SF Solüsyonu	23
3.3.2.1.6. Martius Scarlet Blue Boyama.....	23
3.3.2.1.7. Histopatolojik Değerlendirme	24

3.4. İmmünohistokimyasal Çalışmalar.....	24
3.4.1. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	24
3.4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	26
3.5. Genetik Çalışmalar.....	26
3.5.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	26
3.5.1.1. RNA İzolasyonu.....	26
3.5.1.2. cDNA Sentezi.....	27
3.5.2. Primer tasarımı ve hazırlanması.....	28
3.5.3. Ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi.....	29
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	30
4. BULGULAR.....	32
4.1 Ölçümsel Bulgular.....	32
4.2. Histolojik Bulgular.....	34
4.3. İmmünohistokimyasal bulgular.....	57
4.4. Genetik Bulgular	61
5. TARTIŞMA.....	69
6. SONUÇ.....	81
ÖZET	82
KAYNAKÇA.....	85

KISALTMALAR

Ang-2: Anjiotensin-2

BT: Bilgisayarlı Tomografi

Cm: Santimetre

CYP: Sitokrom P

DNA: Deoksiribonükleik asit

ED: Erektile disfonksiyon

FGF-9: Fibroblast Growth Faktor-9

KBY: Kronik böbrek yetmezliği

KC: Karaciğer

İL-13: İnterlökin-13

İÜ: İnternal üretrotomi

İYE: İdrar yolu enfeksiyonu

Mm: Milimetre

MRG: Magnetik Rezonans Görüntüleme

mTOR: Mammalian target of rapamycin

RNA: Ribonükleik asit

sGC: Soluble guanylate cyclase

TH1: T helper 1

TGF-B: Transforming Growth Faktor-Beta

TUR: Transüretral rezeksiyon

USG: Ultrasonografi

SS: Standart sapma

n: Frekans (kişi sayısı)

r: Etki büyüklüğü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Üretranın bölümleri	3
Şekil 2. Fibrozis patogenezi	5
Şekil 3. Bulböz üretra darlığının radyolojik ve endoskopik görüntüsü	8
Şekil 4. Sıçanların 0. ve 14. gün ortalama ağırlıklarının kullanılan ilaç türüne göre dağılımı	33
Şekil 5. Submukozal hemoraji düzeylerinin gruplara göre dağılımı.....	36
Şekil 6. Epitelyal dejenerasyon düzeylerinin gruplara göre dağılımı	36
Şekil 7. Vasküler konjesyon düzeylerinin gruplara göre dağılım.....	37
Şekil 8. İnflamasyon düzeylerinin gruplara göre dağılım.....	38
Şekil 9. Fibrozis düzeylerinin gruplara göre dağılımı.....	38
Şekil 10. İL-1 β düzeylerinin gruplara göre dağılımı.....	58
Şekil 11. Ortalama elastin değerinin gruplara göre dağılımı	61
Şekil 12. Ortalama TGF- β değerinin gruplara göre dağılımı	62
Şekil 13. Ortalama PDGF- α değerinin gruplara göre dağılımı	63
Şekil 14. Ortalama α -ASMA değerinin gruplara göre dağılımı	63
Şekil 15. Ortalama PDGF- β değerinin gruplara göre dağılımı	64
Şekil 16. Ortalama COL-1 değerinin gruplara göre dağılımı	65
Şekil 17. Ortalama COL-3 değerinin gruplara göre dağılımı	65
Şekil 18. Korelasyon analiz grafiği	69

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Distalde normal üretral çap ve proksimalde üretra darlığı	3
Resim 2. Kontrol grubu normal üretra dokusu	17
Resim 3. Darlık grubu travmatik üretra dokusu	17
Resim 4. Rapamisin grubu, belirgin iyileşme gösteren üretra dokusu	17
Resim 5. Doksisiklin grubu, belirgin iyileşme gösteren üretra dokusu	18
Resim 6. Kontrol grubu üretra dokusu. Normal histolojik görünümde. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	39
Resim 7. Kontrol grubu üretra dokusu. Normal histolojik görünümde. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	39
Resim 8. Darlık grubu üretra dokusu. Yaygın submukozal hemoraji alanlar (ok), vasküler konjesyon, fibrozis (yıldız) ve epitelde dejenerasyon bulguları. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	40
Resim 9. Darlık grubu üretra dokusu. Yaygın submukozal hemoraji alanlar (ok), vasküler konjesyon(artı), fibrozis (yıldız) ve epitelde dejenerasyon(üçgen) bulguları. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	40
Resim 10. Rapamisin grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji (ok) ve diğer histopatolojik bulgular darlık grubuna kıyasla düşük düzeyde. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	41
Resim 11. Rapamisin grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji (ok), fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgularda darlık grubuna kıyasla belirgin azalma. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	41
Resim 12. Losartan grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji(ok), fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgularda darlık grubuna kıyasla belirgin azalma. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	42
Resim 13. Losartan grubu üretra dokusu. Fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgularda darlık grubuna kıyasla belirgin azalma. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	42

Resim 14. Doksisisiklin grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji(ok), fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgulara darlık grubuna kıyasla düşük oranda azalma. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	43
Resim 15. Doksisisiklin grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji(ok) ve diğer histopatolojik bulgulara darlık grubuna kıyasla düşük oranda azalma. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	43
Resim 16. Botox grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji(ok), fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgulara darlık grubuna kıyasla düşük oranda azalma. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	44
Resim 17. Botox grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji(ok), fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgulara darlık grubuna kıyasla düşük oranda azalma. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	44
Resim 18. Kontrol grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	45
Resim 19. Kontrol grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	45
Resim 20. Darlık grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	46
Resim 21. Darlık grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	46
Resim 22. Rapamisin grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	47
Resim 23. Rapamisin grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	47
Resim 24. Losartan grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	48
Resim 25. Losartan grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	48

Resim 26. Doksisiklin grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	49
Resim 27. Doksisiklin grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	49
Resim 28. Botoks grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	50
Resim 29. Botoks grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	50
Resim 30. Sham Kontrol grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	51
Resim 31. Sham Kontrol grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	51
Resim 32. Darlık grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	52
Resim 33. Darlık grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	52
Resim 34. Rapamisin grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	53
Resim 35. Rapamisin grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	53
Resim 36. Losartan grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	54
Resim 37. Losartan grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	54
Resim 38. Doksisiklin grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm	55
Resim 39. Doksisiklin grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm	55

Resim 40. Botoks grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μm	56
Resim 41. Botoks grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μm	56
Resim 42. Sham kontrol grubu üretra dokusu negatif boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μm	58
Resim 43. Darlık grubu üretra dokusu orta düzeyde boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μm)	59
Resim 44. Rapamisin grubu üretra dokusu zayıf düzeyde boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μm)	59
Resim 45. Losartan grubu üretra dokusu zayıf düzeyde boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μm)	60
Resim 46. Doksisiklin grubu üretra dokusu zayıf düzeyde boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μm)	60
Resim 47. Botoks grubu üretra dokusu zayıf düzeyde boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μm)	61

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Dehidratasyon aşamasında kullanılan alkol dereceleri ve uygulama süreleri	19
Tablo 2. H-E boyama protokolü	20
Tablo 3. Masson Trikrom boyama protokolü	21
Tablo 4. Martius Scarlet Blue boyama protokolü	23
Tablo 5. İmmunohistokimya protokolü	25
Tablo 6. 20 µl revers transkriptaz reaksiyon karışımı	27
Tablo 7. Revers transkriptaz termal döngü protokolü	28
Tablo 8. Genler ve genlere spesifik primer dizilimleri	29
Tablo 9. PCR reaksiyon karışımı	30
Tablo 10. Gerçek zamanlı PCR döngüsü	30
Tablo 11. Gruplara göre ratların 0 ve 14. gündeki ağırlık değişimleri	32
Tablo 12. Ratların 0 ve 14. gün ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması	34
Tablo 13. Histolojik bilgilerin, gruplara göre karşılaştırması	35
Tablo 14. İL-1β derecelerinin gruplara göre karşılaştırması	57
Tablo 15. Üretra dokusunun PCR analiz sonuçlarının kıyaslanması	61
Tablo 16. Genetik değerlerin posthoc analizi	66
Tablo 17. Korelasyon analizi	67
Tablo 18. Korelasyon analiz sonuçları	68

1-GİRİŞ

Üretra darlığı; temelinde fibrozisin yer aldığı ve üretra çapında daralma sonucu alt üriner sistem semptomlarının ortaya çıktığı önemli bir sağlık sorunudur. İdiopatik, iyatrojenik, travma ve enfeksiyon temel nedenlerini oluşturmaktadır (1). İnsidental olarak saptanabileceği gibi, hastalar akut üriner retansiyon, kronik böbrek yetmezliği, tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları gibi farklı klinik tablolarla başvurabilirler. Hastadan tanı amacıyla detaylı bir anamnez alınmalıdır. Üroflowmetri ve özellikle retrograd üretrografi, üretra darlığı tanısının konulmasında kullanılan en yararlı araçlardır.

Üretra darlığı tedavisinde; üretra dilatasyonu, üretral stentler, internal üretrotomi ve üretroplasti gibi cerrahi yöntemler kullanılmaktadır. Üretroplastinin komorbiditesinin yüksek olması ve bu cerrahiye yapacak deneyimli merkez sayısının azlığı, diğer tedavi modalitelerinin ise küratif olmaması nedeniyle üretra darlığı tedavisinde standart bir yaklaşıma henüz ulaşamamıştır. Patogenezinde fibrozisin rolü anlaşıldıkça fibrozisi azaltmaya yönelik çalışmalar sayısı artmaya başlamıştır. Literatür incelendiğinde, mitomisin c, paklitaksel, kollajenaz klostidium histoliticum, tadalafil, docetaxel, plazmadan zengin platelet ve kaptopril jel gibi ajanların çalışıldığını görmekteyiz (2-12). Bu çalışmaların çoğu hayvan çalışması olup henüz en uygun ajan veya ajanların hangileri olduğuna dair kanıtlar yeterli değildir. Dolayısıyla bu ajanlarla ilgili daha fazla çalışmanın yapılması veya yeni ilaçların bulunmasına duyulan bir ihtiyaç söz konusudur. Bu nedenle biz de çalışmamızda, başka doku ve organlarda antifibrotik etkinliği kanıtlanmış ancak üretra darlığında bu etkinliğin henüz değerlendirilmediği losartan ve doksisisiklin ile etkinliğin bir veya iki çalışmayla sınırlı kaldığı rapamisin ve botulinum toksin A'yı değerlendirmeyi hedefledik. Amacımız üretral travma modeli oluşturduğumuz ratlarda, verdiğimiz tedavilerin üretral fibrozisi azalttığını histopatolojik, immünhistokimyasal ve genetik aracılığıyla ortaya koymaktır. Daha fazla veriye ihtiyacımız olan bu alanda yapacağımız çalışmanın literatüre ve ileride yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağını düşündüğümüz için bu çalışmayı planladık.

2-GENEL BİLGİLER

2.1. Üretra Anatomisi

Erkek üretrası;18-20 santimetre (cm) uzunluğuna sahip, genişliği ise yer yer farklılık gösteren bir kanaldır. Mesane boynundan başlayıp, eksternal meatusta sonlanır. Erkek üretrası hem üriner hem de genital sistemin işleyişinde önemli rollere sahiptir. Anterior üretra; eksternal meatus, fossa navikularis, penil üretra ve bulber üretrayı içerirken, posterior üretrada; membranöz üretra, prostatik üretra ve mesane boynu yer alır.

Prostatik üretra; yaklaşık 3 cm uzunluğunda olan prostatik üretra, üretranın en geniş bölümüdür. Transizyonel epitele sahip olan bu bölüm, prostatın anterior yüzüne daha yakın seyredir. Prostatik üretranın posterior duvarında yer alan kabartıya krista üretralis denir. Krista üretralisin kabarıp belirginleştiği kısmı verumontanum olarak adlandırılır. Krista üretralisin yanlarında bez yapılarının drene olduğu prostatik sinüsler mevcuttur. Verumontanumun apeksinde müller kanal artığı olan utrikulus prostatikus bulunur. Ejekülatuar kanallar utrikulus prostatikusun yanlarına açılırlar. Prostatik üretra anteriora doğru yaklaşık 35 C⁰ açılma yapar. Bu açılma prostatik üretrayı proksimal ve distal olarak ikiye ayırır. Proksimal kısım internal sfinkterin yer aldığı alandır. Prostatik üretranın distal kısmı ise glandüler bez yapıları sayesinde hipertrofide büyük bir rol oynar.

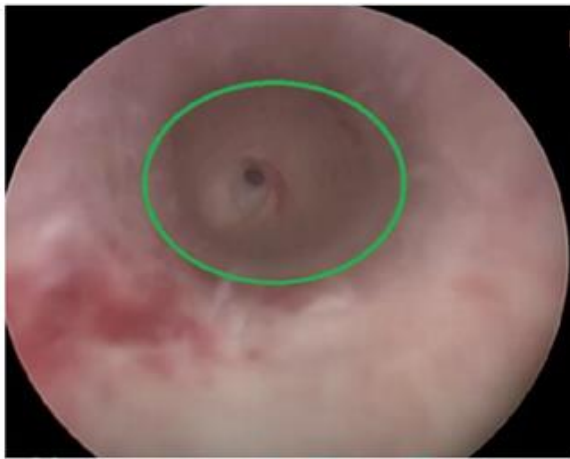
Membranöz üretra; prostat apeksinden başlayıp perineal membranda sonlanır ve üretranın en dar bölümüdür. Uzunluğu değişmekle beraber 1,2-2,5 cm arasındadır. Eksternal üretral sfinkter membranöz üretrayı sarar. Prostat hipertrofisine bağlı olarak posterior ve lateral lifler atrofiye uğrarken, anterior lifler hipertrofidan etkilenmezler. Prostat apeksindeki sirküler lifler distalde yelpaze benzeri açılarak omega görünümünü alırlar. Sfinkter kasıldığında üretra posteriora doğru çekilir. Bu durum, çizgili sfinkterin posteriora perineal gövdeye doğru uzantılar vermesinden kaynaklanır. Membranöz üretra, çevresindeki bağ dokuları sayesinde posteriora puboprostatik ligamanlara, anteriora ise suspensuar ligamana yapışarak stabil duruma gelir.

Anterior üretra; üretranın en uzun segmenti olan anterior üretrayı, korpus spongiosum sarar. Lümenin dorsalindeki spongiozumun kalınlığı 3-4 milimetre(mm) iken bu kalınlık bulböz üretra civarında 10-15 mm'ye yaklaşır. Bulböz ve penil üretra olarak ikiye ayrılır. Bulböz üretra; anterior üretranın proksimal ve daha geniş olan segmentidir. Bulbospongios kas bulböz üretrayı sarar. Cowper bezlerinin açıldığı üretra segmentidir. Bulböz üretranın başlangıç seviyesi cerrahi açıdan önemli bir detayı içerir. Saat 5 ve 7 hizasından bulböz arter, 11 ve 1

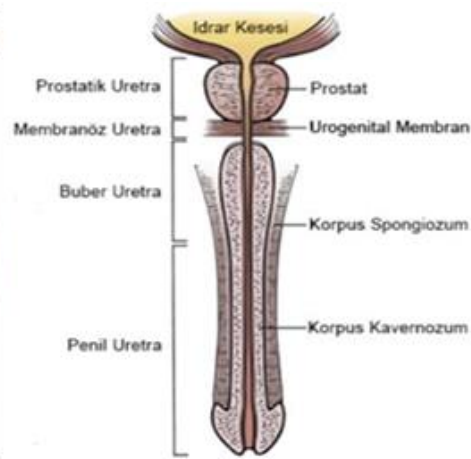
hizasından N. Erigentis geçer. Arter ve sinire zarar vermemek için bu seviyede özellikle derin kesiler yapmaktan kaçınmak gerekir. Penil üretra; üretranın en distal ve hareketli olan segmentidir. Üretranın en dar yeri olan eksternal üretral meatusta sonlanır. Fossa navikularis, eksternal meatusun hemen proksimalinde yer alan ve üretranın en geniş ikinci bölümüdür.

Bülboüretral arter çifti, internal pudental arterin dallarından biridir ve üretranın arteriyel beslenmesinden sorumludur. Venöz drenaj; emisser venler aracılığıyla penisin dorsal sirkumfleks dallarına gider ve sonuçta internal pudental vene ulaşarak sağlanır. Üretral mukozayı, perineal sinirin dalı olan üretrobulböz sinir innerve eder. Çizgili üretral sfinkter saat 3 ve hizasından bulbokavernöz sinirden dallar alır. Bu sinirler pudental sinirin dalı olduklarından, pudental sinir hem sfinkterin motor innervasyonunu hem de üretranın duyu innervasyonunu sağlar. Anterior üretrada lenfatik drenaj inguinal lenf nodları aracılığıyla eksternal iliak lenf nodlarına drene olur. Posterior üretrada ise lenfatikler eksternal iliak, internal iliak, obturator ve presakral lenf nodlarına drene olurlar.

Üretra cerrahisi yaparken penisin sinir dokusuna zarar vermektan kaçınılmalıdır. Penisin motor innervasyonu sempatik (T10-L2) ve parasempatik (S2-S4) liflerinin birleştiği pelvik pleksus aracılığı ile sağlanır. N. Erigentes, pelvik pleksusun verdiği kaudal dallarla oluşur. Pudental sinir ise (S2-S4) sinir liflerinden aldığı dallarla penisin somatik duyusundan sorumludur. Pudental sinir alcock kanalını terkettikten sonra hem levatör ani kasını hem de iskiokavernöz ve bulbokavernöz kaslarını innerve eder. Pelvis ve perinenin sensöryel duyusu da pudental sinir tarafından sağlanır (13-15).



Resim 1: Distalde normal üretral çap ve distalde üretra darlığı



Şekil 1: Üretranın bölümleri

2.2. Rat Üretrası

Erkek rat üretrası; proksimal üretra, geçiş üretrası, üretral divertikül ve penil üretra olmak üzere dört bölümden oluşmaktadır (16). Lümen çapı segmentine bağlı olarak farklılık gösterir. Pelvik üretrada lümen yaklaşık 0,7 mm'dir. Elonge seminal kollikül, distal üretrada iki katlantı ile birleşerek iki adet divertikül oluşumuna neden olur. Üretra duvarının tamamı, her bölümünde aynı olmamakla beraber subepitelyal kavernöz doku içerir. Mukozal kas dokusu, kollikülün kraniali ve bulböz üretrada olmak üzere sadece iki kısımda yer alır. Üretral kas mesane boynundan başlar ve bulböz üretrada sonlanır. Bulboüretral kas çifti, penis kökünün kaudal kısmına kadar uzanır. İskiokavernöz kaslar ise işiadik arktan başlar, penis krusunu çevreler ve dorsolateralde sonlanır (17). Proksimal üretrada bulunan düz kas, çizgili kas tabakası tarafından sarılıdır. Üretral tabaka, endodermal ürogenital sinüsün bir uzantısı olarak distal penise kadar uzanır. Üretral kıvrımların ventralde füzyonu sonucu gelişmektedir. Üretra epitelinin tamamı ürogenital sinüs kökenlidir (18).

2.3. Üretra Embriyolojisi

Anterior üretra; Embriyonel dönemin 5. haftasında kloakal membran çevresinde biriken mezenkim hücreleri kloakal kabartıyı(katlantı) oluşturur. Kloakal membranın anteriorundaki kabartılar ürogenital tüberkül adını alır. 6. haftada üretral tüberkül uzayarak ventral kısmında üretral oluğu meydana getirir. Üretral katlantıların füzyonu sonucu anterior üretral kanalizasyonun oluştuğu düşünülmektedir. Üretral yarığın distal kısmı glansın üzerine uzanarak sonlanır.

Posterior üretra; Kloakanın bölünmesi sonrası mezonefrik kanalla birleşen ürogenital sinüs üç bölüme ayrılarak farklılaşır. Ventral, pelvik ve fallik bölümlerine ayrılan ürogenital sinüste fallik bölümden posterior üretra meydana gelir (19, 20).

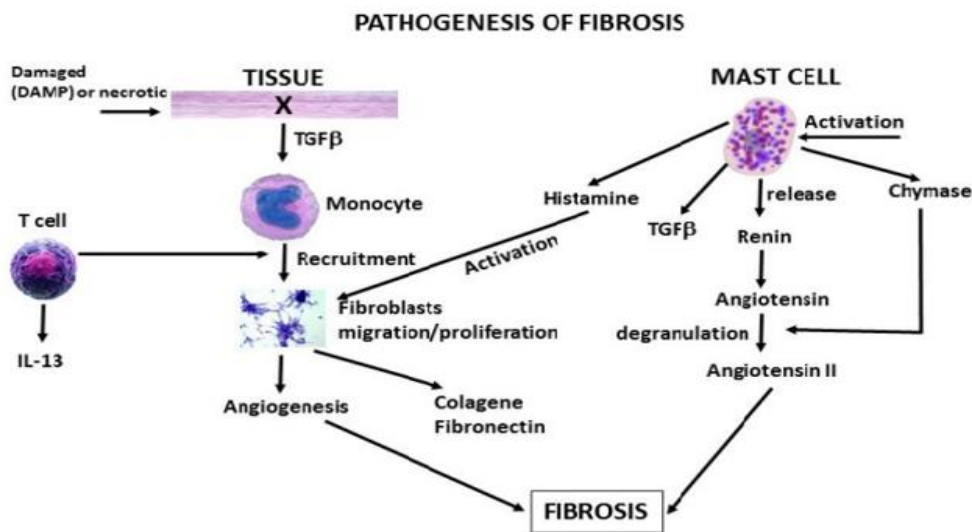
2.4. Üretra Darlığında Tanım ve Terimler

Üretra darlığı; çeşitli nedenlerin üretra epitelinde hasara yol açması sonucu, epitelin veya korpus spongiosumun fibrozisi ile sonuçlanan bir hastalıktır. Anterior ve posterior üretradaki daralma birbirlerinden farklı terimler olarak tanımlanmaktadır. Üretra darlığı terimi, sadece anterior üretradaki daralmaları kapsar. Anterior üretrayı saran korpus spongiosum dokusunun fibrozisi sonucu oluşan skar, anterior üretradaki darlığın temel nedenini oluşturmaktadır. Skarın kontraksiyonu sonucu üretrada daralma meydana gelir. Oluşan bu

daralmanın derecesine bağlı olarak farklı klinik tablolar ortaya çıkar. Posterior üretrada meydana gelen daralmaların etyolojisini travma ve iatrojenik nedenler oluşturur. Posterior üretradaki daralmalar için ise stenoz veya kontraktür terimleri kullanılmaktadır (21).

Kadın hastalardaki üretral daralmaları terim olarak açıklayabilen evrensel bir tanımlama yoktur. Bazı yazarlar üretra çapının daralması şeklinde tanımlamışlardır (22). Üretra çapının azalmasındaki kriter değişkendir ve <10 ile <20 mm arasında kabul edilen çalışmalar vardır (23, 24).

Fibrozis: doku yaralanması sonrası başlayan onarım sürecinde normal parankimal dokunun yerini bağ dokusunun alması olarak tanımlanır. Özellikle tip-1 ve tip-3 olmak üzere artmış kollajen sentezi, diğer hücre dışı matris proteinlerinde birikim, inflamatuvar sitokinler ve immünolojik parametrelerde düzensiz çoğalma ile karakterize bir hastalıktır (şekil 2)(25). İyileşen dokudaki proinflamatuvar sitokinlerin kontrolsüz çoğalması bu patojenik dokunun oluşumuna neden olur. Doku hasarı sonrası T helper 1'in (TH1) neden olduğu hızlı bir inflamatuvar yanıt oluşur. Ardından interlökin-13 (İL-13) ve transforming growth factor (TGF- β) aracılığıyla TH2 hücreleri dokuya fibroblast göçünü arttırarak fibrozis oluşumunu tetikler (25). TGF- β , hem fizyolojik hem de patolojik doku yanıtlarında rol alan bir büyüme faktörüdür ve fibrotik yanıtların ana düzenleyicisi olarak kabul edilir. Ancak fibrozis oluşumundaki tek düzenleyici faktör değildir. Fibroblast büyüme faktörü-9 (FGF-9), janus kinaz-sinyal transdüseri (JAK-STAT), soluble guanylate cyclase(sGC) ve ephrin (eph) sinyal yolları TGF- β aktivasyonlarını inhibe ederek, 5-hidroksitriptamin ve WNT sinyal kaskadı ise bu yolağı aktive ederek fibrozis oluşumunda mediatör olarak rol alırlar (26).



Şekil 2. Fibrozis patogenezi

2.5. Üretra darlığı Epidemiyolojisi

Üretra darlığının gerçek insidansını ortaya koyabilecek bir ölçüm, dolayısıyla yayınlanmış bir çalışma yoktur. Santucci ve ark. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) veri tabanlarını inceleyerek elde ettikleri sonuçlarda yaşlı nüfusunda insidansın yaklaşık olarak %0,6 civarında olduğunu saptamışlardır. Ancak bu sonucun gerçeği yansıtmayabileceği yorumunda bulunmuşlardır (22). Anger ve ark. sağlık yararlanıcıları arasındaki üretral striktür verilerini incelemiş ve insidansın 1992'de %1.4 iken 2001'de %0,9 olduğunu ve azaldığını bulmuşlardır. Bu çalışmada insidansın yaşla beraber arttığını 65-69 yaş aralığında %0,6 iken 85 yaş üstünde %1,9 olduğunu bulmuşlardır. Bu veriler beyaz ırka ait olup, afroamerikalılarda insidans daha yüksek bulunmuştur (23). Kadınlardaki insidansın ise büyük çoğunluğunu 64 yaş üstü hastalar oluşturmakta ve %0,08-5,4 arasındadır (24).

2.6. Üretra Darlığı Etyolojisi

Anterior üretra darlığının etyolojisini oluşturan nedenler genel olarak; idiopatik, iatrojenik, inflamatuvar ve travmatik olarak dört gruba ayrılır. Yapılan bir meta analizde idiopatik(%34), iatrojenik(%32), inflamatuvar(%20) ve travma(%14) oranlarında darlığa yol açan sebeplerdir (27).

Gelişmiş ülkelerde idiopatik ve iatrojenik nedenler ilk sırayı alırken, gelişmekte olan ülkelerde travma en sık darlık nedenini oluşturur. Gelişmemiş ülkelerde ise cinsel yolla bulaşan üretrit %41'lik oranla çok ciddi bir risk faktörüdür. Üretra darlığının etyolojisi ve darlığın lokasyonu coğrafi farklılıklara bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (28). Örneğin ABD ve İtalya'da darlığın en sık nedenleri idiopatik(%41.3) ve iatrojenik(%35) iken, Hindistan'da en sık nedenler; travma(%36.1), idiopatik(%23.6) ve liken sklerozis(%21.5) olarak gözlenmektedir.

İatrojenik üretra darlıkları, çeşitli trans-üretral cerrahiler sonrası ortaya çıkabilir. Yapılan işlemin farklılığına göre üretranın bölümleri farklı risk oranlarına sahiptir. Posterior üretra darlıkları en çok radikal prostatektomi, pelvik travma ve brakiterapi sonrası ortaya çıkar. Transüretral rezeksiyon (TUR), üretral kataterizasyon ve perineal travma sonrası bulböz üretrada darlık oluşma riski ön plandadır. Hipospadias, üretral kataterizasyon, liken sklerozis ve tümör varlığında ise penil üretra darlığına daha sık rastlanır (29).

Transüretral prostat cerrahisi sonrası üretral darlık olasılığı %4.5-%13 arasındadır(30). Etiyolojide; yetersiz jel kullanımı, penoskrotal bileşkede sürtünme, rezektoskopun giriş çıkışları sonucu mukozanın hasarlanması ve monopolar cihazının yalıtımının yetersiz olması suçlanmaktadır. Prostat inflamasyonu, operasyon süresinin uzun olması, intraoperatif mukoza rüptürü, post-operatif enfeksiyon, yüksek kalibreli kılıf kullanımı üretral darlık için tanımlanmış diğer risk faktörleridir (31).

Kadınlardaki nedenlerin %48.5'i idiopatik iken %24.1'i iatrojeniktir. İatrojenik nedenler arasında; önceki üretral dilatasyonlar, sondanın travmatik takılması, üretral cerrahiler ve travma yer almaktadır. Sıklıkla orta ve orta-distal üretrada darlık gelişir. Kadınlarda panüretral darlık oranı %4 civarındadır (31).

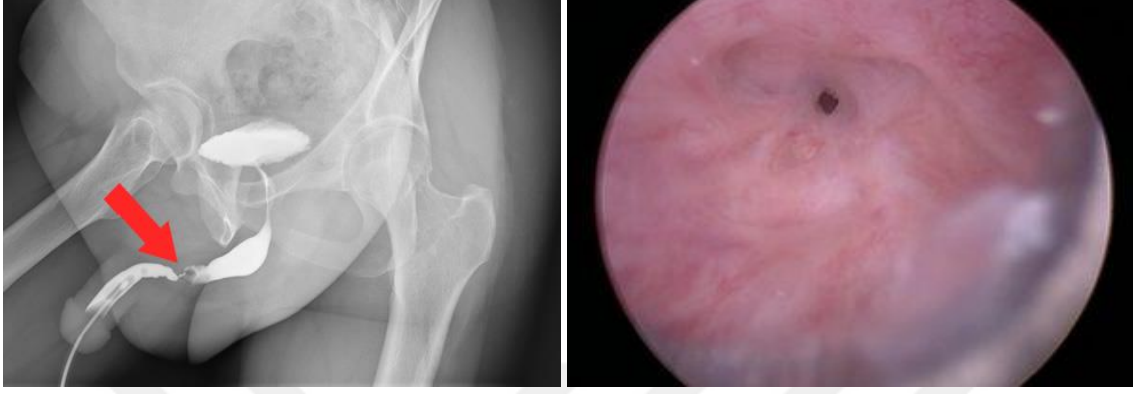
2.7. Üretra Darlığında Klinik Değerlendirme

Üretra darlığı; hiçbir semptom göstermeyebileceği gibi, akut üriner retansiyona kadar değişen geniş bir yelpazede farklı ve şiddetli semptomlar gösterebilir. Hastalar genellikle alt üriner sistem semptomları ile hastaneye başvururlar. Sık idrara çıkma, zor idrar yapma, idrar ve ejakülasyon akış hızında azalma, rezidü hissi, post-miksiyonel damlama veya tam tıkanma durumunda üriner retansiyon hastaların çoğunlukla başvuru sebebinin oluşturur (32). Uzamış darlıklarda; mesane taşı, kronik böbrek yetmezliği (KBY), üretral abse, tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu (İYE), prostatit ve epididim-orşit gibi enfeksiyon bulguları da hasta kliniğini oluşturabilir. Hastanın semptomları sorgulanırken detaylı anamnez alınmalıdır. Darlık öyküsü, genital travma varlığı, geçirilmiş ürogenital cerrahi öyküsü sorgulanmalıdır. Fizik muayenede meatus incelenmeli, özellikle liken sklerozis ve hipospadias olup olmadığı değerlendirilmelidir.

Darlık şüphesi olan hastanın ilk değerlendirmesinde; idrar akım hızı ve akım trasesini görmek için üroflowmetri gereklidir. Mesane patolojileri ve rezidü idrar miktarı ölçümü için ultrasonografi ile görüntüleme yapılmalıdır. Üroflowmetride akım hızı azalmıştır. Bir plato oluşturarak yavaş ve uzun akım görünümü üretra darlığını akla getirmelidir.

İlk değerlendirmede ön tanı olarak üretra darlığı düşünülüyorsa en doğru yaklaşım retrograd üretrografi'dir. Özellikle anterior üretra darlıklarının tanısında retrograd üretrografi altın standart tanı yöntemidir. Mea temizlendikten sonra fossa navikülerise foley sonda konularak 2 cc şişirilir. Kontrast madde verilerek eş zamanlı supin ve oblik pozisyonda görüntülemeler alınır. Posterior üretra ve mesane boynu darlıklarında retrograd üretrografi tanıda yetersiz kalabilir. Bu durumda işeme sistoüretrografisi ile retrograd üretrografinin

kombine kullanımı gereklidir. Bilgisayarlı tomografi (BT) üretra darlığı tanısında tercih edilen bir yöntem değildir. Retrograd salin verildikten sonra çekilen manyetik rezonans görüntüleme (MRG) üretrografi üretra lümeni hakkında önemli bilgi verir (33). Fleksible üretroskopi; darlığın yeri, sayısı ve segment uzunluğunu da gösterebilen tanı yöntemlerinden biridir.



Şekil 3. Bulböz üretra darlığının radyolojik ve endoskopik görüntüsü

Üretra darlığının tedavi yönetiminde tanıda kullanılan görüntüleme yöntemi önemlidir. Kullanılan tanı yöntemi darlığın yeri ve uzunluğu konusunda net bilgi vermelidir. Elde edilen bilgiler darlık tedavisinde kullanacağımız tedavi modalitesinin seçiminde ana rolü üstlenmektedir.

2.8. Üretra Darlığında Tedavi

2.8.1. Üretra Dilatasyonu

Tarihsel açıdan bakıldığında, üretra dilatasyonu en basit yöntem ve ilk uygulanan tekniktir. Balon dilatasyonu, metal ve renal dilatatörler ve nelaton sonda üretral dilatasyon amacıyla kullanılabilir. Temel amaç oluşan skarın basınç uygulanarak gerilmesi ve lümen çapının artırılmasıdır. Dikkat edilmesi gereken nokta gerilmeyi sağlarken epitelyal dokunun yırtılmasını engellemektir. Yırtılma olması halinde daha derindeki dokuların hasar alma riski ortaya çıkar. Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın, travmayı en aza indirmek için dokuya karşı nazik olunmalı ve aşamalı şekilde aletlerin çapı arttırılmalıdır. Kür sağlamak amacıyla tercih edilen bir yöntem değildir. Zemininde spongiofibrozis olan darlıklarda kür sağlamaz. Ancak epitelyum kaynaklı darlık varlığında küratif olabilir. Genel durumu orta-kötü, komorbiditesi yüksek olan ve cerrahi için uygun olmayan hastalarda hastane ortamına ihtiyaç duyulmadan

yapılabilecek bir tedavi yöntemidir. 1 cm'den küçük ve özellikle bulböz darlıklarda %35-%70 uzun dönem başarı oranları ile hastalara önerilebilecek bir seçenek olarak tedavi protokollerinde yerini almaya devam etmektedir (34). Tekrarlayan dilatasyonlarda yapılan tekrara paralel olarak başarı oranları azalmaktadır (35). İnternal üretrotomi(İÜ) ile karşılaştırılan çalışmalarda orta dönem sonuçlarında üretra dilatasyonu üstün görünürken uzun dönem sonuçlarında birbirlerine benzer etkinlik gösterirler (36, 37).

2.8.2. Üretral Stent

İlk kez 1988 yılında Milroy tarafından kullanımı yayınlandıktan sonra üretral stentler hakkındaki çalışmalar ve yayınlar ilgi çekmeye başladı (38). Çıkarılabilir ve kalıcı tip olmak üzere iki çeşit stent mevcuttur.

Çıkarılabilir (memokath) stentler; nikel ve titanyum alaşımından yapılmış, spiral şekilli bir üründür. Üreter, prostat, mesane boynu, anterior üretra ve bulböz üretra için kullanıma uygun 5 farklı modeli bulunmaktadır. Stent, darlığın olduğu alana uygun şekilde yerleştirilir. Daha sonra 55 C⁰'nin üzerinde su ile temas ettiğinde stentin bir veya iki ucu genişleyerek stentin yerinde kalmasına neden olur. Stent 5 C⁰'nin altında su ile temas ettirildiğinde eski haline gelerek kolay şekilde çıkarılmaya olanak sağlar.

Kalıcı (urolime) stentler; kendiliğinden genişleyebilen ve manyetik özellik taşımayan stentlerdir. Örgülü ağ yapısında sahiptir. Elmas benzeri hücre tasarımı sayesinde üretranın içerisine gömülmesi kolaylaşır. Böylece stentin kabuklanma ve migrasyon riski azalmış olur. Migrasyon, kabuklanma, irritatif semptomlar, ağrı ve epitelizasyon başlıca komplikasyonlarıdır. Epitelizasyondan sonra kalıcı stentin çıkarılması oldukça zordur. Ancak klinik veriler uzun dönemde stent çıkarılmasının düşük ihtimal olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla doğru hasta seçimi ve doğru uygulama sonrası bu komplikasyon teorik düzeyde kalmaktadır. Daha geniş lümen, birden fazla bölgeye uygulanabilirliği, daha düşük oranda kabuklanma ve daha düşük enfeksiyon riski geçici stentlere olan üstünlükleridir (39).

Bunların dışında, zaman içerisinde biyolojik olarak parçalanabilen stentler üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Belli bir süre içerisinde kendiliğinden parçalanabilen, anti-proliferatif ve anti-inflamatuar stentlerin üretilmesi halinde stent konusunda yeni bakış açılarının ortaya çıkması beklenmektedir (40).

Üretral stentlerin klinik kullanımı; yetersiz veri yayınları ve dar endikasyon bandı nedeniyle sınırlı düzeyde kalmıştır. Mevcut özellikleriyle üretra darlığının tedavisindeki ilk seçenek olmaktan uzaktır. Çocuk ve genç yaş hastalarında kullanımı önerilmemektedir. Tekrarlayan bulböz üretra darlığı olan; üretroplasti adayı olamayan veya üretroplastiyi kabul etmeyen 50 yaş üstü hastalar için bir seçenek olarak sunulabilir.

2.8.3. İnternal Üretrotomi

İÜ; darlık segmentinin emdoskopik olarak insize edilmesi ve lümenin genişletilmesi prensibine dayanan bir tekniktir. 0 derece optik ve üretroskop ile yapılan bu teknikte insizyonun derinliği sağlıklı dokuya ulaşılan kadar arttırılır. Skarlı epitel dokusunun uçları birbirinden ayrılarak, doku sekonder yara iyileşmesine bırakılır. İyileşme süreci ile beraber dokuda yara kontraksiyonu da başlar. Kontraksiyonun temel amacı yara kenarlarını birbirine yaklaştırarak epitelizasyon sürecini kısaltmaktır. Dolayısıyla internal üretrotomide başarı; epitelizasyon miktarı ile kontraksiyon derecesindeki dengeye bağlıdır. Kontraksiyona bağlı lümen daralmadan önce yeterli epitelizasyon ile geniş bir lümen oluşmuşsa yapılan işlem başarılı olur. Aksi takdirde hasta bu işlemde fayda göremez (41).

Sachse tarafından tanımlanan ve saat 12 hizasından insizyon yapma tekniğine dayanır. Amaç korpus spongiozum hasarından kaçınmaktır (42). Korpus kavernozumun ön yüzü en kalın olan bölümdür. Ön yüzdeki en ince yerler saat 2 ve 10 hizası olduğundan saat 12 hizası tercih edilmektedir. Çoklu kesi gibi farklı teknikler de zamanla denenmiştir (43). Ancak bu teknik birçok cerrahın hala en sık uyguladığı yöntem olmaya devam etmektedir.

Kolay uygulanabilir olması, düşük maliyet, hastanede kısa yatış süresi, lokal anestezi ile yapılabilir ve tekrarlanabilir olması, tecrübe istememesi, erken sonuç verme nedeniyle hasta memnuniyetinin yüksek olması başlıca tercih sebebidir. En büyük handikapı ise yüksek oranda geçici etkiye sahip olmasıdır.

İÜ'nün komplikasyonları hakkında kontrollü randomize çalışma olmadığı için yayınlanan veriler, muhtemelen cerrahi deneyim ve kullanılan cerrahi tekniğe bağlı olarak farklı oranlarda yayınlanmıştır. İnsidansları yayınlarda farklılık gösterse de hemoraji, perineal hematom, skrotal ödem, rektal perforasyon, epididimit-orşit, bakteriüri, üriner sepsis, skrotal abse gibi komplikasyonlar bildirilmiştir (44).

İnternal üretrotominin başarı oranları yapılan çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Darlığın yeri, uzunluğu ve daha önceki cerrahi geçmişi yapılan işlemin başarısını doğrudan etkilemektedir. 2 cm'den küçük darlıklarda 1 yıllık rekürrensiz başarı oranı %60 civarındayken, 4 cm'den büyük darlıklarda bu oran %20 civarındadır. Darlık uzunluğunun her 1 cm artması rekürrens riskini 1.22 kat arttırmaktadır (45). Tekrarlayan İÜ'lerde başarı şansı bir öncekine göre azalmaktadır (46).

Soğuk bıçak yerine lazer kullanımı da üretrotomi internada yerini almıştır. Ancak klinik sonuçlar benzer bulunmuştur. Nüks oranları, inkontinans, idrar eksravazasyonu ve İYE açısından her iki teknik arasında fark olmadığı bildirilmiştir (47).

Sonuç olarak ulaşılabilirliği ve uygulanması nispeten kolay olsa da internal üretrotominin basit bir cerrahi yöntem olmadığı bilinmelidir. Dolayısıyla cerrahi işlemin etkinliği ve sonraki süreçler de göz önünde bulundurularak İÜ tercihinin karar verilmelidir.

2.8.4. Üretroplasti

Üretroplasti; üretra darlığının altın standart tedavisi olarak kabul edilir. Diğer tedavi yöntemleriyle karşılaştırıldığında oldukça yüksek başarı oranlarına sahiptir. Eksizyon ve primer anastomoz veya greft/flep kullanılarak yapılan iki tekniği vardır. Darlığın yeri ve uzunluğuna bağlı olarak bu teknikler seçilmesine rağmen birbirlerine üstünlükleri olduğuna dair kanıt bulunmamaktadır (48).

Eksizyon ve primer anastomoz tekniğinde darlığın olduğu üretral doku serbestlenir ve fibrotik dokunun tamamı eksize edilir. Eksizyon sonrası iki üretral uç spatüle edilerek gergin olmayacak şekilde primer anastomoz yapılır. Üretroplastide hangi tekniğin seçileceğine dair tam bir standardizasyon sağlanamamıştır. Ancak primer anastomoz seçiminde darlığın uzunluğu etkilidir. Bir-iki cm arası darlıklarda primer anastomoz uygulanabilmektedir (49). Eksizyon ve primer anastomoz sonuçlarının değerlendirildiği 1200 vakalık bir meta-analizde ortalama başarı oranı %93.8 olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada komplikasyon oranı %5'in altında bulunmuştur. Eretil disfonksiyonun ihmal edilebilecek düzeyde olduğu, özellikle yaşlı ve uzun segment darlığı olan hastalarda ortaya çıktığı ve çoğunluğunun geçici olduğu paylaşılmıştır. Hematom, enfeksiyon, kurvatür, inkontinans ve fistül karşılan diğer komplikasyonlardır.

Yüksek başarı oranına rağmen uzun darlıklarda penis boyunda kısalma, penil kurvatur ve erektil disfonksiyon riski nedeniyle 2 cm ve üzerindeki darlıklarda anastomoz üretroplastisi yerine augmentasyon üretroplastisi tercih edilmektedir (50). Greft için penil deri, skrotal deri, mesane ve kolonik mukoza gibi dokular denenmiş olsa da oral mukoza en etkili seçenek olarak ön plana çıkmaktadır. Kolay ulaşılabilmesi, kıl içermemesi, düşük komplikasyon ve yüksek hasta memnuniyeti nedeniyle en çok tercih edilen grefttir (51). Yoğun elstatin içeriği nedeniyle kolay şekil alabilmesi, sahip olduğu mikroorganizmalar sayesinde enfeksiyon ve inflamasyona karşı dirençli olması ve gerilmeye karşı dayanıklı olması üretroplastide ilk seçenek olmasını sağlamıştır (52).

2.9. İlaçların Genel Özellikleri

2.9.1. Doksisisiklin

Doksisisiklin; $C_{22}H_{24}N_2O_8$ kimyasal formülüne sahip, tetrasiklin analogu yarı sentetik bir antibiyotiktir. Protein sentez inhibisyonu yaparak etkinlik gösterir. Bu etkinliğini ribozomun 30s alt birimine tRNA'nın birleşmesini engelleyerek gösterir (53). Gram pozitif ve gram negatif etkinliğinin yanı sıra anaerobik etkinliğe de sahip olan doksisisiklin, bu özelliği ile çok sayıda bakterinin yol açtığı enfeksiyonlarda kullanım endikasyonu almıştır (54). Oral alım sonrası %95 emilim oranına sahip olan bu ajan %30-40 civarında böbrekten atılır (55).

Doksisisiklinin fibrozise etkilerini değerlendiren çalışmalar in vitro ve hayvan deneylerinde ortaya çıkarılmıştır.

Akciğer fibrozisinde; inflamasyon sitokinlerini baskılayarak ve TGF- β sinyal yolunun inhibisyonunu sağlayarak fibroziste azalmaya yol açabilir (56).

Trahom; metalloproteinaz kaynaklı olarak ortaya çıkan bir konjunktival skar hastalığıdır. Doksisisiklin, metalloproteinaz inhibisyonu yaparak fibroziste azalmaya yol açabilir (57).

Doksisisiklinin lokal kullanımı antifibrotik etkiye sahiptir. Deri yaralanmalarındaki lokal kullanımı kollajen tip-1'in (COL-1) ve profibrotik fibroblastları azaltarak skar oluşumunu inhibe eder (58).

2.9.2. Losartan

Losartan; $C_{22}H_{23}ClN_6O$ formülüne sahip, anjiotensin 2 (Ang-2) reseptör antagonistidir. Başlıca metabolik yolu sitokrom P450 sistemi üzerinden olup, oral alınan dozun %14 kadarı aktif metabolitine dönüşmektedir (59). Günümüzde; hipertansiyon, kalp yetmezliği tedavisi ve inme profilaksisinde kullanım endikasyonlarına sahiptir. Birçok dokuda reseptörleri bulunan anjiotensin 2'nin sempatik aktivasyon, düz kas proliferasyonu, fibroblast hiperplazisi, fibrinolitik aktivitenin azalması gibi etkinlikleri bulunmaktadır. Bu grubun ilk üyesi olan losartan yaklaşık 40 yıldır antihipertansif ve kalp yetmezliğindeki etkinlikleri nedeniyle kullanılmaktadır.

Ang-2'nin fibrotik etkinliği net olarak açıklanamamıştır. Ancak, TGF- β 1 üretimini ve/veya salınımını arttırarak ve DNA sentezi, prokollajen A1 ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırarak fibrozise yol açtığını belirten çalışmalar mevcuttur (60, 61). ANG-2 reseptör antagonistlerinin karaciğer(KC) hücreleri üzerindeki antifibrotik etkinliğinin keşfedilmesi, bu ajanların fibrozisle sonuçlanan KC hastalıklarının tedavisinde kullanılması fikrini ortaya çıkarmıştır. KC transplantasyonu yapılan hastalarda greft fibrozisini, hepatitli hastalarda KC fibrozisini azalttığına dair kanıtlar yapılan çalışmalarda sunulmuştur (62, 63).

ANG-2 yolağının böbrekte tübülointerstisyel fibrozis üzerindeki etkisi bilinmektedir. Bu yolağın inhibisyonu TGF- β ve kollajen 4 'ün azaltılmasına paralel olarak ortaya çıkar (64). Böbrek transplantasyonu sonrası ANG-2 antagonistlerinin kullanımı hem hasta yaşam süresini hem de greft ömrünü uzatmaya yardımcı olmuştur (65).

ANG-2 reseptör antagonistlerinin antifibrotik özelliğinin farklı organlardaki etkileri araştırılmaya devam etmektedir. Lokal losartan kullanımının derideki fibrozisi azaltabileceği yönünde bulgular ortaya çıkarılmıştır (66)

2.9.3. Rapamisin

Rapamisin $C_{51}H_{79}NO_{13}$ formülüne sahip, makrolid grubu bir antibiyotiktir. Streptomyces hygroscopicus ürettiği bu molekül; antifungal, immün süpresan ve anti-tümöral özelliklere sahiptir (67). Etkisini mammalian target of rapamycin (mTOR) kompleksi üzerinden mTOR inhibisyonu yaparak gösterir. Bir serin/treonin kinaz olan mTOR kompleksi hücre büyümesinin ana düzenleyicilerinden birisidir. Hücre içi ve hücre dışı sinyalleri birleştirerek; büyüme, çoğalma ve hayatta kalma gibi önemli fonksiyonlarda rol alır (68). Protein ve lipid sentezinin artması, otofajinin azaltılması, genotoksik stres ve inflamasyon artışı gibi hücresel

olaylarda yer alır (69). Sitokrom P (CYP) 3A4, CYP3A5 VE CYP2C8 enzimleri tarafından metabolize edilen bu molekül; ödem, trombositopeni, gastrointestinal semptomlar, lökositopeni, yara iyileşmesinde azalma gibi yan etkilere sahiptir (70).

Rapamisinin böbrek transplantasyonu sonrası kullanımı akut greft reddini azalmaktadır. Yapılan bir çalışmada siklosporin (%8.5) ile kıyaslandığında %32 oranında greft reddini azaltarak etkili olmuştur (71). 1999'da böbrek transplantasyonunda reddi önlemek için FDA tarafından kullanım onayı alan ilaç bununla beraber karaciğer transplantasyonunda da reddi önlemek için etkilidir (72). Kalp ve akciğer nakillerinde gelişen kronik reddedilmeyi engellemek veya kalsinörin inhibitörlerine bağlı gelişen toksisiteyi azaltmak için alternatif bir seçenektir (73). Topikal kullanımı tüberoskleroz kompleksine bağlı anjiofibromlarda etkinlik göstermektedir (74). Tiroid göz hastalığı, ekstraoküler kas fibrozisi ile sonuçlanan inflamatuvar hastalıktır. İnsanlarda terapötik dozda rapamisin kullanımı orbitadaki fibroblastlarda mTOR inhibisyonu yaparak fibrozisi azaltır (75).

Rapamisinin üretra darlığına olan etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. Lokal rapamisin kullanımı üretra darlığını, fibroblast proliferasyonunu ve kollajen ekspresyonunu inhibe ederek azaltmaktadır (76).

2.9.4. Botulinum Toksin A

Botulinum toksin A(BOTOX); Clostridium Botulinum tarafından salınan bir toksindir. Clostridium botulinum; çubuk şeklinde, gram pozitif, anaerobik bir bakteridir. 7 ayrı serotipe sahip olan bu bakteri 8 farklı toksin salınımını gerçekleştirir. Botulinum toksin A bu toksinlerin en güçlü formudur. Enzimler tarafından parçalanamayan protein yapısı nedeniyle oldukça dayanıklıdır. 1700'lü yılların sonlarında kontamine gıda yoluyla çok sayıda salgına neden olmuştur. Görme, konuşma ve yutma bozuklukları gibi semptomları içeren bu toksin asfiksiye bağlı olarak ölümlere yol açmıştır (77).

Güçlü bir zehir olarak bilinen botulinum toksini, biyolojik silaha dönüştürülme konusunda çalışmalara neden olmuş ancak bu alanda yeterli görülmediğinden çalışmalardan vazgeçilmiştir (78). İnsanlardaki terapötik güvenlik marjı oldukça geniştir ve 3000 ünitelik kullanımda minimal yan etkiler oluşturur. Düşük ihtimal dahilinde disfaji, solunum sıkıntısı nekrotizan fasiit, furnier gangreni, servikal kifoza, pitoz gibi yan etkilerinin olabileceği akıldan tutulmalıdır (79).

Nöromusküler kavşakta asetilkolin salınımını inhibe ederek kasın geçici bir süreliğine gevşemesine yol açarak etkisini gösterir. İlk kez 1946 yılında bu toksinin insan kullanımına uygun formu üretildi (80). Terapötik formu ilk kez distoni ve servikal distoni ilişkili şaşılık ve göz kapağı spazmı tedavisinde kullanıldı (81).

Dermatolojide yaygın kullanım alanına sahip olan BOTOX, birçok farklı hastalıkta yarar sağlamaktadır. Aşırı kollajen birikimiyle karakterize hipertrofik skar ve keloidlerde kullanımı bu lezyonların azalmasına katkı sağlar. Bu etkinliğini; fibroblast proliferasyonunu inhibe ederek ve TGF- β 1 ile COL-1 ve kollajen tip-3'ün (COL-3) miktarını azaltarak gösterir (82). Bu anti-inflamatuvar etkinlik BOTOX'un cerrahi sonrası yara yerindeki inflamasyonun azalmasına yardımcı olur.

BOTOX nöroloji pratiğinde; distoni, blefarizm, hemifasial spazm, servikal distoni, esansiyel ve istirahat tremoru, tik ve tourette sendromu ve spinal myoklonus gibi hareket bozukluğu hastalıklarında tedavi amacıyla kullanılmıştır (83). Bunlarla beraber sialore, hiperhidrozis, kozmetik amaçlı, kronik migren, nöropatik ağrı, trigeminal nevralji ve post-travmatik ağrı tedavisinde de kullanılmaktadır (84).

Üroloji pratiğinde ise aşırı aktif mesane tedavisinde; inkontinans atak sıklığı, mesane kapasitesi, maksimum detrüssör basıncı ve yaşam kalitesinde düzelme sağlamak ve bu nedenle endikasyon dahilinde kullanılmaktadır (85).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hayvan ve Grupların Seçimi

Çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen, 60 adet 260-460 gr ağırlığında Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deneyler etik ve deneysel hayvanları konusunda sertifikalı araştırmacılar tarafından yürütüldü. Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (08.07.2020/04/02) ve deneylere izin alındıktan sonra başlandı.

Sıçanlar deneysel hayvanları merkezinden alınarak sıcaklığı 22,4 °C ve 12 saat karanlık/aydınlık olacak şekilde ışığı ayarlanmış odada 5 tanesi bir kafeste olacak şekilde tutuldular. Ad libitum beslenme uygulandı ve su kısıtlamasına gidilmedi. Hayvanlar 6 gruba randomize edildi:

1. Grup: Sham Kontrol (n:10)
2. Grup: Darlık (n:10)
3. Grup: Darlık + Losartan (n:10)
4. Grup: Darlık + Doksisisiklin (n:10)
5. Grup: Darlık + Rapamisin (n:10)
6. Grup: Darlık + Botulinum Toxin A (n:10)

3.2. Cerrahi Prosedür ve Deneyin Yapılması

Sıfırinci günde tüm hayvanların ağırlıkları hassas tartı ile ölçülerek kaydedildi. Bütün hayvanlara anestezi sağlamak amacıyla xylazin hidroklorid (10 mg/kg) (Rompun®; Bayer Healthcare, Leverkusen, Almanya) ve ketamin hidroklorid (100 mg/kg) (Ketalar®; Pfizer, İstanbul, Türkiye) intraperitoneal olarak uygulandı. Ardından penoskrotal bölge traş edilerek %10'luk povidone iodine (Batticon®; Adeka, Samsun, Türkiye) solüsyonu ile temizlendi. Supin pozisyonda 1. gruba penoskrotal insizyon yapıldıktan sonra cilt monoflaman sütürlerle tek tek dikildi. 2-5. gruplarda insizyon sonrası künt ve keskin diseksiyonla üretra ortaya konuldu. Ardından üretraya 5 mm'lik aralıklarla 3 noktaya 1 saniye süren 10 wattlık elektrokoagülasyon uygulandı. Kanama kontrolü sağlandıktan sonra cilt monoflamant sütürlerle tek tek dikildi. 6. gruba elektrokoagülasyon yapıldıktan sonra üretranın submukozal

dokusuna 10 ünite/0,5 ml BOTOX(Botox®, Allergan, Mayo, İrlanda) enjekte edildi. Kanama kontrolü yapıldıktan sonra 6. Grubun cilt dokusu da monoflamant sütürlerle tek tek dikildi.

Cerrahi sonrası;

3. Gruba Losartan(Cozaar®, Merck Sharp Dohme, İstanbul,Türkiye) 30mg/kg/gün,

4. Gruba Doksisisiklin(Tetradox®, Teva, İstanbul, Türkiye) 10mg/kg/gün,

5. Gruba ise Rapamisin(Rapamune®, pfizer, Kildare, İrlanda) 2mg/kg/gün olacak şekilde 14 gün boyunca gavaj halinde verildi.

14. günde tüm hayvanların ağırlıkları hassas tartı ile ölçülerek kaydedildi. Anestezi (xylazin hidroklorid (10 mg/kg) ve ketamin hidroklorid (100 mg/kg) intraperitoneal) uygulandıktan sonra hayvanlar sakrifiye edildi. Ardından supin pozisyonda penoskrotal insizyon yapılarak üretra ortaya konuldu ve eksize edildi. Elde edilen üretra dokuları histopatolojik ve genetik değerlendirme için iki parçaya bölünerek toplandı (resim 2,3,4,5).



Resim 2: Kontrol grubu normal üretra dokusu



Resim 3: Darlık grubu travmatik üretra dokusu



Resim 4: Rapamisin grubu, belirgin iyileşme gösteren üretra dokusu



Resim 5:Doksisiklin grubu, belirgin iyileşme gösteren üretra dokusu

3.3. Histopatolojik Çalışmalar

3.3.1. Materyal

3.3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

- 1- Mikrotom (RM2125 RTS, Leica)
- 2- Su banyosu (HI 1210 Leica)
- 3- İnkübatör (D63450, Heraeus)
- 4- Görüntüleme destekli binoküler ışık mikroskobu (ECLIPSE Ni-U, Nikon)

3.3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Formaldehit %37 (Tekkim), Sodyum Fosfat Monobazik Dihidrat (Sigma), Sodyum Fosfat Dibazik Dihidrat (Sigma), Etanol Absolu (İsolab), Hematoksilen solüsyonu (merck), Hematoksilen Kristal, Ferrik klorid, Hidroklorik asit, Pikrik Asit solüsyonu, Ponceau S, Fuchsin Asit, Asetik asit %100, Orange G, Molybdato-phosphoric asit hidrat, Light green SF yellowish, Eozin G-Solüsyonu (Merck), Parafin (Tekkim), Entellan (Sigma), IL-1 β primer antikor, Sekonder antikor kiti, Antikor dilüent, DAB kiti, Martius Scarlet Blue Kit.

3.3.2. Metod

3.3.2.1. Doku Örneklerinde Histokimyasal Çalışmalar

3.3.2.1.1. Fiksasyon ve Yıkama

Hayvanlardan elde edilen dokular fiksasyon için %10'luk nötral formaldehit solüsyonu içerisinde bekletildi. Fiksasyonun tamamlanmasının ardından dokular bir gece akar su altında yıkanarak doku takip işlemlerine başlandı.

3.3.2.1.2. Doku Takibi

Yıkama işleminin ardından dokulardaki suyun uzaklaştırılması amacıyla dokular dereceli olarak artan alkollerde belirlenen sürelerde bekletildi (tablo 1).

Tablo 1. dehidratasyon aşamasında kullanılan alkol dereceleri ve uygulama süreleri

Alkol Derecesi	Süre
%50	45 dakika
%60	45 dakika
%70	45 dakika
%80	45 dakika
%90	45 dakika
%96	45 dakika
%100	1 saat
%100	1 saat

Dehidratasyon aşamasının ardından dokuların durumları kontrol edilerek 5-15 dk ksilolde şeffaflandırıldı. Ardından dokular parafin emdirme işlemi için 60 °C deki sıvı parafin içerisinde ve etüvde 1 saat, katı parafin içerisinde 1 gece oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar etüvde 60 °C de sıvılaştırılan parafin içerisindeki dokular bloklar halinde gömüldü.

3.3.2.1.3. Kesit Alma

Parafin bloklardan mikrotom yardımı ile 4-5 µm kalınlığında kesitler elde edildi ve sıcak su banyosu yardımıyla lamlara aktarıldı. İmmunohistokimyasal işlemler için polizinli lamlar kullanıldı.

3.3.2.1.4. H-E Boyama

Histokimyasal değerlendirmelerin yapılabilmesi amacıyla elde edilen kesitler belirtilen protokol uyarınca Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyandı (tablo 2).

Tablo 2. H-E boyama protokolü

İŞLEM	SÜRE-TEKRAR	
1	Deparafinizasyon (60 °C)	1 gece
2	Deparafinizasyon (ksilol)	30 dk
3	Deparafinizasyon (ksilol)	30 dk
4	Alkol serisi (%100, %90, %80, %70, %60, %50)	10 dk
5	Distile su	10 dk – 2 kez
6	Hematoksilen	4,5 dk
7	Yıkama	5 dk – 2 kez
8	Asit Alkol (%1 lik)	Batır-çıkart
9	Yıkama	5 dk
10	Eozin	3,5 dk
11	Yıkama	5 dk – 2 kez
12	Alkol serisi (%50, %60, %70, %80, %90, %100)	Batır- çıkart
13	Ksilol	30 dk – 2 kez
14	Entellan ile Kapatma	-

3.3.2.1.5. Masson Trikrom Boyama

Bağ dokunun daha iyi değerlendirilebilmesi amacıyla Masson Trikrom boyama yapıldı. Bu amaçla kesitlere sırası ile tabloda belirtilen işlemler uygulandı (Tablo 3). Bu işlemler için hazırlık gerektiren bazı kimyasallar kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlandı;

Tablo 3. Masson Trikrom boyama protokolü

	İŞLEM	SÜRE-TEKRAR
1	Deparafinizasyon (60 °C)	1 gece
2	Deparafinizasyon (ksilol)	30 dk
3	Deparafinizasyon (ksilol)	30 dk
4	Alkol serisi (%100, %90, %80, %70, %60, %50)	10 dk
5	Distile su	10 dk – 2 kez
6	Boin solüsyonunda (60 °C)	1 saat
7	Çeşme suyu ile yıkama	10 dk
8	Distile su	10 dk
9	Weigert's demirli hematoksileni	10 dk
10	Çeşme suyu ile yıkma	5 dk – 2 kez
11	Ponceau S/ Asit fuksin solüsyonu	5 dk
12	%1 Asetik asit	Batır-çıkar
13	Orange-G solüsyonu	3 dk
14	%1 Asetik asit	Batır-çıkar
15	Light Green SF solüsyonu	5 dk
16	%1 Asetik asit	Batır-çıkar
17	%96 Etanol	1dk
18	%96 Etanol	1dk
19	%100 Etanol	1dk
20	%100 Etanol	1dk
21	Ksilol	5 dk -2 değişim
22	Entellan ile Kapatma	-

3.3.2.1.5.1. Bouin's Solüsyonu

Pikrik asit solüsyonu (75 ml)

%37' lik Formalin solüsyonu (25 ml)

% ml Glasiyal Asetik asit

3.3.2.1.5.2. %1 Asetik Asit Solüsyonu

%100 asetik asit (10 ml)

Distile su (990 ml)

3.3.2.1.5.3. Weigert's Demirli Hematoksilen Boyama Solüsyonu

Bu solüsyon için A ve B solüsyonu olmak üzere iki ayrı solüsyon hazırlanarak eşit hacimlerde karıştırıldı.

3.3.2.1.5.3.1. Solüsyon A

Kristal Hematoksilen (4 gr)

%80 lik Etanol (200 ml)

3.3.2.1.5.3.2. Solüsyon B

Ferrik Klorid (8gr)

Distile su (190 ml)

HCL konsantre (2 ml)

3.3.2.1.5.4. Ponceau S/Asit Fuksin Solüsyonu

Ponceau S (0.2 gr)

Asit Fuksin (0.1 gr)

Distile su 300 ml

% 100 Asetik asit (0.6 ml) ile birlikte çözdürülerek filtre edildi.

3.3.2.1.5.5. Orange G Solüsyonu

Orange G (2 gr)

Molybdato-phosphoric asit hidrat (5 gr)

Distile su (100 ml) içerisinde çözdürülerek filtre edildi

3.3.2.1.5.6. Light Green SF Solüsyonu

Light green SF Yellowish (0.2 gr)

% 100 Asetik Asit (0.2 ml)

Distile Su (100 ml) içerisinde çözdürülerek filtre edildi

3.3.2.1.6. Martius Scarlet Blue Boyama

Masson Trikrom boyamanın bir modifikasyonu olan bu yöntem de benzer şekilde bağ dokunun değerlendirilmesi amacıyla uygulandı. Bu amaçla Martius Scarlet Blue (MSB) Kiti üretici tarafından sağlanan tablodaki protokole uygun olarak kullanıldı (tablo 4).

Tablo 4. Martius Scarlet Blue boyama protokolü

	İŞLEM	SÜRE-TEKRAR
1	Deparafinizasyon (60 °C)	1 gece
2	Deparafinizasyon (ksilol)	30 dk
3	Deparafinizasyon (ksilol)	30 dk
4	Alkol serisi (% 100, %90, %80, %70, %60, %50)	10 dk
5	Distile su	10 dk – 2 kez
6	Weigerts Demirli Hematoksilen	10 dk
7	%1 Asit Alkol	Batır-Çıkar
8	Çeşme suyunda yıkama	5 dk
9	Martius Yellow Solüsyonu	3 dk
10	Çeşme suyunda yıkama	5 dk
11	Crystal Ponceau Solüsyonu	5 dk
12	Çeşme suyunda yıkama	5 dk
13	Phosphotungstic asit solüsyonu	5 dk
14	Distile su ile yıkama	5 dk
15	Methhyl Blue solüsyonu	5 dk
16	Çeşme suyunda yıkama	5 dk
17	%100 etanolde dehidratasyon	-
18	Ksilol	-
19	Entellan ile kapatma	-

3.3.2.1.7. Histopatolojik Değerlendirme

H-E ile boyanan dokular histopatolojik değerlendirme amacıyla görüntüleme destekli binoküler ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğraflar elde edildi. Kesitler submukozal hemoraji, vasküler konjesyon, epitelyal dejenerasyon, inflamasyon ve fibrozis açısından değerlendirildi. Tespit edilen bulgunun derecesine göre histopatolojik skorlama şu şekilde yapıldı;

0: hiç bir bulgu yok

1+:zayıf düzeyde bulgu

2+:orta düzeyde bulgu

3+:yüksek düzeyde bulgu

3.4. İmmünohistokimyasal Çalışmalar

3.4.1. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Doku takibi sonrası polilizinli lamlara alınan 4-5 µm kalınlığındaki kesitlere sırasıyla tabloda belirtilen işlemler uygulandı (Tablo 5).

Tablo 5. İmmunohistokimya protokolü

	İŞLEM	SÜRE-TEKRAR
1	Deparafinizasyon (60 °C)	1 gece
2	Deparafinizasyon (ksilol)	30 dk
3	Deparafinizasyon (ksilol)	30 dk
4	Alkol serisi (%100, %90, %80, %70, %60, %50)	10 dk
5	Distile su	5 dk – 2 kez
6	PAP Pen ile doku sınırlaması	-
7	PBS ile yıkama	5 dk – 2 kez
8	Sitrat buffer 600W mikrodalgada	2 dk
9	PBS ile yıkama	5 dk – 2 kez
10	H ₂ O ₂ blok	10 dk
11	PBS ile yıkama	5 dk – 2 kez
12	Ultra-V blok (non immun serum)	1 saat
13	Uygun şekilde antikor dilüent ile dilüe edilmiş primer antikor	1 gece, nemli ortam, +4°C
14	PBS ile yıkama	5 dk – 2 kez
15	Primer antikor ile uyumlu sekonder antikor	1 saat, oda ısısı
16	PBS ile yıkama	5 dk – 2 kez
17	Streptavidin peroksidaz	30 dk, oda ısısı
18	PBS ile yıkama	5 dk – 2 kez
19	DAB solüsyonu	10-15 dk, karanlık ortamda
20	PBS ile yıkama	5 dk – 2 kez
21	Hematoksilen ile zıt boyama	4 dk
22	Çeşme suyunda yıkama	5 dk
23	Sırasıyla %80, %96 ve %100'lük etil alkolde	1 er dk
24	ksilol	5dk- 2 kez
25	Mounting medyum ile kapatma	-

3.4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan dokulardaki IL-1 β (poliklonal dilüsyon:1/100, elabscience, E-AB-66749, ABD) aktivitesinin değerlendirilmesinde yarı kantitatif skorlama sistemi kullanıldı. Bu amaçla;

(-): işaretlenme yok

(+): zayıf işaretlenme

(++): orta derece işaretlenme

(+++): kuvvetli işaretlenme olarak derelendirildi.

3.5. Genetik Çalışmalar

3.5.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.5.1.1. RNA İzolasyonu

Elde edilen dokular serum fizyolojik ile yıkanarak steril, DNaz/RNaz ve pirojen içermeyen önceden etiketli ependorf tüplerine konularak prosedür uygulanıncaya kadar -80 derece derin dondurucuya kaldırılmıştır. RNA izolasyonu Geneall Ribosipin RNA izolasyon kiti ile üreticinin protokolüne göre aşağıdaki gibi yapıldı.

1. Yaklaşık 20mg doku üzerine 350 μ l RAL buffer (%1 Beta merkaptetanollü) eklendi pipetaj ve vorteksenerek ile homojenize edildi.
2. 11.000 g de 2 dakika oda ısısında santrifüj edilir ve süpernatant 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
3. Süpernatantın üzerine %70 lik etanolden 1-1 hacimde olacak şekilde eklendi ve santrifüj edilmeden pipetajla karıştırıldı.
4. Karışım mini spin kolona aktarıldı.
5. 11.000g de oda ısısında 1 dakika sanrifüj edildi. Spin kolondan koleksiyon tüpüne geçen sıvı atılır ve spin kolonun altına tekrar yerleştirildi.
6. 700 μ l RW buffer ilave edilerek 11.000g de 30sn santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü boşaltıldı ve spin kolon tekrar yerleştirildi.

7. 500 µl RSW buffer ilave edilerek 11.000g de 30 sn santrifüj edildi. Spin kolondan geçen sıvı atılarak koleksiyon tüpü tekrar yerleştirildi.
8. 500 µl RSW buffer eklendi ve 11.000g de 30sn santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü tekrar boşaltılarak spin kolon yerleştirildi.
9. $\geq 13.000g$ de 1 dakika santrifüj edilerek wash buffer kalıntıları uzaklaştırıldı. Spin kolon 1,5 µl lik ependorflara yerleştirildi
10. 50 µl nükleaz free water spin kolona eklenerek 1 dakika oda ısısında inkübe edildi.
11. 12.000 g de 1 dakika oda ısısında santrifüj edildi.

Elde edilen RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanılmak üzere nanodrop cihazı ile miktar ve saflık tayini yapılmıştır. 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen ölçümlerin birbirine oranı (260 nm / 280 nm) RNA saflığını göstermektedir. Saflığı 1,7 - 2,0 arasında olan RNA numularının miktar tayinleri cDNA sentezinde kullanılmak üzere not edilmiş, saflığı bu oranlar dışında olan örneklerin RNA'ları tekrar izole edilmiştir (Tablo 6). İzole edilen her bir RNA örneğinin konsantrasyonu 500ng/µl'de standardize edilmiş ve cDNA sentez aşamasında kullanılmak üzere -80 dereceye kaldırılmıştır.

3.5.1.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, A.B.T.™ cDNA Sentez Kit (Atlas Biyoteknoloji, Türkiye) protokolüne göre termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. Her örnek için total reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde 0.2 ml'lik PCR tüplerine buz üzerinde aşağıdaki konsantrasyonlarda karışım hazırlanmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. 20 µl revers transkriptaz reaksiyon karışımı

10X reaksiyon tamponu	2 µl
dNTP karışımı (2.5 mM)	1 µl
Random hekzamer (50 µM)	2 µl
Revers Transkriptaz (200 U/µl)	1 µl
RNaz inhinitör	0.5 µl
RNaz içermeyen su	3.5 µl
RNA örneği	10 µl

Hazırlanan karışım termal döngü cihazına yerleştirilmiş ve aşağıdaki kit protokolü kullanılmıştır (Tablo 7). Elde edilen cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 7. Revers transkriptaz termal döngü protokolü

RT basamakları	Sıcaklık °C	Süre	Siklus
1. Basamak	25	10 dak	1
2. Basamak	37	120 dak	1
3. Basamak	85	5 dak	1
4. Basamak	4	∞	1

3.5.2. Primer tasarımı ve hazırlanması

Primer tasarımları, NCBI internet sitesi kullanılarak spesifik mRNA dizilimlerinin saptanması ve olası primer dizilimlerinin denenmesi ile yapılmıştır. Ekspresyon aşamasında kullanılan genler ve spesifik primer dizilimleri Tablo 8 de verilmiştir.

Dizaynı yapılan primerler ticari olarak sentezletirilmiş, liyofilize olarak temin edilmiştir ve DNaz/RNaz ve pirojen içermeyen, ticari olarak satılan hazır steril su ile stok 100 µM olacak şekilde sulandırılmıştır. Daha sonra stok primer solüsyonu kantitatif gerçek zamanlı PCR prosedüründe, kit üreticisi firmanın talimatlarına göre son hacimde 500 nM olacak şekilde tekrar sulandırılmıştır.

Tablo 8. Genler ve genlere spesifik primer dizilimleri

Gen	Spesifik Primer Dizilimi Forward (F)-Revers (R)
TGF- β	F:AGAACTCCCAACTACAGAAAAGCA
	R:AAGTGCAATGCAGACGAAGC
COL-1	F:CACTGCAAGAACAGCGTAGC
	R: AGTTCCGGTGTGACTCGTG
COL-3	F: TGGTGGCTTTCAGTTCAGCTA
	R: TTGCCATTGGCCTGATCCAT
ELASTİN	F:AGGAGTCAAGGCCAAGGTTC
	R:CTGCACCAGCCACTCCATAG
α SMA	F: CAGAGGAGCATCCGACCTTG
	R: GAGTCCAGCACAAATACCAGTTG
PDGF α	F: ACAGGACGCGTAGAACAATCG
	R: TGAACGGGTTGCTCGAGGT
PDGF β	F: TGAAGACGAACCATCGGCTG
	R: GAACCAGCCAAGGCGTCTA
GUSB (HouseKeeping)	F: GGCTGGTGACCTACTGGATTT
	R: AAGTTGACCCTGGTTCCCTG

3.5.3. Ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi

Ekspresyon seviyeleri A.B.T.TM cDNA Synthesis Kit with RNase (Atlas Biyoteknoloji/ Türkiye) kitleri kullanılarak Biorad CFX96 (California/USA) gerçek zamanlı PCR cihazında ölçülmüştür. cDNA sentezi yapılan örnekler çalışmadan 10 dakika önce +4°C'de ki blok üzerine alınarak bir süre bekletilmiştir. Çalışmada GUSB geni housekeeping gen olarak kullanılmış ve normalizasyon için bu genin ct değerleri kullanılmıştır. Cihazda 0.1 ml'lik per tüpleri kullanılmış reaksiyon son hacmi 20 μ L olarak ayarlanmıştır. Reaksiyon karışımı üretici protokolüne göre aşağıdaki gibi hazırlanmıştır (Tablo 9). Reaksiyonun cihaza yüklemeye başlamasını engellemek için prosedür buz üzerinde sürdürülmüştür.

Tablo 9. PCR reaksiyon karışımı

	Hacim	Final konsantrasyon
A.B.T. TM 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (without ROX)	10 µl	1X
Forward Primer (10 µM)	1 µl	1 µM
Reverse Primer (10 µM)	1 µl	1 µM
cDNA	1 µl	1 µl
DNaz/RNaz içermeyen su	7 µl	7 µl

Elde edilen reaksiyon karışımı kit üreticisinin protokolüne göre belirlenen termal döngü (Tablo 10) ile gerçek zamanlı qPCR cihazına yerleştirilmiş ve her bir örnek 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Tablo 10. Gerçek zamanlı PCR döngüsü

PCR basamakları	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
Başlangıç denaturasyonu	95	300 sn	1
Denaturasyon	95	15 sn	35
Primer bağlanması / Uzama	60-65	30 sn	
Melt-Curve Analizi	65-95	2-5 sn/basamak	1

Elde edilen ct değerleri ekspresyon seviyesinin değerlendirilmesi için her bir örnek ve grup için ayrı ayrı not edilmiştir. Normalize edilen örneklerin verilerine $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü uygulanmış ve elde edilen ham veriler kullanılacak olan istatistik çalışmasına uygun hale getirilmiştir.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler, IBM SPSS.23 (IBM Inc., Chicago, IL, ABD) programına aktarılarak istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlere geçmeden önce veri giriş hatasının olmaması ve parametrelerin beklenen aralıkta olup olmadığı ile ilgili kontroller

yapılmıştır. Sürekli değişkenlerin normallik varsayımları Kolmogorov Smirnov testi, varyans homojenlikleri ise Levene's Testi ile incelenmiştir. Sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama ve standart sapma, kategorik değişkenlerin tanımlanmasında ise frekans (n) ve yüzde (%) değerleri verilmiştir. İki düzeyli bağımlı örneklem karşılaştırmaları, veriler normal dağılıyor ise T testi kullanılmıştır. Verilerin normal dağılmadığı üç düzeyli karşılaştırmalar için Kruskal Wallis-H Testi, normal dağılım görüldüğünde ANOVA kullanılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler Ki kare test analizi ile incelenmiştir. İlişki görülmesi durumunda Cramer's V kat sayısı ve Post Hoc analizlerinden yararlanılmıştır. Sürekli değişkenlerin korelasyon analizi için Spearman's rho korelasyon testi kullanılmıştır. Bütün analizlerde anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ değeri kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1 Ölçümsel Bulgular

Çalışmaya kontrol, darlık, BOTOX, losartan, doksisisiklin ve rapamisin gruplarından 10'ar sıçan katıldı. BOTOX grubundaki 1 adet sıçan, deney başladıktan sonraki 12. günde ex oldu ve çalışmayı tamamlayamadı.

Gruplara göre sıçanların deneyin 0. günündeki ve 14. günündeki ortalama ağırlıkları ve bu verilerin istatistiki anlamlılık durumları Tablo 11'de sunuldu.

Tablo 11. Gruplara göre ratların 0 ve 14. gündeki ağırlık değişimleri

	Ağırlık 0.gün	Ağırlık 14.gün	t	p
	Ort. ± SS			
Kontrol	339,50 ± 83,22	344,00 ± 83,99	-1,051	0,321
Darlık	353,70 ± 36,66	356,40 ± 36,35	-2,024	0,074
BOTOX	393,78 ± 41,48	396,22 ± 41,91	-1,670	0,133
Losartan	341,90 ± 17,05	344,60 ± 16,76	-2,024	0,074
Doksisisiklin	364,00 ± 21,48	367,10 ± 19,37	-1,767	0,111
Rapamisin	337,10 ± 36,07	339,20 ± 36,23	-1,703	0,123

Bağımlı örneklem T testi

Kontrol grubundaki sıçanların 0.gündeki ortalama ağırlıkları 339,50±83,22 gr, 14.gündeki ortalama ağırlıkları ise 344,00±83,99 gramdı. Kontrol grubunda, sıçanların ağırlıklarının güne göre değişiminde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (p=0,321).

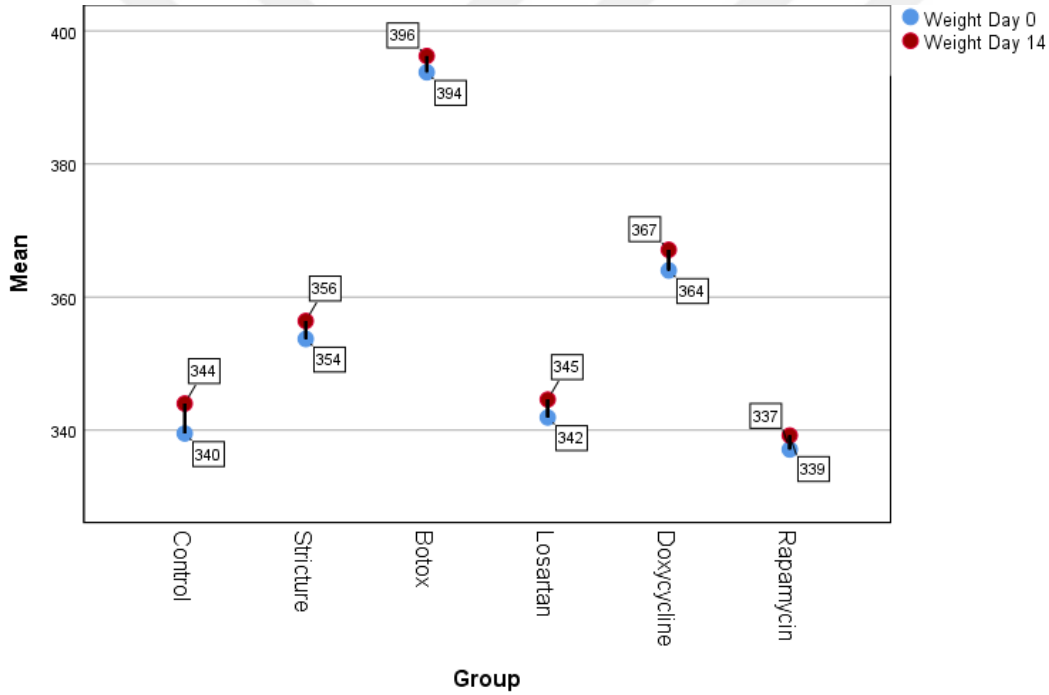
Darlık grubundaki sıçanların 0.gündeki ortalama ağırlıkları 353,70±36,66 gr, 14.gündeki ortalama ağırlıkları ise 356,40±36,35 gramdı. Darlık grubunda, sıçanların ağırlıklarının güne göre değişiminde istatistiksel olarak anlamlı bir etki saptanmadı (p=0,074).

BOTOX grubundaki sıçanların 0.gündeki ortalama ağırlıkları 393,78±41,48 gr, 14.gündeki ortalama ağırlıkları ise 396,22±41,91 gramdı. BOTOX grubunda, sıçanların ağırlıklarının güne göre değişiminde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (p=0,133).

Losartan grubundaki sıçanların 0.gündeki ortalama ağırlıkları $341,90 \pm 17,05$ gr, 14.gündeki ortalama ağırlıkları ise $344,60 \pm 16,76$ gramdı. Losartan grubunda, sıçanların ağırlıklarının güne göre değişiminde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=0,074$).

Doksisiklin grubundaki sıçanların 0.gündeki ortalama ağırlıkları $364,00 \pm 21,48$ gr, 14.gündeki ortalama ağırlıkları ise $367,10 \pm 19,37$ gramdı. Doksisiklin grubunda, sıçanların ağırlıklarının güne göre değişiminde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=0,111$).

Rapamisin grubundaki sıçanların 0.gündeki ortalama ağırlıkları $337,10 \pm 36,07$ gr, 14.gündeki ortalama ağırlıkları ise $339,20 \pm 36,23$ gramdı. Rapamisin grubunda, sıçanların ağırlıklarının güne göre değişiminde istatistiksel olarak anlamlı bir etki saptanmadı ($p=0,123$).



Şekil 4. Sıçanların 0. ve 14. gün ortalama ağırlıklarının gruplara göre dağılımı
(mean:ortalama)

Tablo 12. Ratların 0 ve 14. gün ağırlıklarının gruplara göre kıyaslanması

		Kontrol	Darlık	BOTOX	Losartan	Doksisiklin	Rapamisin	
		Ort. ± SS						p
Ağırlık 0. Gün	0.	339,50 ± 83,22	353,70 ± 36,66	393,78 ± 41,48	341,90 ± 17,05	364,00 ± 21,48	337,10 ± 36,07	0,025*
Ağırlık 14. Gün	14.	344,00 ± 83,99	356,40 ± 36,35	396,22 ± 41,91	344,60 ± 16,76	367,10 ± 19,37	339,20 ± 36,23	0,079

*:

ANOVA

p<0,05

Gruplar arasında 0. gündeki ağırlıklar karşılaştırıldığında BOTOX grubu, losartan (p=0,034) ve rapamisin (p=0,039) gruplarına göre istatistiksel olarak farklılık gösterdi. 14. gün ağırlıkları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel oranda farklılık gözlenmedi.

4.2. Histolojik Bulgular

Sıçan üretralarından elde edilen üretra kesitleri histokimyasal metotlar ile boyandı. Üretra kesitlerinde gözlemlenen; submukozal hemoraji, epitelyal dejenerasyon, vasküler konjesyon, inflamasyon ve fibrozis durumları 4 kategoriye (hiç, zayıf, orta, yüksek) ayrılarak sınıflandırıldı. Grupların üretra kesitlerinin histolojik sınıflama verileri Tablo 13'te özetlendi. Kesit alma ve boyama esnasında bazı hayvanların dokularında oluşan teknik nedenlerden dolayı değerlendirme net yapılamadığından her gruptan 8 adet hayvan histolojik değerlendirmeye alındı.

Tablo 13. Histolojik bilgilerin, gruplara göre karşılaştırması

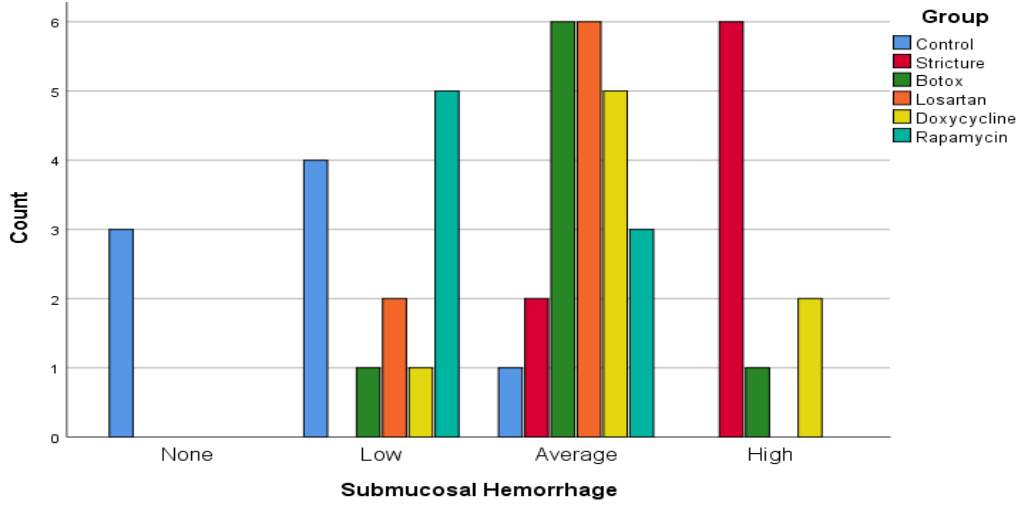
		Kontrol	Darlık	Botox	Losartan	Doksisiklin	Rapamisin	
		n (%)						p
Submukozal Hemoraji	Hiç	3 (37,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	<0,001*
	Zayıf	4 (50,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	2 (25,0)	1 (12,5)	5 (62,5)	
	Orta	1 (12,5)	2 (25,0)	6 (75,0)	6 (75,0)	5 (62,5)	3 (37,5)	
	Yüksek	0 (0,0)	6 (75,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	
Epitelial Dejenerasyon	Hiç	4 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	<0,001*
	Zayıf	4 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	4 (50,0)	
	Orta	0 (0,0)	1 (12,5)	6 (75,0)	5 (62,5)	6 (75,0)	4 (50,0)	
	Yüksek	0 (0,0)	7 (87,5)	2 (25,0)	1 (12,5)	2 (25,0)	0 (0,0)	
Vasküler Konjesyon	Hiç	2 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	2 (25,0)	<0,001*
	Zayıf	6 (75,0)	0 (0,0)	5 (62,5)	7 (87,5)	2 (25,0)	6 (75,0)	
	Orta	0 (0,0)	5 (62,5)	3 (37,5)	0 (0,0)	4 (50,0)	0 (0,0)	
	Yüksek	0 (0,0)	3 (37,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	
İnflamasyon	Hiç	6 (75,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	6 (75,0)	2 (25)	6 (75,0)	<0,001*
	Zayıf	2 (25,0)	3 (37,5)	6 (75,0)	2 (25,0)	6 (75,0)	2 (25,0)	
	Orta	0 (0,0)	5 (62,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Fibrozis	Hiç	5 (62,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	<0,001*
	Zayıf	3 (37,5)	0 (0,0)	5 (62,5)	5 (62,5)	4 (50,0)	6 (75,0)	
	Orta	0 (0,0)	2 (25,0)	3 (37,5)	1 (12,5)	3 (37,5)	0 (0,0)	
	Yüksek	0 (0,0)	6 (75,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	

*:

Ki Kare testi

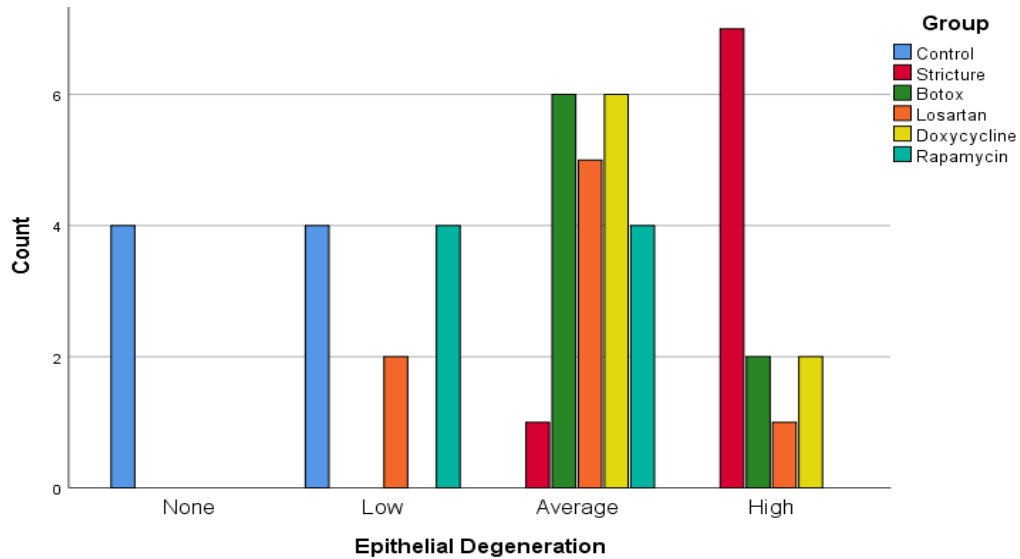
p<0,05

Kontrol, losartan ve rapamisin gruplarında yüksek düzeyde submukozal hemoraji içeren, üretra kesit alanı gözlemlenmedi. Darlık, Doksisiklin ve BOTOX gruplarında ise yüksek düzeyde submukozal hemoraji görülme oranı sırası ile %75 (n:6), % 25 (n:2) ve %12,5 (n:1) idi. Gruplara göre submukozal hemoraji oranları ve dağılımı Tablo 13 ve Şekil 5'te özetlendi. Submukozal hemoroji açısından gruplar arasında istatistiki olarak %57,7'lik bir bağ ve arada anlamlı bir fark vardı (p<0,001) ve bu fark darlık grubundan kaynaklanmakta idi.



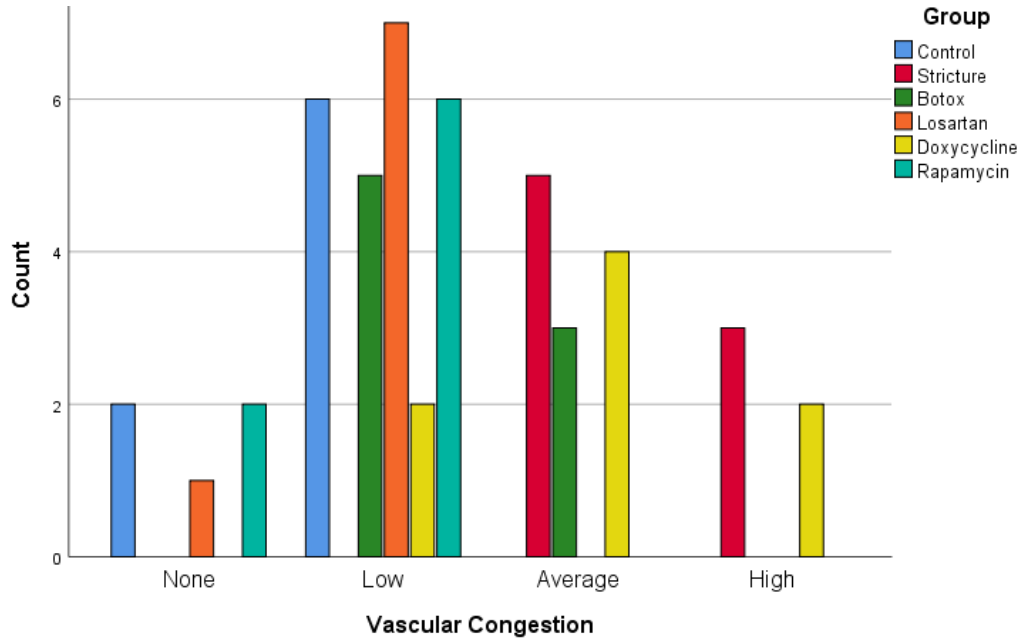
Şekil 5. Submukozaal hemoraji düzeylerinin gruplara göre dağılımı
(count: sayı, none: hiç, low: zayıf, average: orta, high: yüksek)

Darlık, BOTOX, Doksisisiklin ve Losartan gruplarında yüksek derecede epitelyal dejenerasyon görülme oranı sırası ile %87,5 (n:7), % 25 (n:2), % 25 (n:2) ve %12,5 (n:1) idi. Gruplara göre epitelyal dejenerasyon görülme oranları ve dağılımı Tablo 13 ve Şekil 6'da özetlendi. Epitelyal dejenerasyon açısından gruplar arasında istatistiki olarak %63,3'lik bir bağ ve arada anlamlı bir fark vardı ($p<0.001$) ve bu fark darlık grubundan kaynaklanmakta idi.



Şekil 6. Epitelyal dejenerasyon düzeylerinin gruplara göre dağılımı
(count: sayı, none: hiç, low: zayıf, average: orta, high: yüksek)

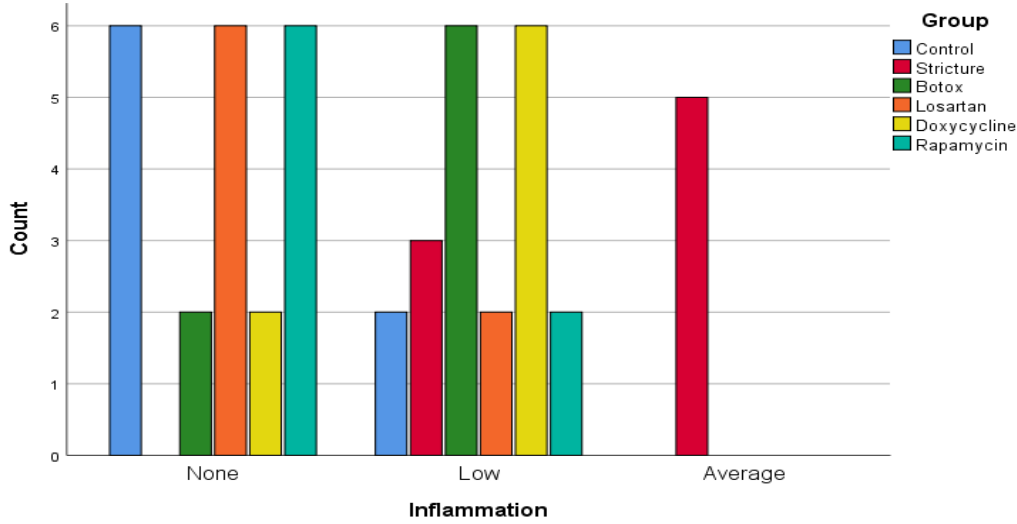
Darlık ve Doksisisiklin gruplarında yüksek düzeyde vasküler konjesyon görülme oranı sırası ile %37,5 (n:3) ve %25 (n:2) idi. Kontrol, BOTOX, Losartan ve Rapamisin gruplarında ise yüksek düzeyde vasküler konjesyon görülen sıçan bulunmamakta idi. Gruplara göre vasküler konjesyon görülme oranları ve dağılımı Tablo 13 ve Şekil 7’de özetlendi. Vasküler konjesyon açısından gruplar arasında istatistiki olarak %51,4’lik bir bağ ve arada anlamlı bir fark vardı ($p<0.001$) ve bu fark darlık grubundan kaynaklanmakta idi.



Şekil 7. Vasküler konjesyon düzeylerinin gruplara göre dağılımı

(count: sayı, none: hiç, low: zayıf, average: orta, high: yüksek)

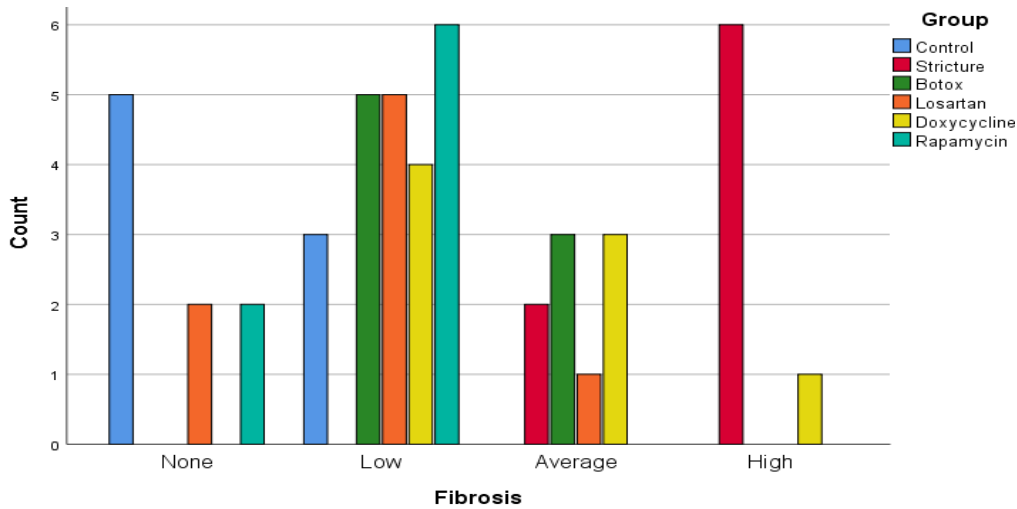
Grupların hiç birinde yüksek derecede inflamasyon bulgusu gözlemlenmedi. Orta derece inflamasyon sadece %62,5’lik (n:5) oran ile Darlık grubunda gözlemlendi. Gruplara göre inflamasyon görülme oranları ve dağılımı Tablo 13 ve Şekil 8’de özetlendi. İnflamasyon açısından gruplar arasında istatistiki olarak %64,7’lük bir bağ ve arada anlamlı bir fark vardı ($p<0.001$) ve bu fark darlık grubundan kaynaklanmakta idi.



Şekil 8. İnflamasyon düzeylerinin gruplara göre dağılımı

(count: sayı, none: hiç, low: zayıf, average: orta, high: yüksek)

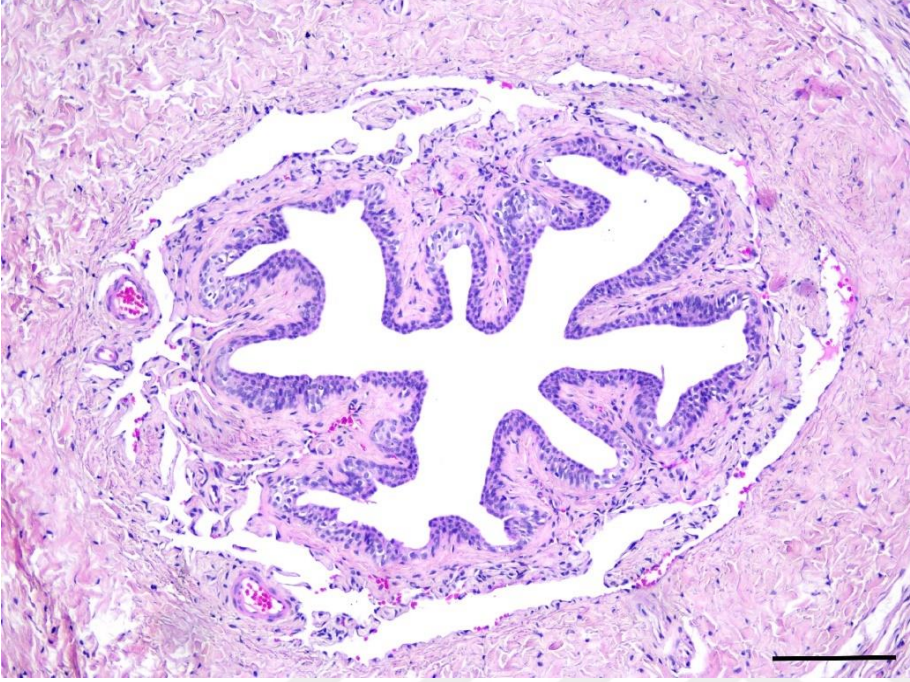
Darlık ve Doksisisiklin gruplarında yüksek düzeyde fibrozis görülme oranı sırası ile %75 (n:6) ve %12,5 (n:1) idi. Kontrol, BOTOX, Losartan ve Rapamisin gruplarında ise yüksek düzeyde fibrozis görülen sıçan bulunmamakta idi. Gruplara göre fibrozis görülme oranları ve dağılımları Tablo 13 ve Şekil 9’da özetlendi. Fibrozis açısından gruplar arasında istatistiki olarak %58,9’lik bir bağ ve arada anlamlı bir fark vardı ($p < 0.001$) ve bu fark darlık grubundan kaynaklanmakta idi.



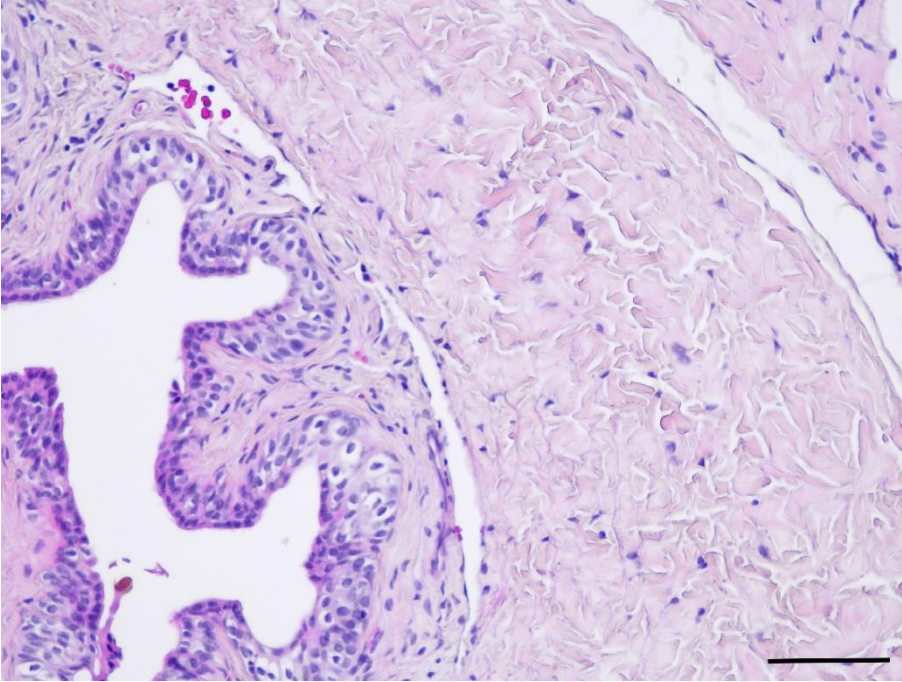
Şekil 9. Fibrozis düzeylerinin gruplara göre dağılımı

(count: sayı, none: hiç, low: zayıf, average: orta, high: yüksek)

Kontrol grubunun H-E boyalı üretral kesitleri incelendiğinde, transizyonel epitel bütünlüğü ve yapısı korunmuş, normal bir üretral mukoza dokusunun etrafında normal dağılıma sahip kollajen birikimleri ve düz kas hücrelerinin olduğu ve vasküler yapıların sağlam olduğu gözlemlendi (Resim 6,7).

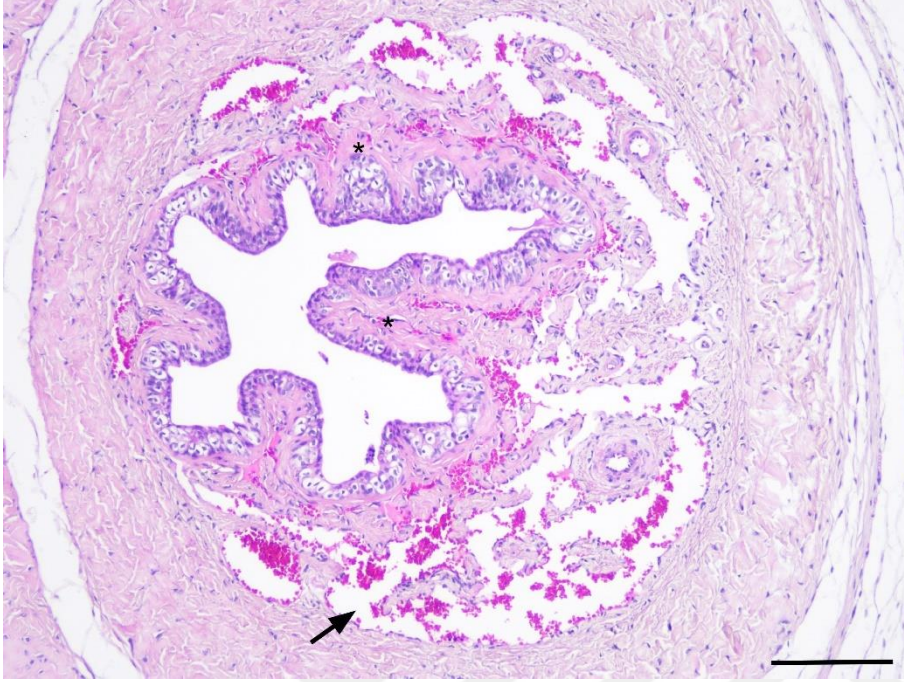


Resim 6. Kontrol grubu üretra dokusu. Normal histolojik görünümde. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 μ m

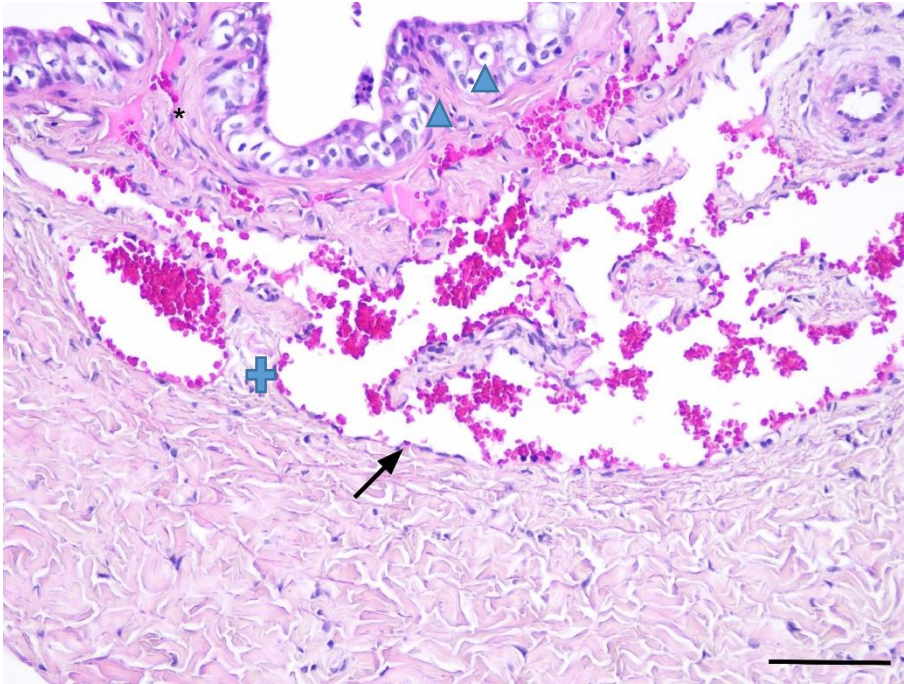


Resim 7. Kontrol grubu üretra dokusu. Normal histolojik görünümde. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m

Darlık grubu: yaygın submukozal hemoraji alanları, yoğun vasküler konjesyon, epitelde dejenerasyon (çekirdek yapısı bozulmuş, stoplazmada vakuolleşme, epitel bütünlüğü yok), fibrozis ve orta derece inflamasyonun olduğu tespit edildi (Resim 8,9).

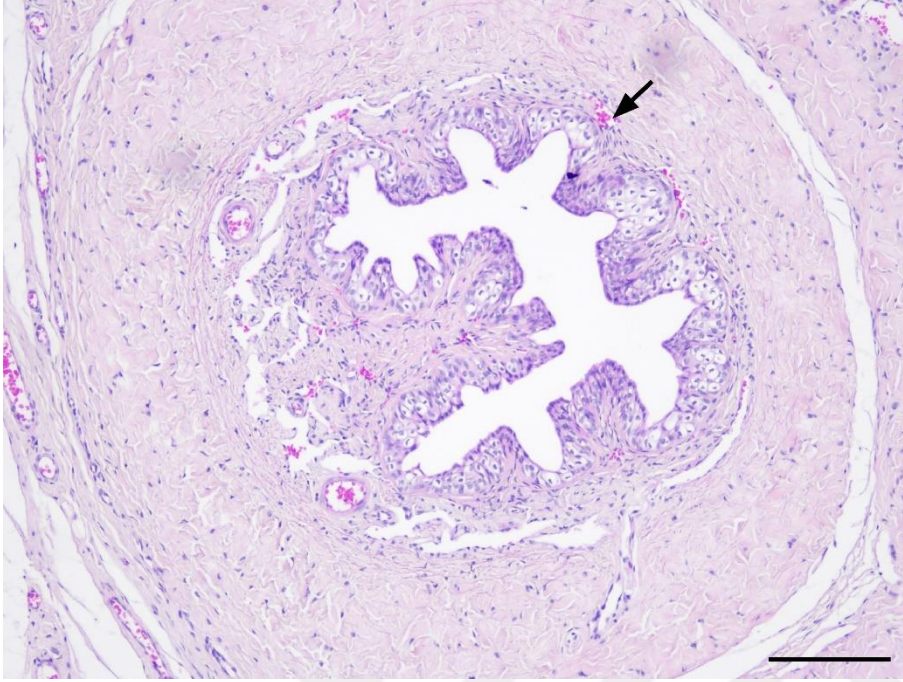


Resim 8. Darlık grubu üretra dokusu. Yaygın submukozal hemoraji alanlar (ok), vasküler konjesyon, fibrozis (yıldız) ve epitelde dejenerasyon bulguları. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm

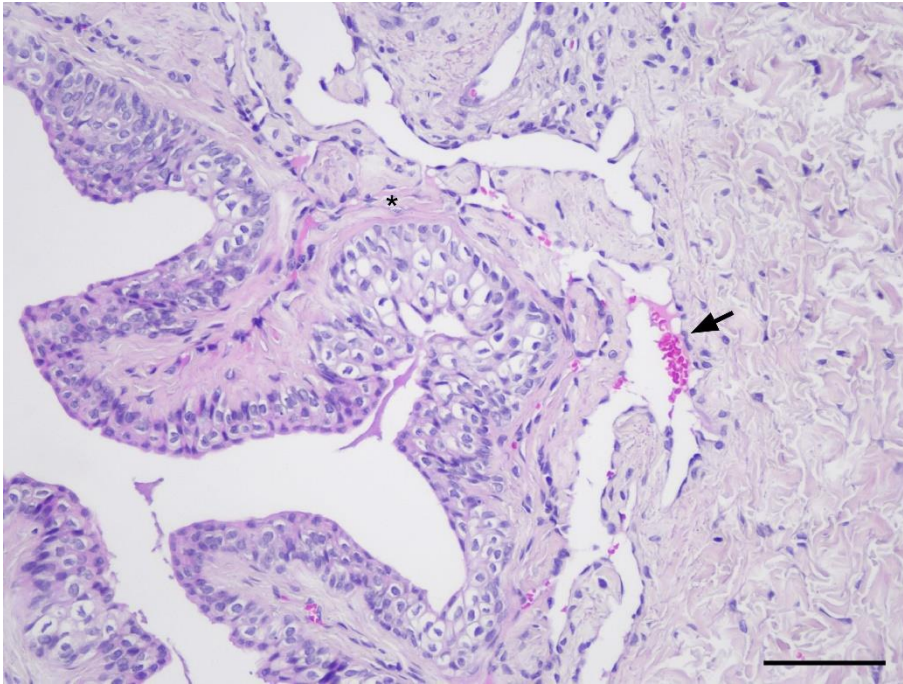


Resim 9. Darlık grubu üretra dokusu. Yaygın submukozal hemoraji alanları (ok), vasküler konjesyon (artı), fibrozis (yıldız) ve epitelde dejenerasyon (üçgen) bulguları. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm

Rapamisin grubu; darlık grubuna göre kıyaslanarak incelendiğinde, submukozal hemoraji alanlarında, vasküler konjesyonunda, epitel dejenerasyonunda, inflamasyonda ve fibrozisde belirgin azalma olduğu gözlemlendi (Resim 10,11).

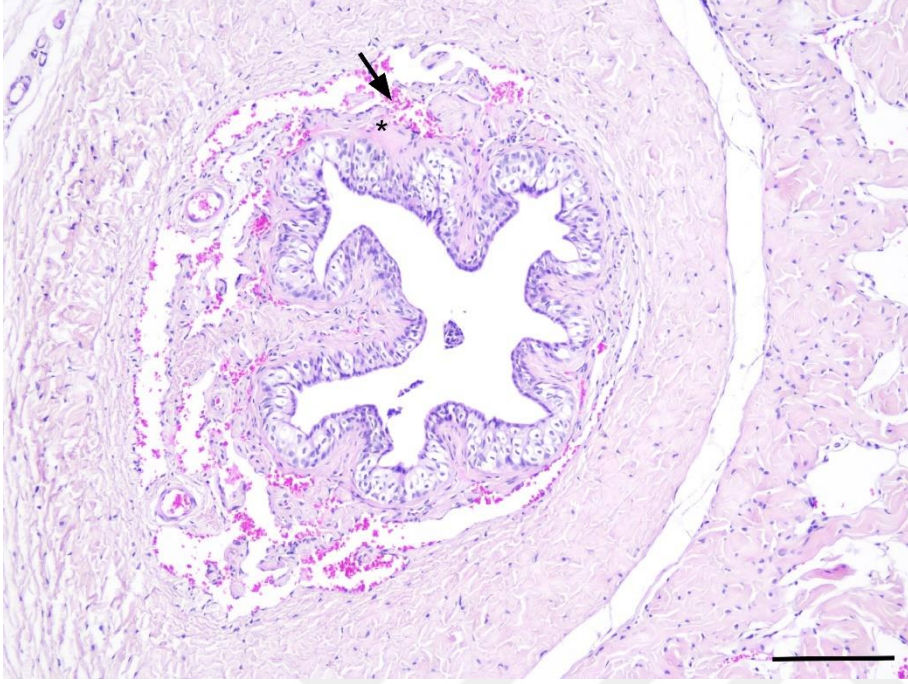


Resim 10. Rapamisin grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji (ok) ve diğer histopatolojik bulgular darlık grubuna kıyasla düşük düzeyde. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm

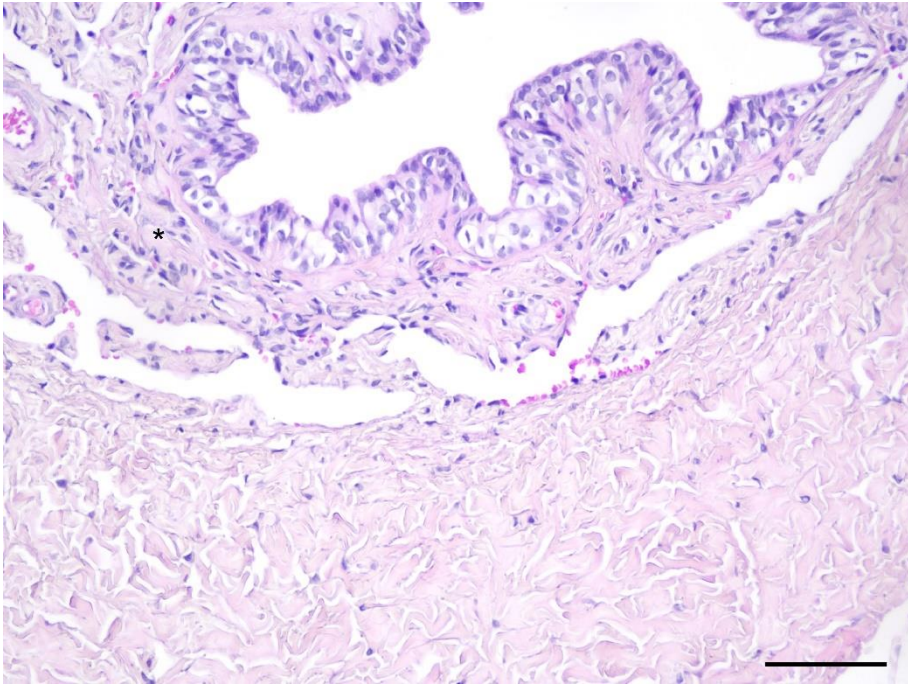


Resim 11. Rapamisin grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji (ok), fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgularda darlık grubuna kıyasla belirgin azalma. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm

Losartan grubun; darlık grubuna göre kıyaslanarak incelendiğinde, submukozal hemoraji alanlarında, vasküler konjesyonda, inflamasyonda ve fibrozisde belirgin azalma olduğu ve epitel dejenerasyonunda ise orta düzey bir azalma olduğu gözlemlendi (Resim 12,13).

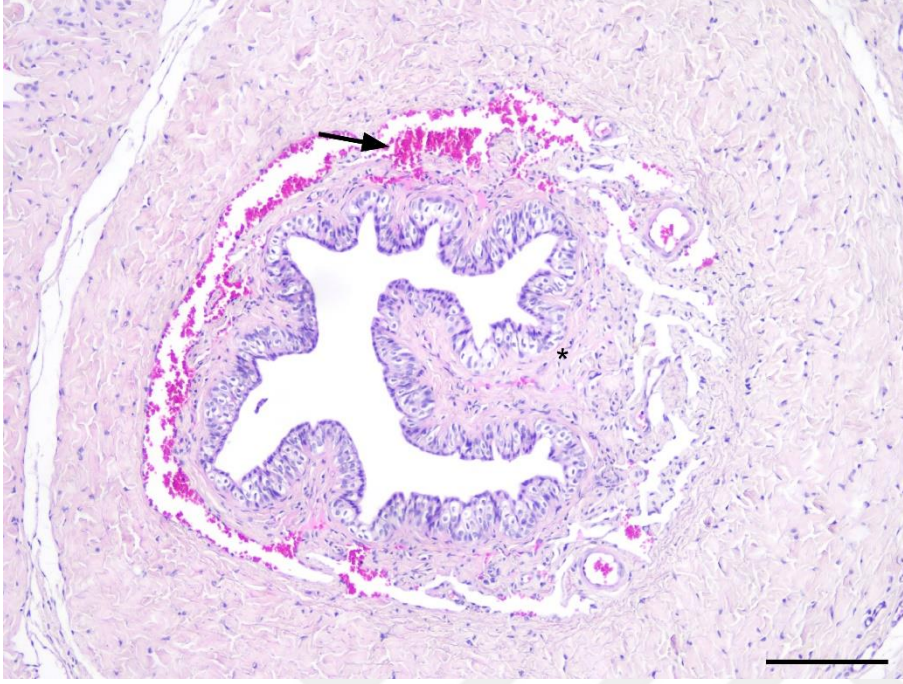


Resim 12. Losartan grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji(ok), fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgularda darlık grubuna kıyasla belirgin azalma. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm

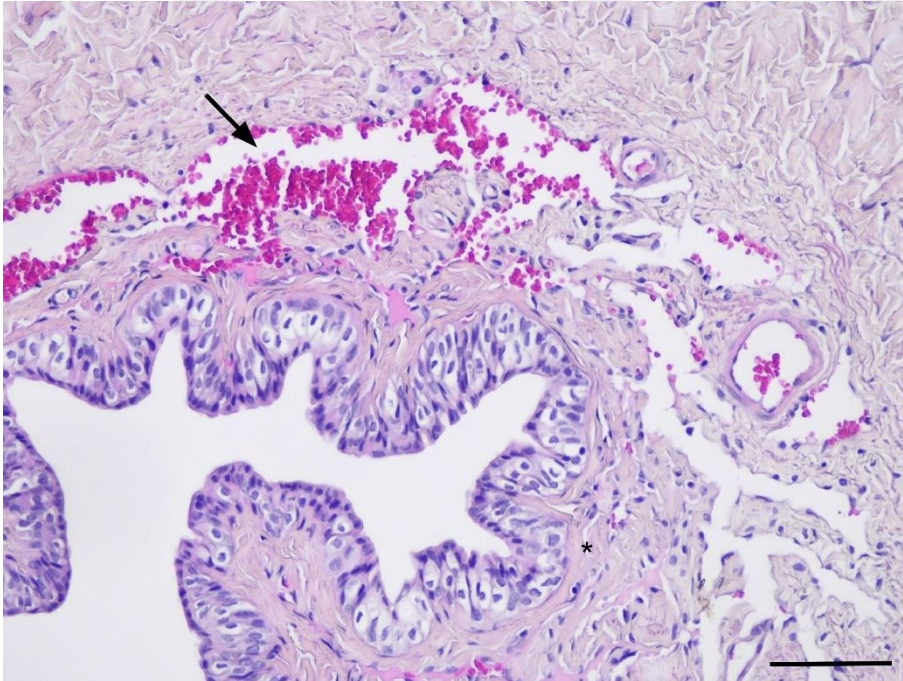


Resim 13. Losartan grubu üretra dokusu. Fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgularda darlık grubuna kıyasla belirgin azalma. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm

Doksisiklin grubu; darlık grubuna göre kıyaslanarak incelendiğinde, submukozal hemoraji alanlarında, epitel dejenerasyonunda, vasküler konjesyonda ve fibroziste orta düzeyde bir azalma olduğu ve inflamasyonda ise belirgin azalma olduğu gözlemlendi (Resim 14,15).

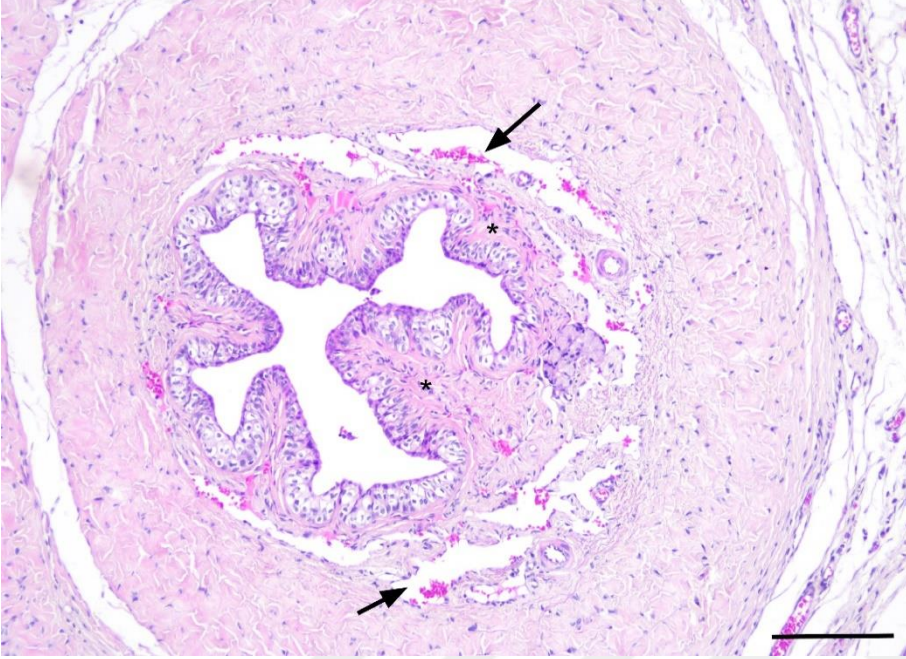


Resim 14. Doksisiklin grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji(ok), fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgularda darlık grubuna kıyasla düşük oranda azalma. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm

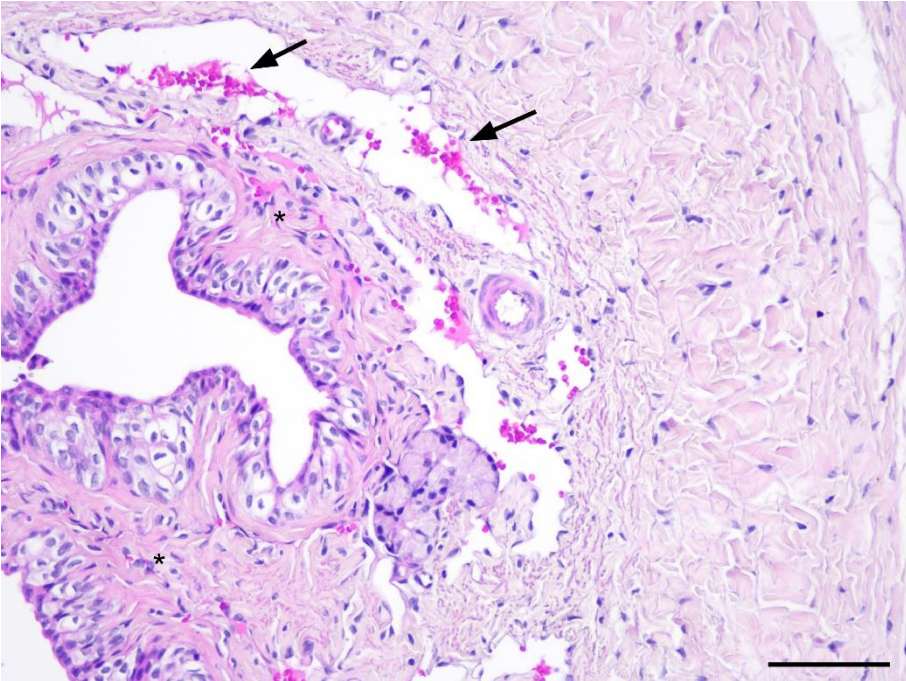


Resim 15. Doksisiklin grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji(ok) ve diğer histopatolojik bulgularda darlık grubuna kıyasla düşük oranda azalma. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm

BOTOX grubu; darlık grubuna göre kıyaslanarak incelendiğinde, vasküler konjesyonda, inflamasyonda ve fibrozisde belirgin azalma olduğu ve submukozal hemorajide orta düzeyde bir azalma olduğu ve epitel dejenerasyonunda ise hafif bir azalma olduğu gözlemlendi (Resim 16,17).

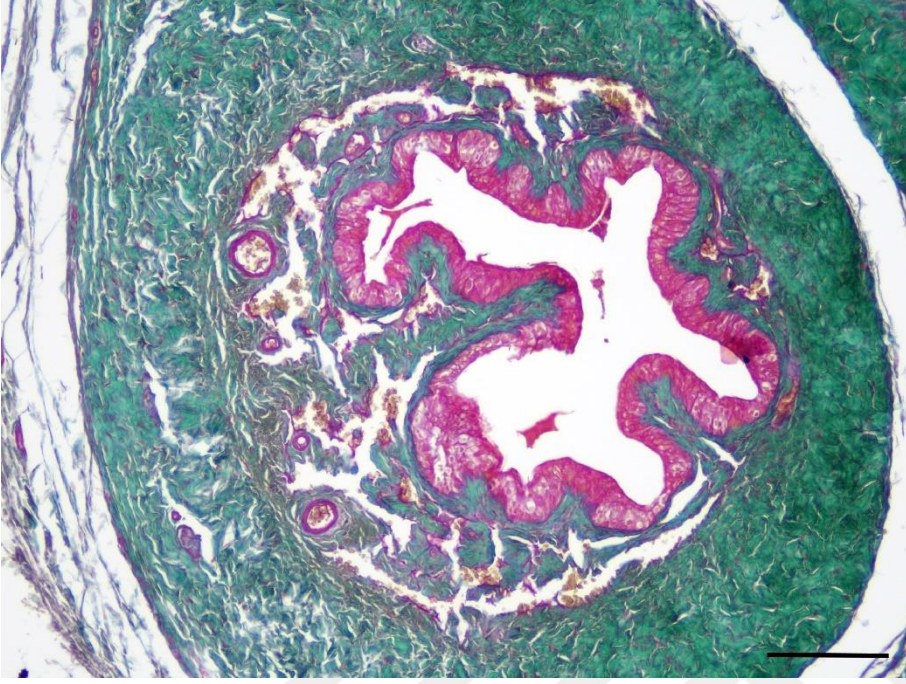


Resim 16. Botox grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji(ok), fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgularda darlık grubuna kıyasla düşük oranda azalma. H-E, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm

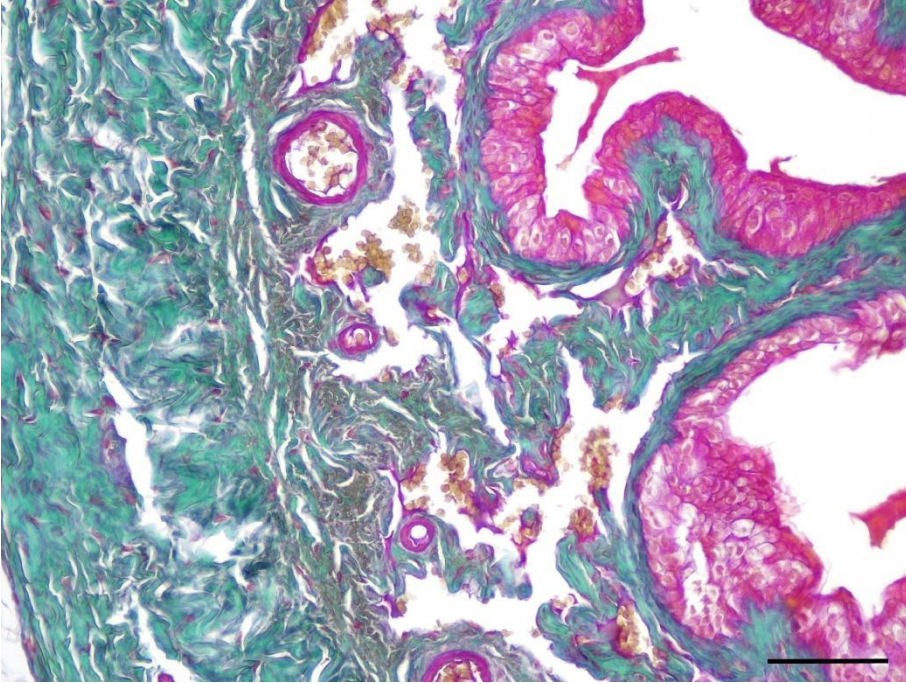


Resim 17. Botox grubu üretra dokusu. Submukozal hemoraji(ok), fibrozis (yıldız) ve diğer histopatolojik bulgularda darlık grubuna kıyasla düşük oranda azalma. H-E, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm

Masson Trikrom boyası, bağ dokusunu yeşil renge boyayan dolayısıyla fibrozis oluşumunu göstermede etkili olan bir boyama yöntemidir. Kontrol grubunun Masson Trikrom kesitlerinde normal dağılıma sahip kollajen lifleri gözlemlenmektedir. (Resim:18,19)

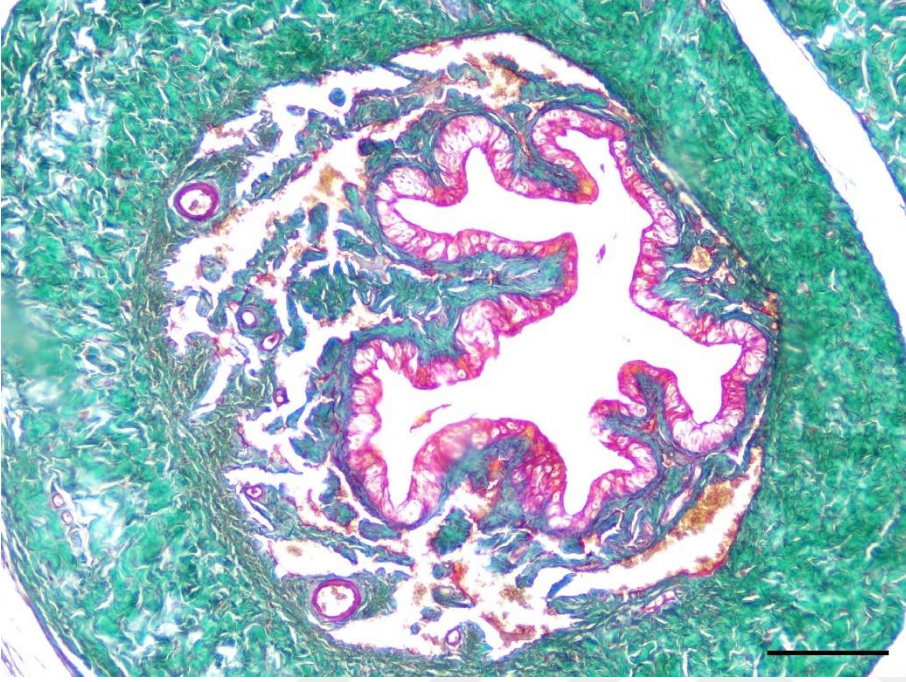


Resim 18. Kontrol grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μ m

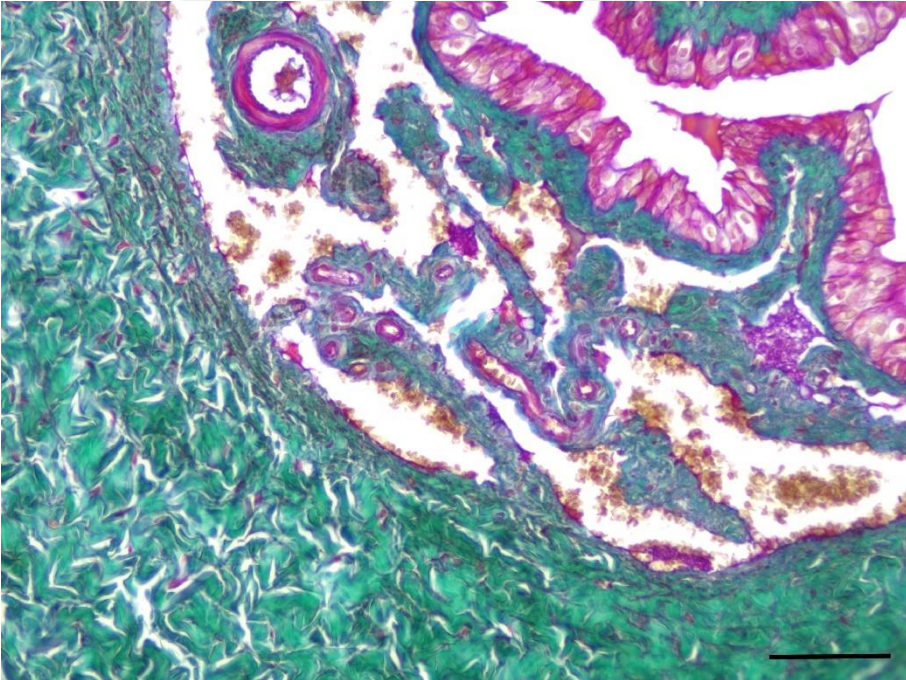


Resim 19. Kontrol grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m

Darlık drubunun kesitleri Masson Trikrom boyama ile incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla belirgin fibrozis olduğu gözlenmektedir. (Resim:20,21)

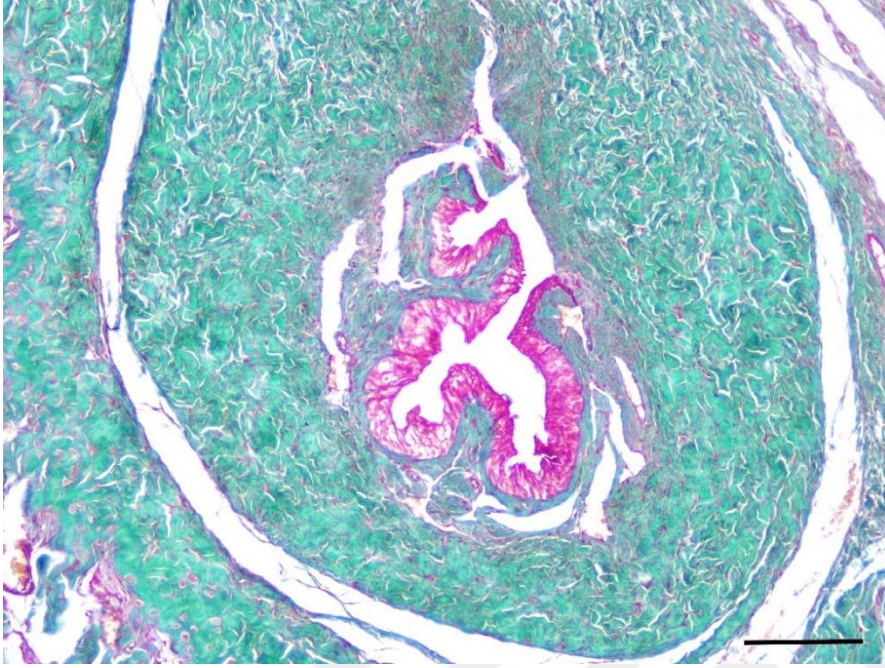


Resim 20. Darlık grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 µm

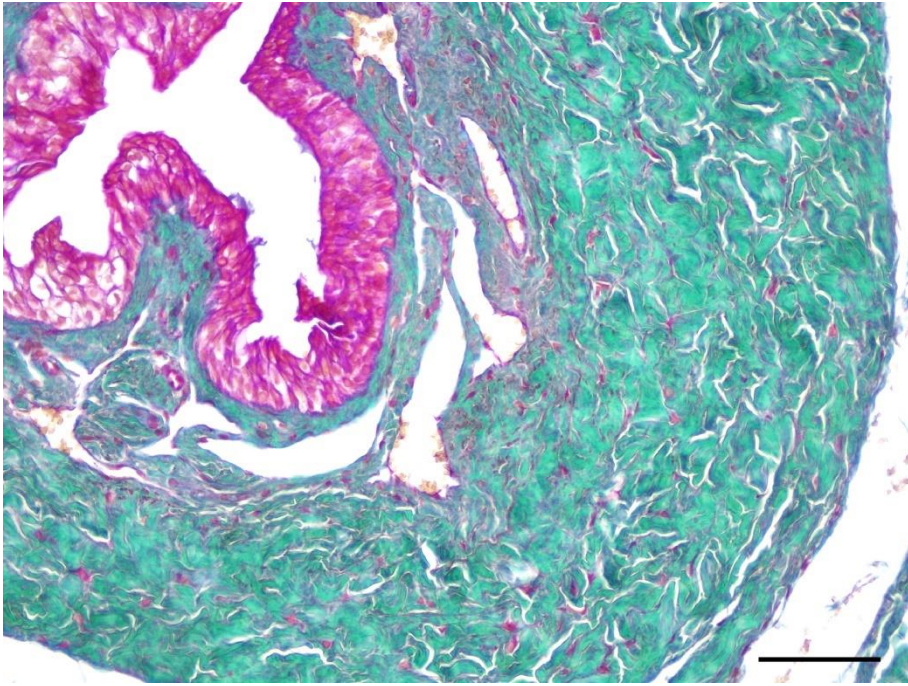


Resim 21. Darlık grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 µm

Rapamisin grubunun kesitleri Masson Trikrom boyama ile incelendiğinde darlık grubuna kıyasla fibroziste belirgin azalma olduğu gözlenmektedir. (Resim:22,23)



Resim 22. Rapamisin grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μ m

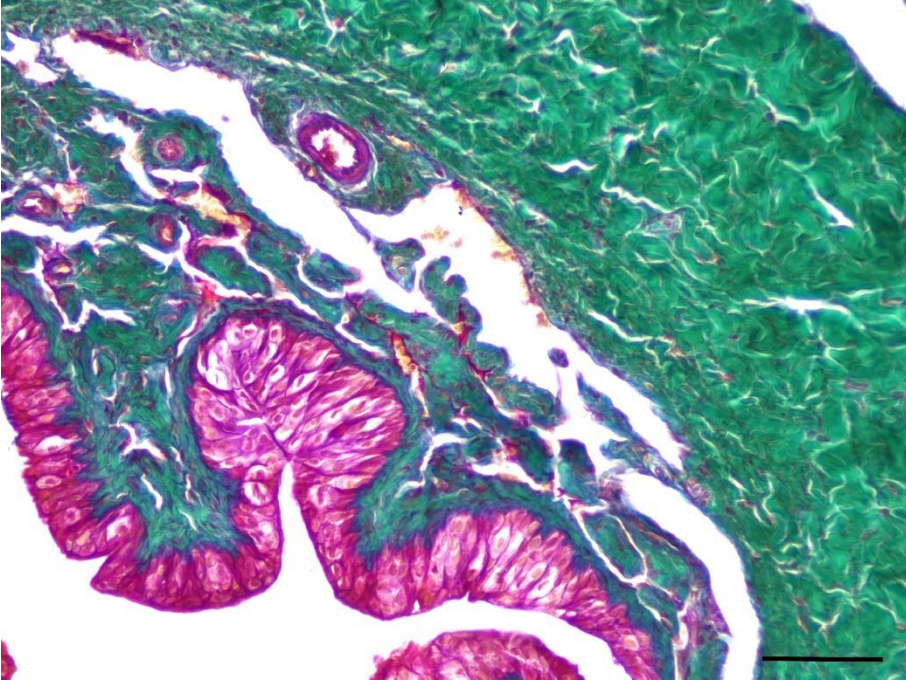


Resim 23. Rapamisin grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m

Losartan grubunun kesitleri Masson Trikrom boyama ile incelendiğinde darlık grubuna kıyasla fibroziste belirgin azalma olduğu gözlenmektedir. (Resim:24,25)



Resim 24. Losartan grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μ m

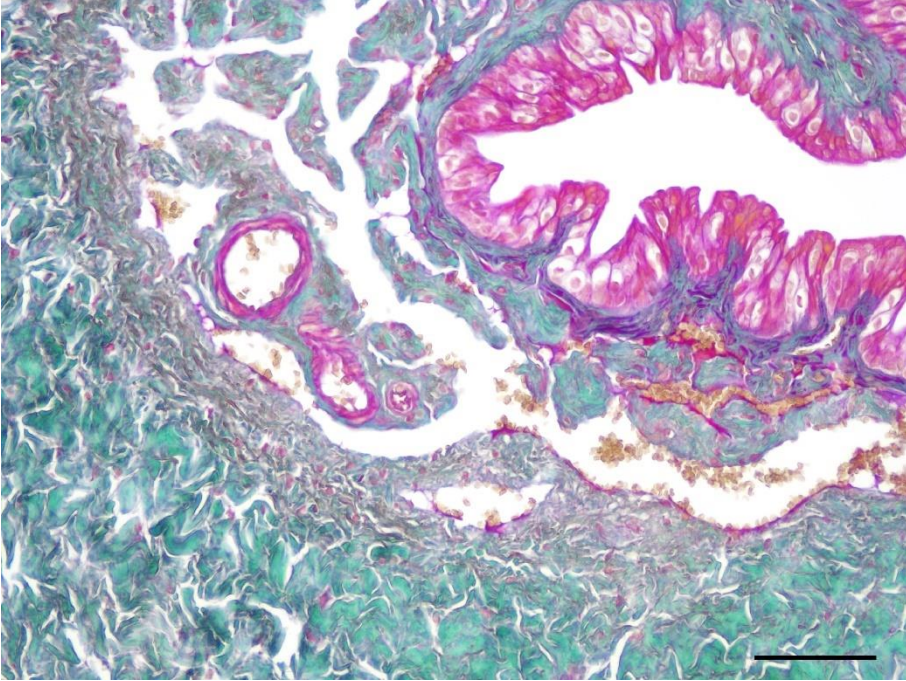


Resim 25. Losartan grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m

Doksisiklin grubunun kesitleri Masson Trikrom boyama ile incelendiğinde darlık grubuna kıyasla fibroziste orta düzeyde azalma olduğu gözlenmektedir. (Resim:26,27)

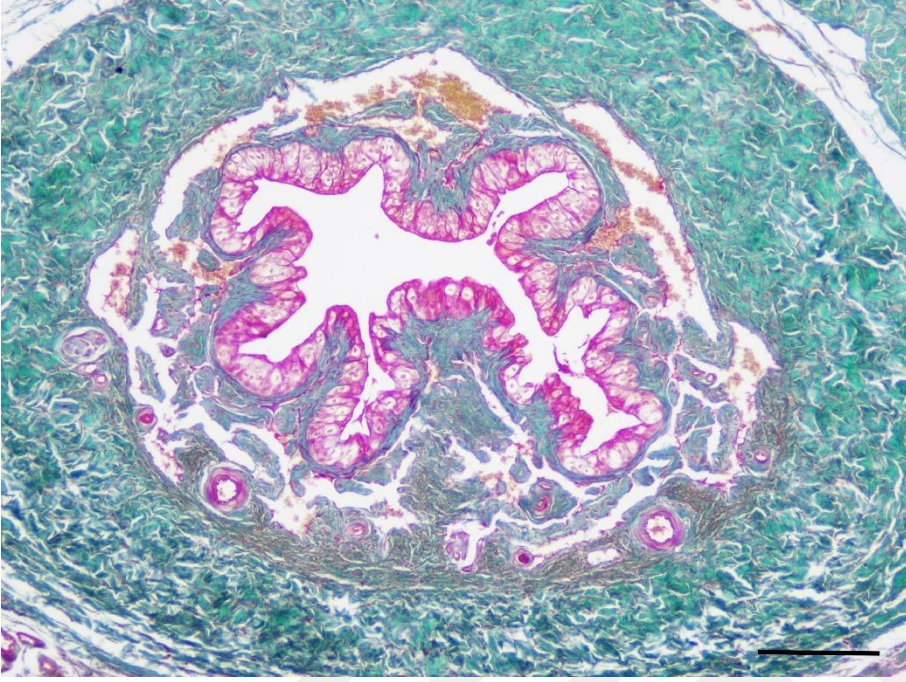


Resim 26. Doksisiklin grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μ m

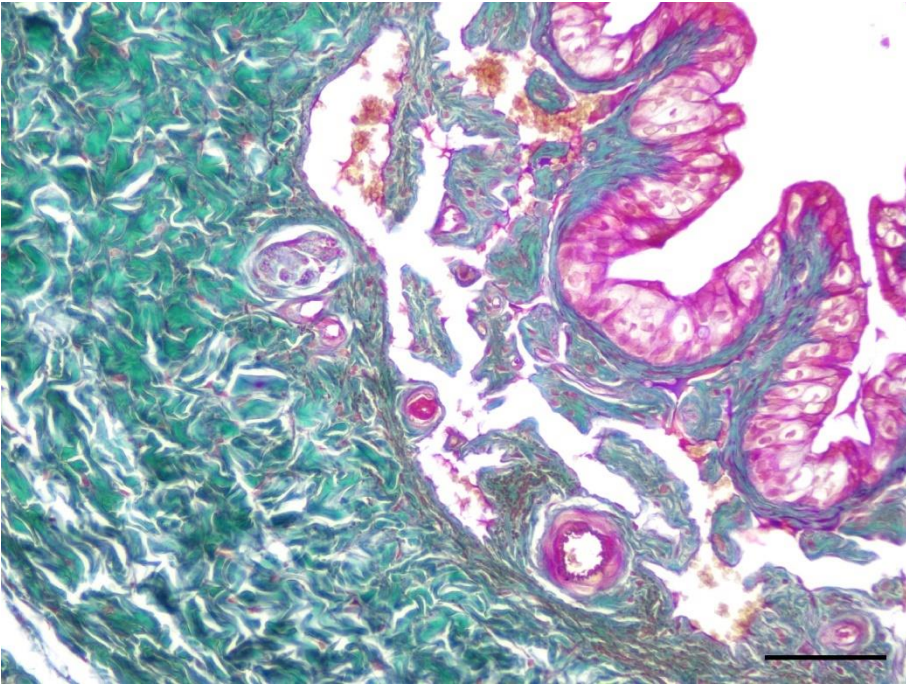


Resim 27. Doksisiklin grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m

BOTOX grubunun kesitleri Masson Trikrom boyama ile incelendiğinde darlık grubuna kıyasla fibroziste belirgin azalma olduğu gözlenmektedir. (Resim:28,29)

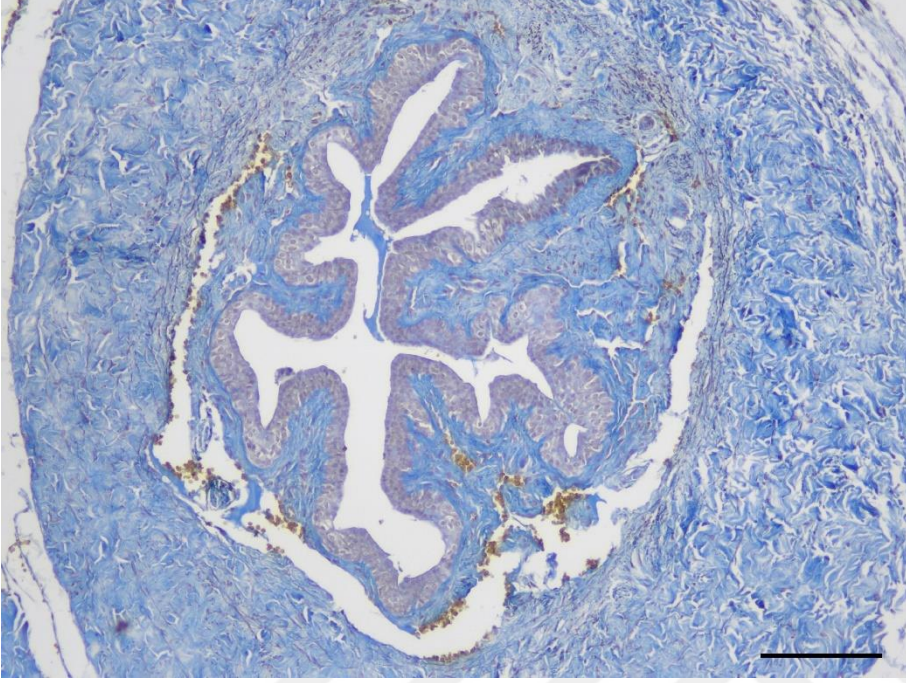


Resim 28. Botox grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μ m

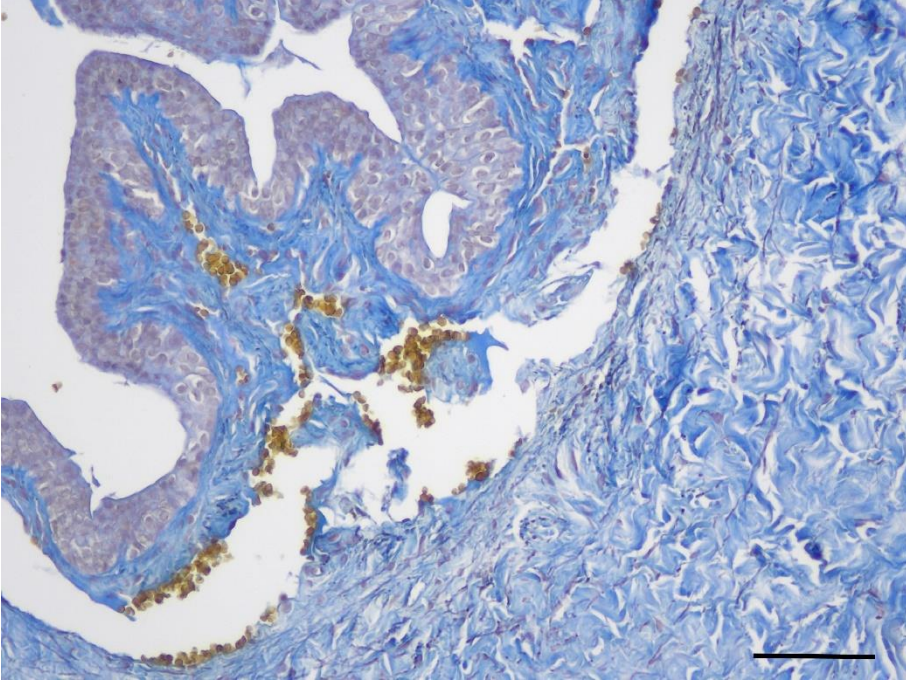


Resim 29. Botox grubu üretra dokusu. Masson Trikrom boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m

MSB boyası, bağ dokusunu mavi renge boyayan dolayısıyla fibrozis oluşumunu göstermede etkili olan bir boyama yöntemidir. Kontrol grubunun kesitlerinin MSB boyamasında normal dağılıma sahip kollajen lifleri gözlemlenmektedir. (Resim:30,31)

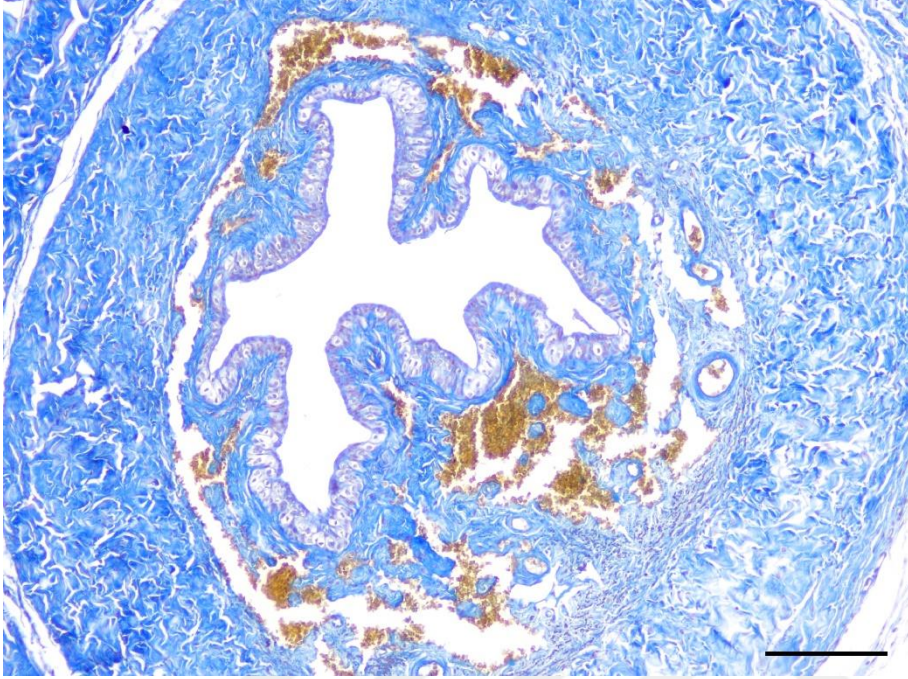


Resim 30. Sham Kontrol grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μ m

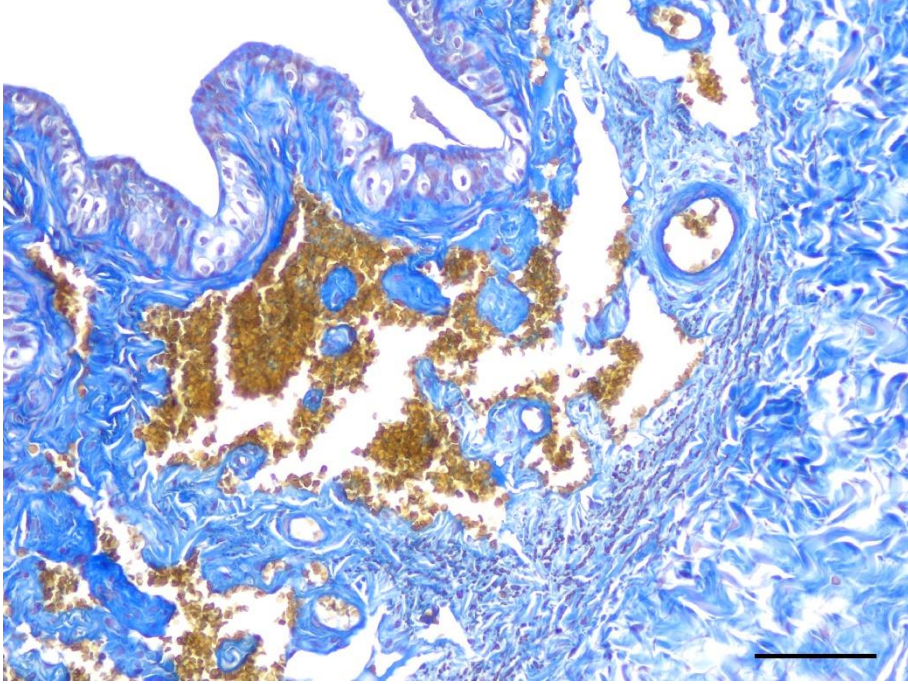


Resim 31. Sham Kontrol grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m

Darlık grubunun kesitleri MSB boyama ile incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla belirgin fibrozis olduğu gözlenmektedir. (Resim:32,33)

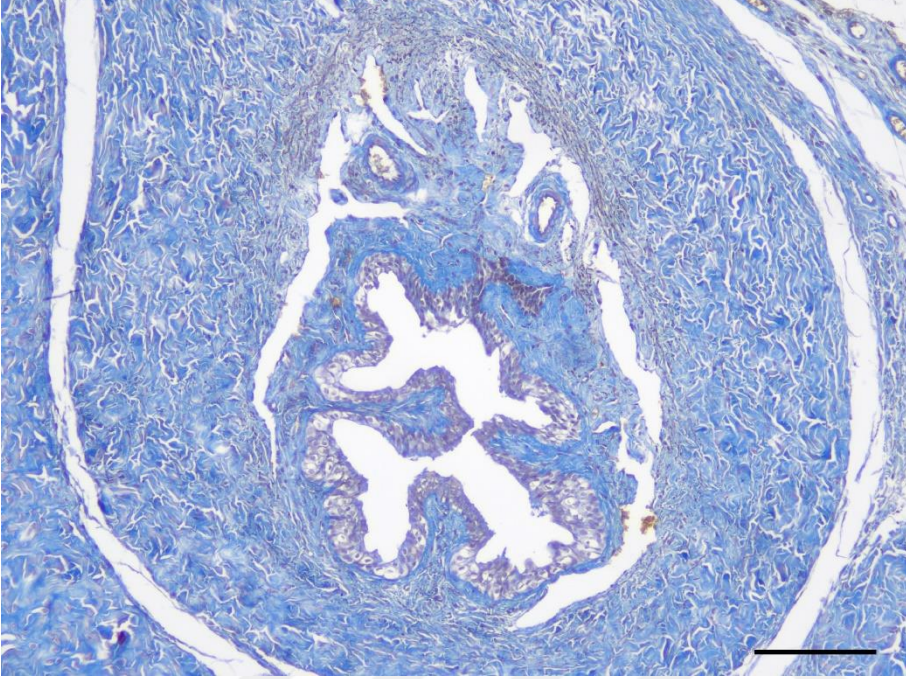


Resim 32. Darlık grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μ m

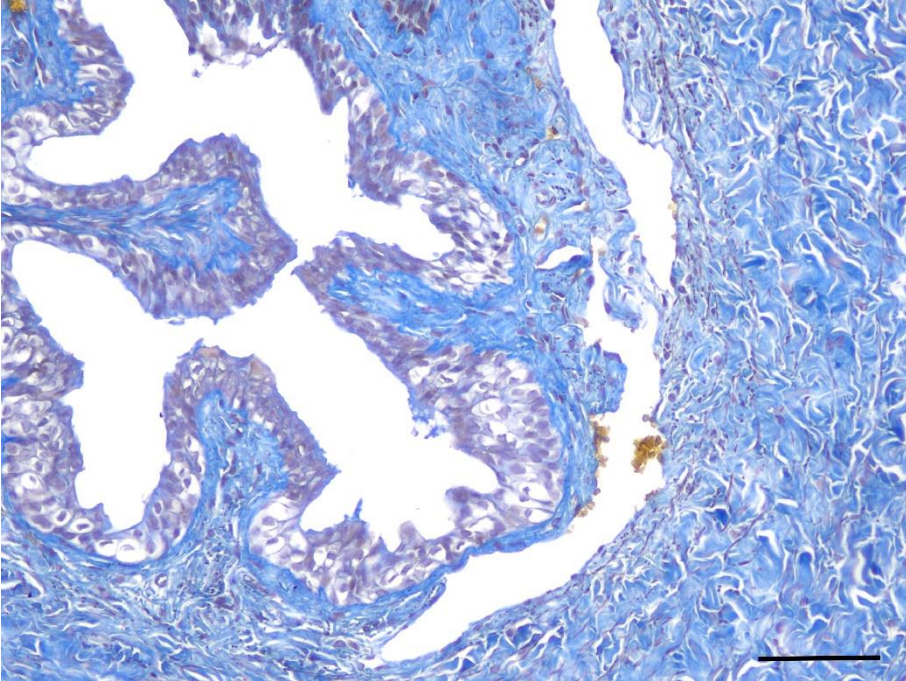


Resim 33. Darlık grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m

Rapamisin grubunun kesitleri MBS boyama ile incelendiğinde darlık grubuna kıyasla fibroziste belirgin azalma olduğu gözlenmektedir. (Resim:34,35)

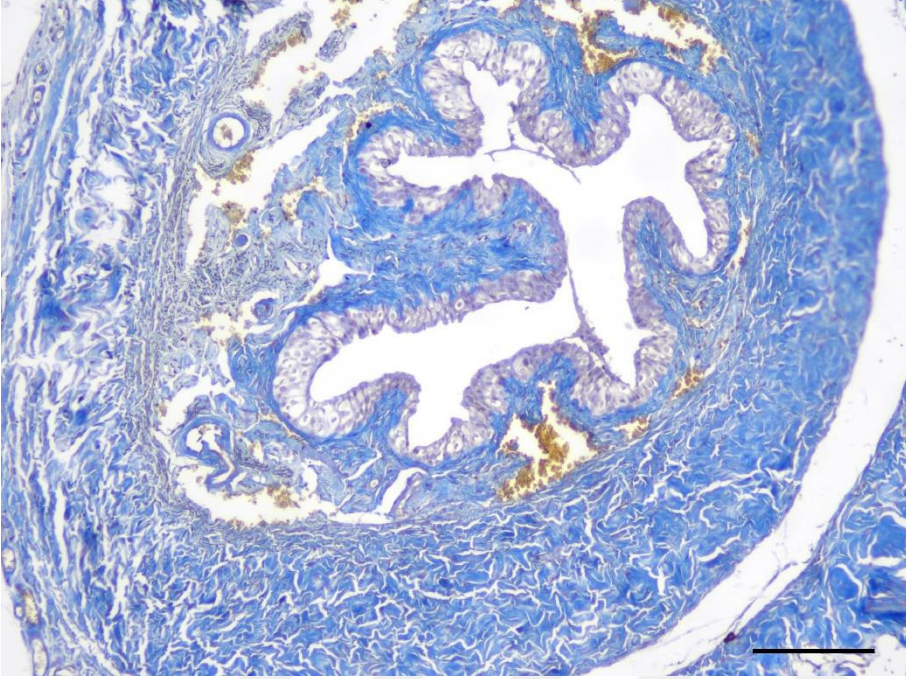


Resim 34. Rapamisin grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μm

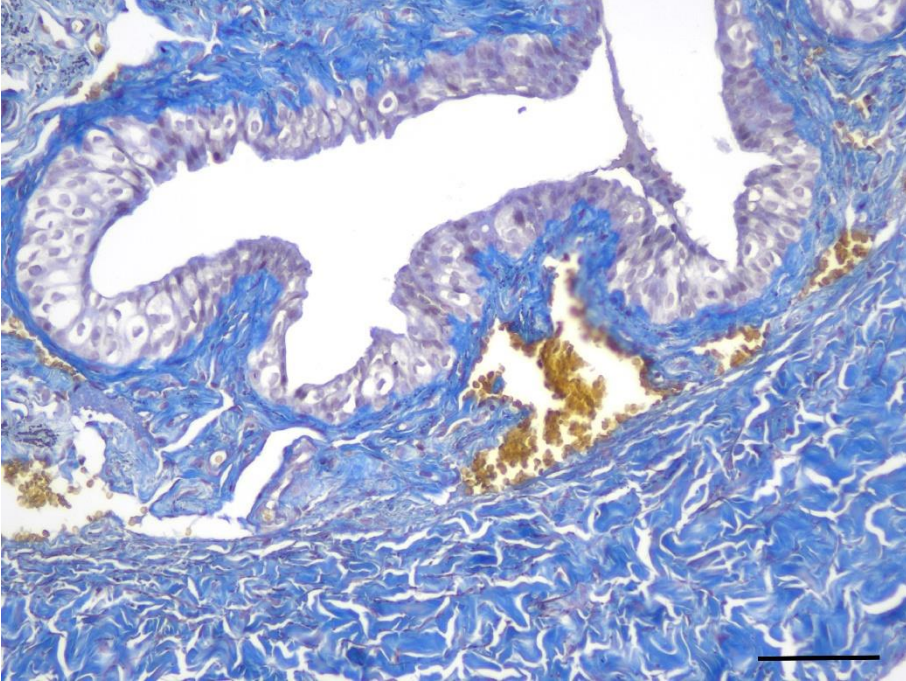


Resim 35. Rapamisin grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μm

Losartan grubunun kesitleri MBS boyama ile incelendiğinde darlık grubuna kıyasla fibroziste belirgin azalma olduğu gözlenmektedir. (Resim:36,37)

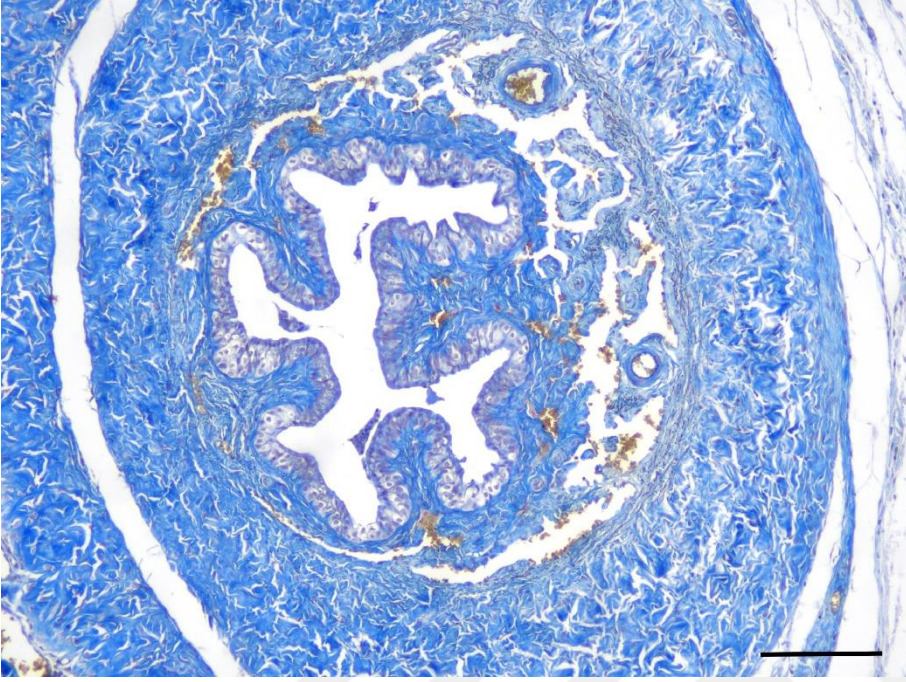


Resim 36. Losartan grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μ m

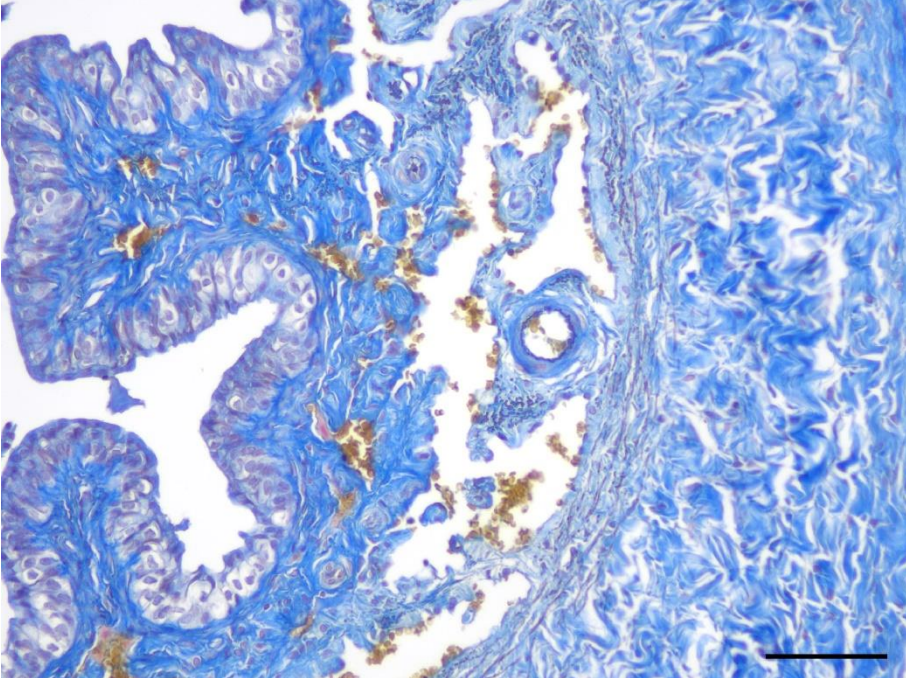


Resim 37. Losartan grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m

Doksisiklin grubunun kesitleri MBS boyama ile incelendiğinde darlık grubuna kıyasla fibroziste orta düzeyde azalma olduğu gözlenmektedir. (Resim:38,39)

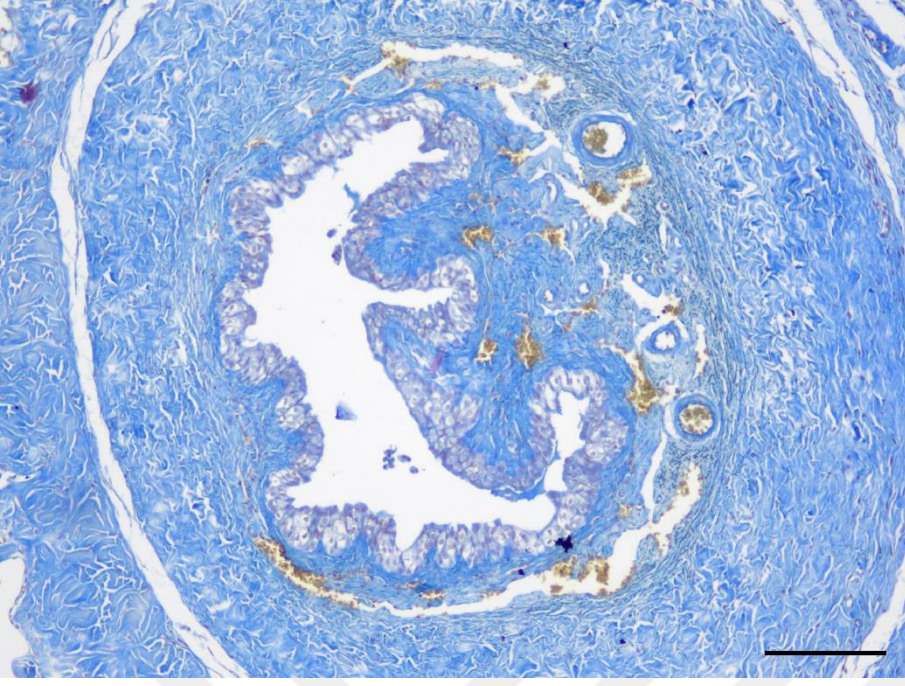


Resim 38. Doksisiklin grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μ m

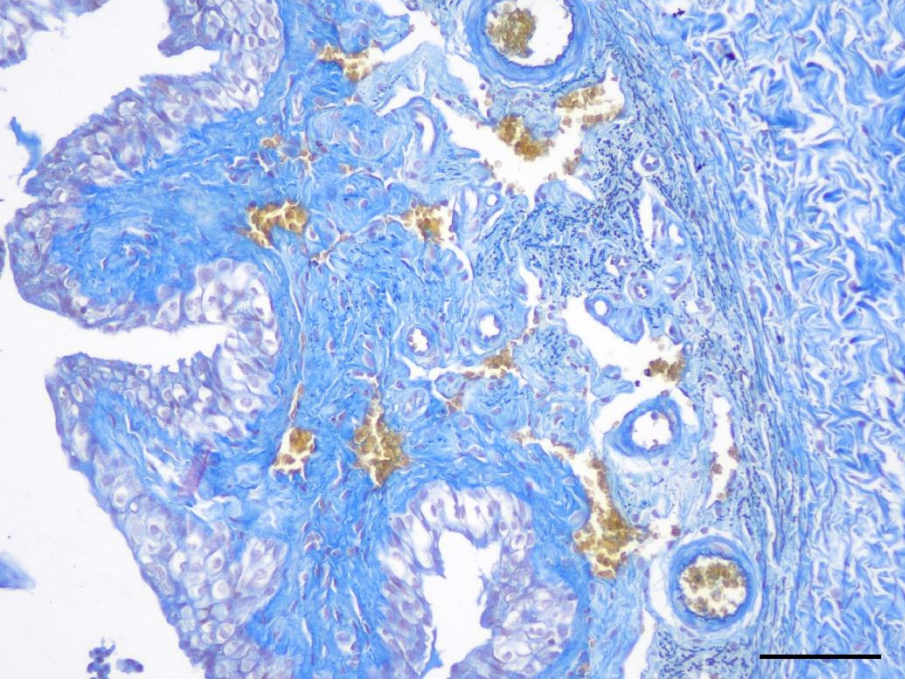


Resim 39. Doksisiklin grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m

BOTOX grubunun kesitleri MBS boyama ile incelendiğinde darlık grubuna kıyasla fibroziste belirgin azalma olduğu gözlenmektedir. (Resim:40,41)



Resim 40. Botox grubu üretra dokusu. MSB boyama, x10, ölçüm çubuğu = 160 μ m



Resim 41. Botox grubu üretra dokusu. MSB boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m

4.3. İmmünohistokimyasal bulgular

Kesit alma ve boyama esnasında bazı hayvanların dokularında oluşan teknik nedenlerden dolayı değerlendirme net yapılamadığından her gruptan 8 adet hayvan immünohistokimyasal değerlendirmeye alındı. Grupların İL-1 β derecelerinin gruplara göre karşılaştırılması tablo 14'te verildi.

Tablo 14. İL-1 β derecelerinin gruplara göre karşılaştırması

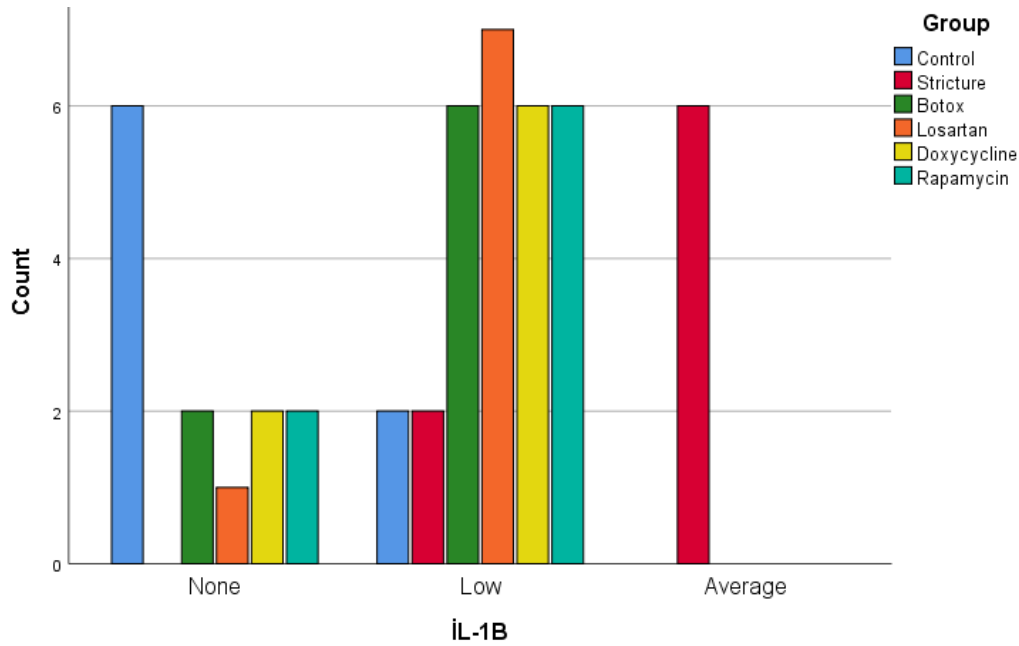
		Kontrol	Darlık	Botox	Losartan	Doksisiklin	Rapamisin	<i>p</i>
		n (%)						
İL-1 β	Hiç	6 (75,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	1 (14,3)	2 (25,0)	2 (25,0)	<0,001*
	Zayıf	2 (25,0)	2 (25,0)	6 (75,0)	7 (87,5)	6 (75,0)	6 (75,0)	
	Orta	0 (0,0)	6 (75,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

*:

Ki Kare testi

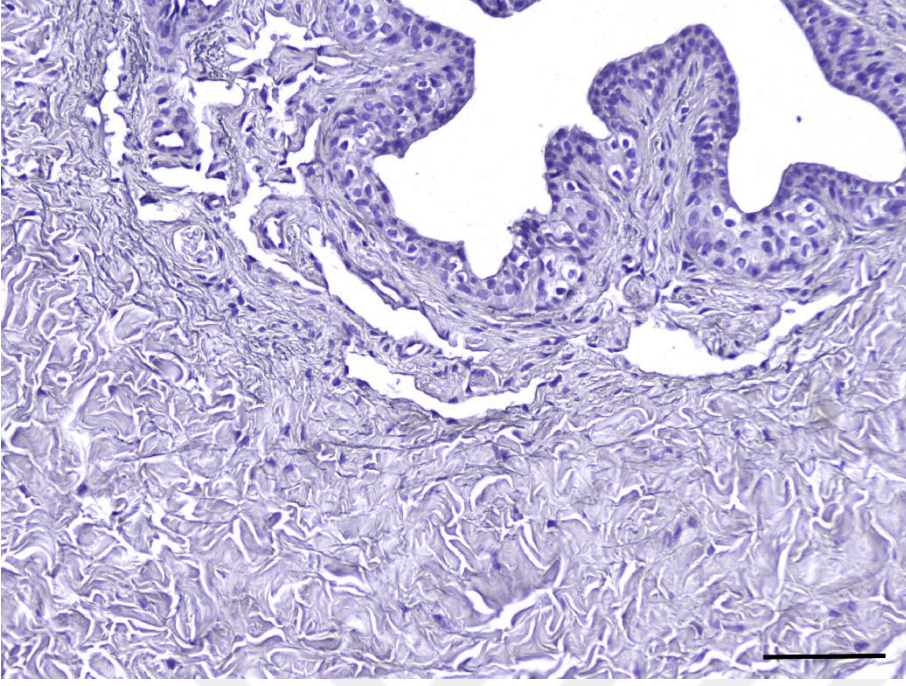
p<0,05

Kontrol, BOTOX, losartan, doksisiklin ve rapamisin gruplarında orta düzeyde immunreaksiyon gözlenmedi. Darlık grubunda %75(n:6) orta düzeyde immünreaksiyon gözlemlendi. BOTOX, doksisiklin ve rapamisin gruplarında 6'sar (%75) sıçanda zayıf derecede immunreaktivite saptandı. Losartan grubunun büyük çoğunluğunda (%87,5) zayıf derecede immunreaktivite gözlemlendi. İL-1 β ile ilaç türleri arasında %68,3'lük bir ilişki görüldü (p<0,001).

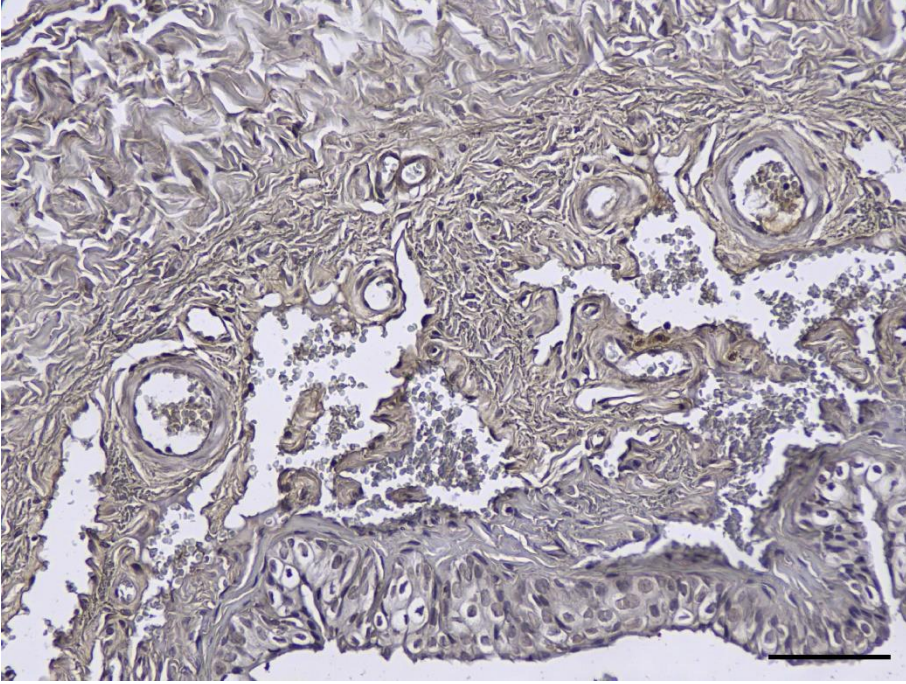


Şekil 10. İL-1 β düzeylerinin gruplara göre dağılımı

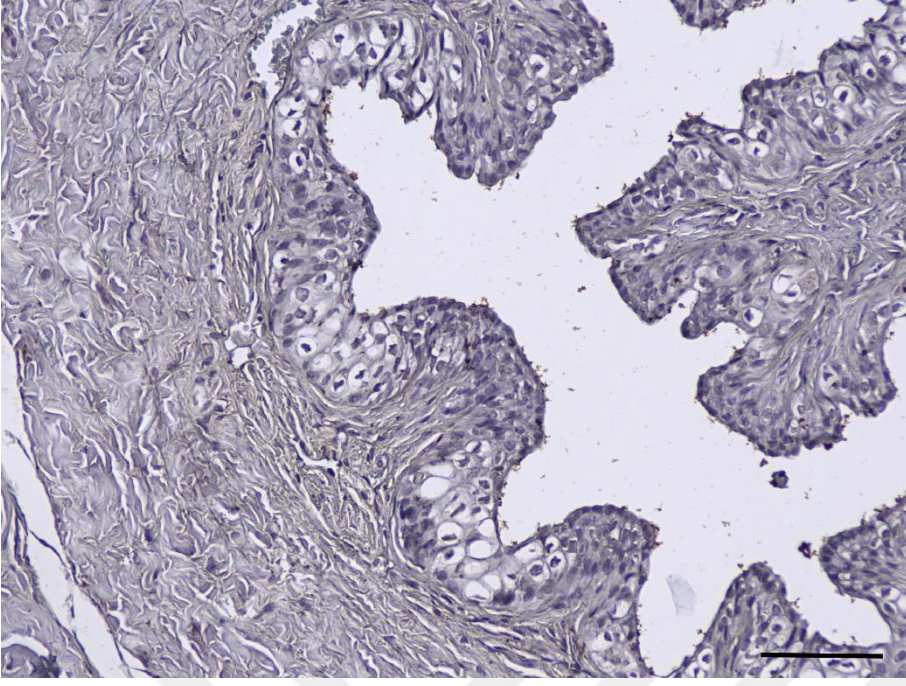
(count: sayı, none: hiç, low: zayıf, average: orta)



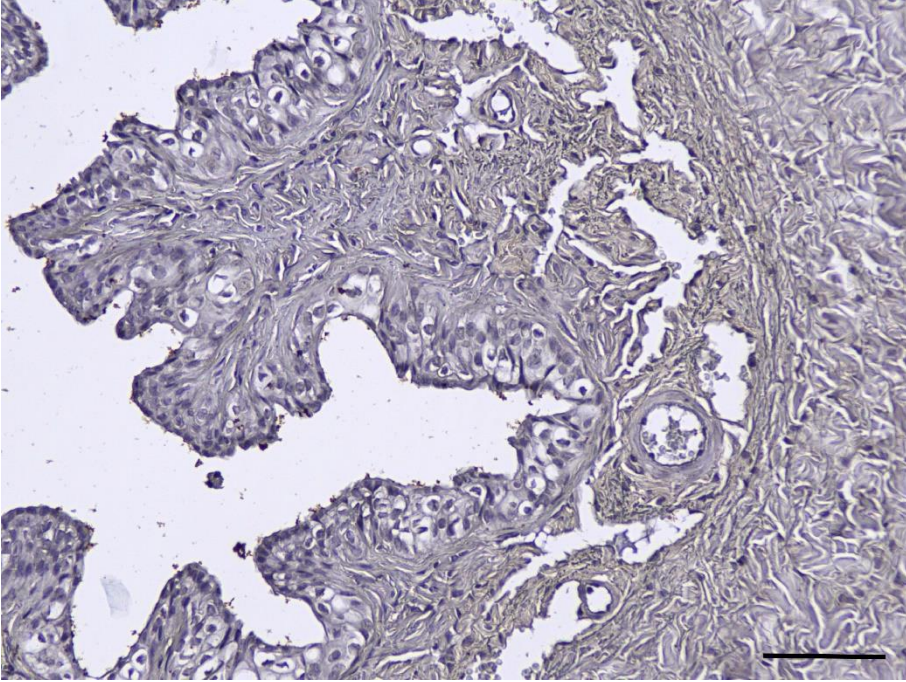
Resim 42. Sham kontrol grubu üretra dokusu negatif boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m)



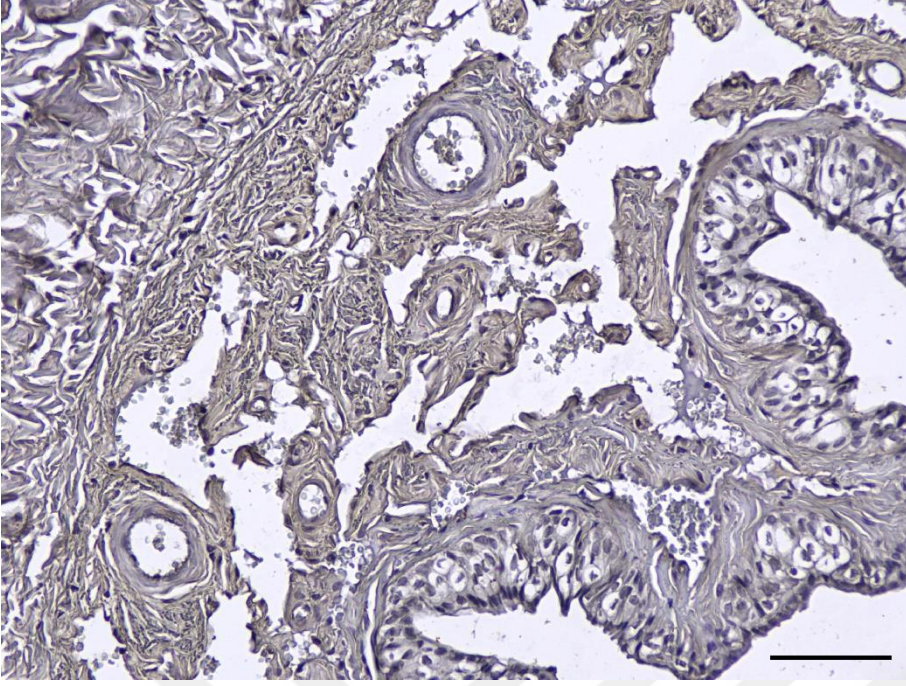
Resim 43. Darlık grubu üretra dokusu orta düzeyde boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m)



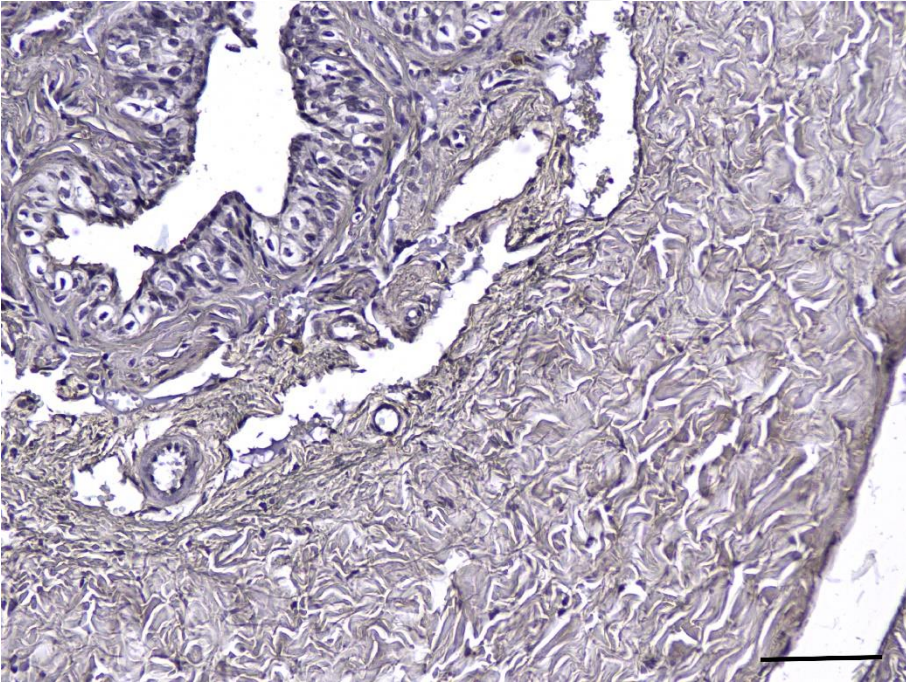
Resim 44. Rapamisin grubu üretra dokusu zayıf düzeyde boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m)



Resim 45. Losartan grubu üretra dokusu zayıf düzeyde boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m)



Resim 46. Doksisiklin grubu üretra dokusu zayıf düzeyde boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m)



Resim 47. BotoX grubu üretra dokusu zayıf düzeyde boyanma (IL-1 β immun boyama, x20, ölçüm çubuğu = 80 μ m)

4.4. Genetik Bulgular

Tablo 15. Üretra dokusunun PCR analiz sonuçlarının kıyaslanması

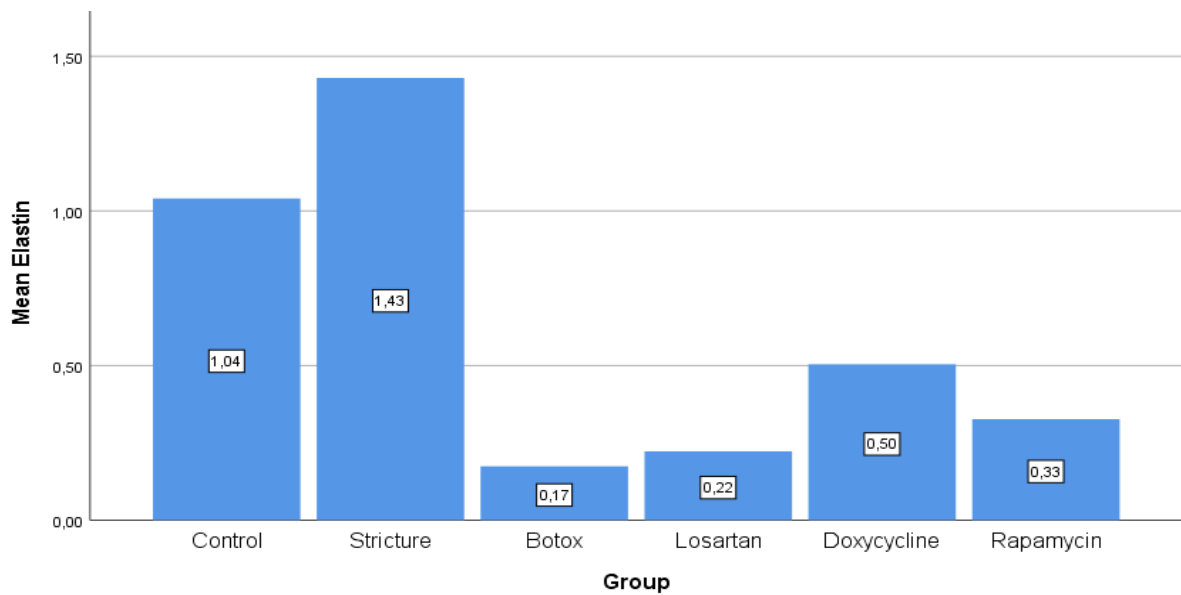
	Kontrol	Darlık	Botox	Losartan	Doksisiklin	Rapamisin	<i>p</i>
	Ort. ± SS						
Elastin	1,04±0,4	1,43±0,3	0,18±0,1	0,22±0,2	0,50±0,5	0,33±0,2	<0,001*
TGF-β	1,10±0,4	1,72±0,6	0,38±0,1	0,36±0,2	0,21±0,3	0,21±0,2	<0,001*
PDGF- α	1,03±0,3	2,34±1,7	0,59±0,2	0,50±0,2	0,26±0,1	0,27±0,2	<0,001*
α-SMA	0,99±0,2	1,95±1,3	0,55±0,2	0,60±0,5	0,43±0,8	0,32±0,2	0,001*
PDGF-β	1,03±0,3	1,88±0,9	0,22±0,1	0,15±0,1	0,09±0,1	0,23±0,1	<0,001*
COL-1	1,01±0,3	1,52±0,4	0,21±0,1	0,64±0,6	0,90±0,4	0,27±0,1	<0,001*
COL-3	1,03±0,3	1,76±0,8	0,43±0,1	0,42±0,2	0,96±2,4	0,21±0,2	<0,001*

*:

Kruskal Wallis-H Testi

p<0,05

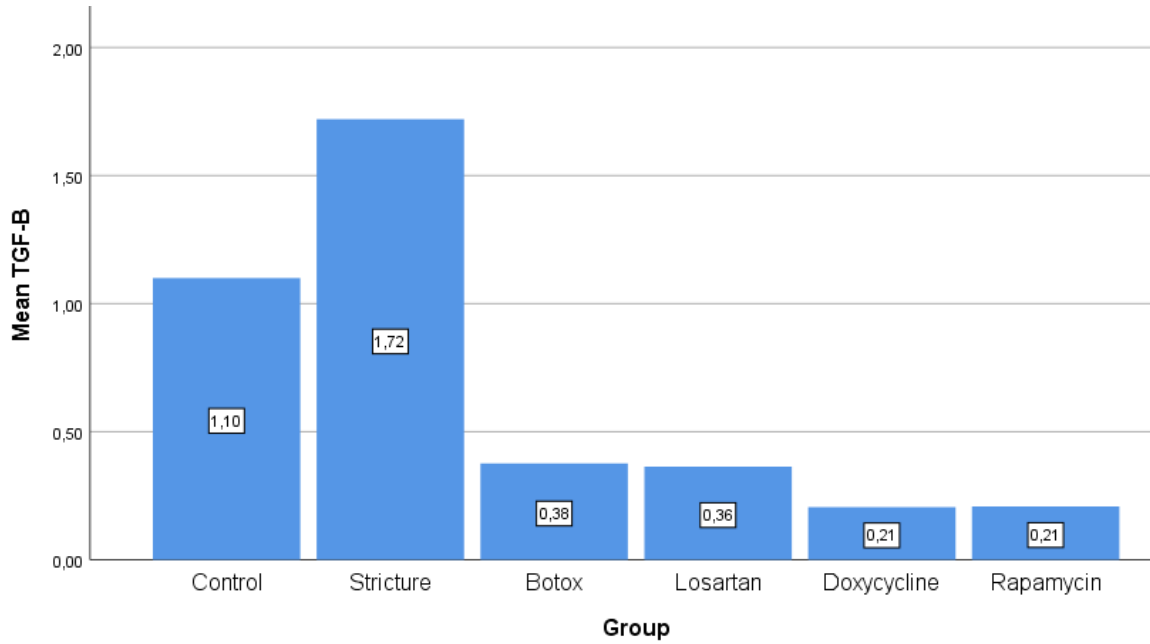
Grupların Elastin ortalama değerleri ve dağılımı Tablo 15'te ve Şekil 11'de özetlenmiştir. Darlık grubu en yüksek ortalama Elastin değerine (1,43±0,3 ng/mL) sahip grup idi. Gruplar arasında Elastin ortalaması açısından istatistiki olarak anlamlı fark vardı (p<0,001). Üretra dokusundaki Elastin oranı kontrol grubuna göre darlık grubunda artmıştı ve tedavi gruplarında (BOTOX, Losartan, Doksisiklin, Rapamisin) ise kontrol grubuna göre azalmış idi. Yine, Elastin oranı tedavi gruplarının hepsinde darlık grubuna göre azalmış idi. Yapılan post-hoc analiz sonucunda bu farkın darlık ve kontrol gruplarından kaynaklandığı tespit edildi (Tablo 16).



Şekil 11. Ortalama elastin değerinin gruplara göre dağılımı

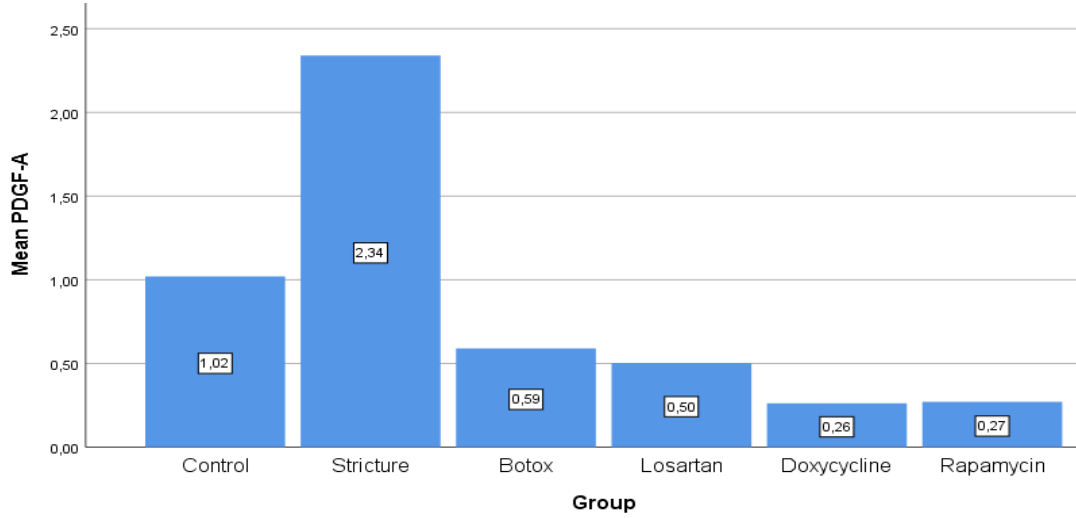
(Mean elastin: ortalama elastin değeri)

Grupların TGF- β ortalama değerleri ve dağılımı Tablo 2’de ve Şekil 3’de özetlenmiştir. Darlık grubu en yüksek ortalama TGF- β değerine ($1,72\pm 0,6$ ng/mL) sahip grup idi. Gruplar arasında TGF- β ortalaması açısından istatistiki olarak anlamlı fark vardı ($p<0,001$). Üretra dokusundaki TGF- β oranı kontrol grubuna göre darlık grubunda artmıştı ve tedavi gruplarında (BOTOX, Losartan, Doksisisiklin,Rapamisin) ise kontrol grubuna göre azalmıŐı idi. Yine, TGF- β oranı tedavi gruplarının hepsinde, darlık grubuna göre azalmıŐı idi. Yapılan post-hoc analiz sonucunda bu farkın darlık ve kontrol gruplarından kaynaklandığı tespit edildi (Tablo 16).



Şekil 12. Ortalama TGF- β değerinin gruplara göre dağılımı
(Mean TGF - β : ortalama TGF- β değeri)

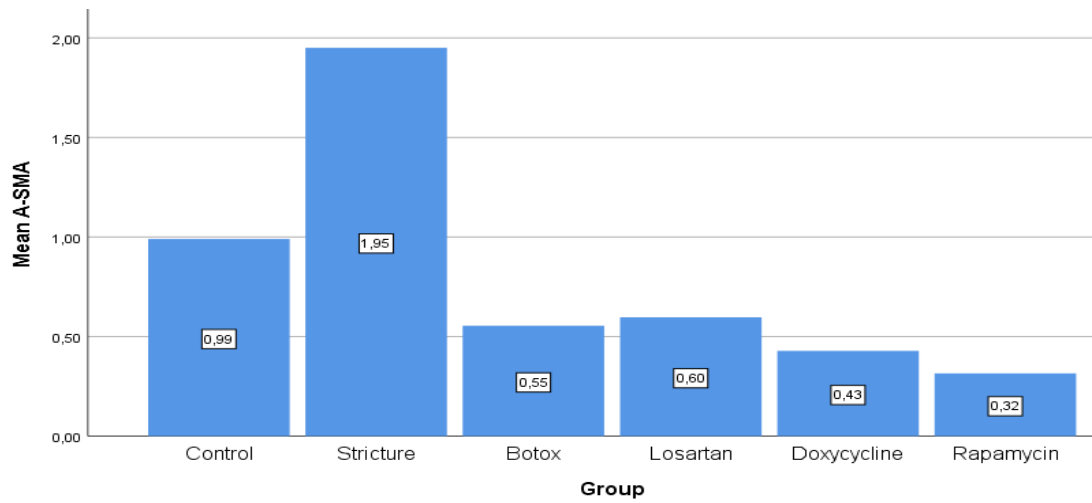
Grupların PDGF- α ortalama değerleri ve dağılımı Tablo 2’de ve Şekil 4’de özetlenmiştir. Darlık grubu en yüksek ortalama PDGF- α değerine ($2,34\pm 1,7$ ng/mL) sahip grup idi. Gruplar arasında PDGF- α ortalaması açısından istatistiki olarak anlamlı fark vardı ($p<0,001$). Üretra dokusundaki PDGF- α oranı kontrol grubuna göre darlık grubunda artmıştı ve tedavi gruplarında (BOTOX, Losartan, Doksisisiklin,Rapamisin) ise kontrol grubuna göre azalmıŐı idi. Yine, PDGF- α oranı tedavi gruplarının hepsinde, Darlık grubuna göre azalmıŐı idi. Yapılan post-hoc analiz sonucunda bu farkın darlık ve kontrol gruplarından kaynaklandığı tespit edildi (Tablo 16).



Şekil 13. Ortalama PDGF- α değerinin gruplara göre dağılımı

(Mean PDGF- α : ortalama PDGF- α değeri)

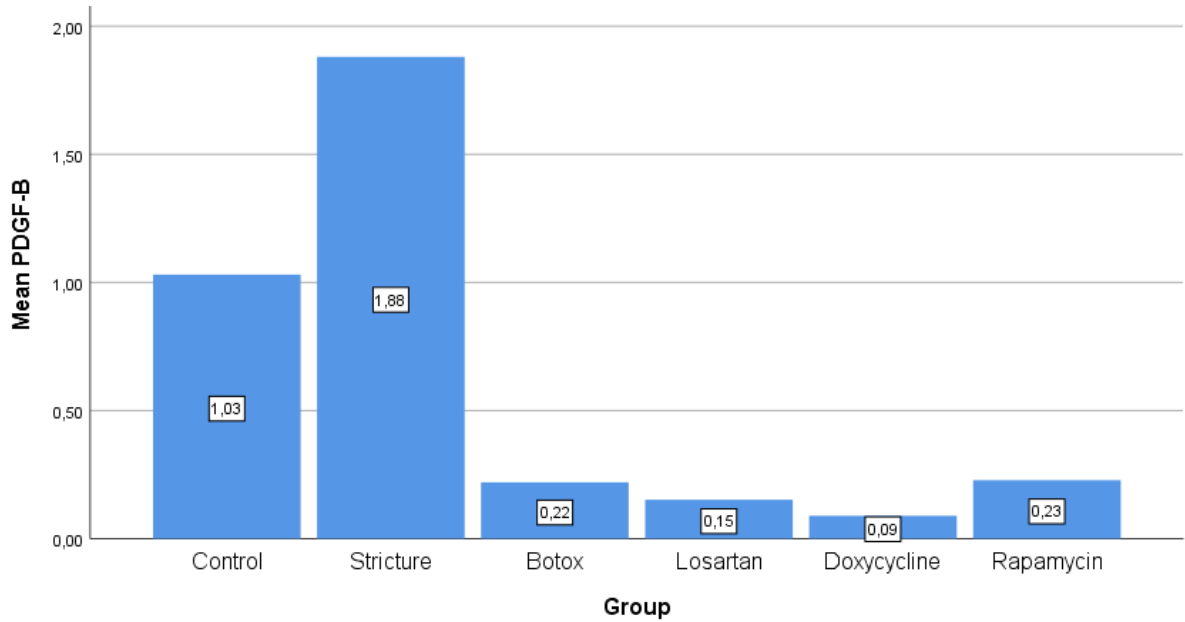
Grupların alfa- düz kas aktin (α -SMA) ortalama değerleri ve dağılımı Tablo 2’de ve Şekil 5’de özetlenmiştir. Darlık grubu en yüksek ortalama α -SMA değerine ($1,95 \pm 1,3$ ng/mL) sahip grup idi. Gruplar arasında α -SMA ortalaması açısından istatistiki olarak anlamlı fark vardı ($p < 0,001$). Üretra dokusundaki α -SMA oranı kontrol grubuna göre darlık grubunda artmıştı ve tedavi gruplarında (BOTOX, Losartan, Doksisisiklin, Rapamisin) ise kontrol grubuna göre azalmış idi. Yine, α -SMA oranı tedavi gruplarının hepsinde, darlık grubuna göre azalmış idi. Yapılan post-hoc analiz sonucunda bu farkın darlık ve kontrol gruplarından kaynaklandığı tespit edildi (Tablo 16).



Şekil 14. Ortalama α -SMA değerinin gruplara göre dağılımı

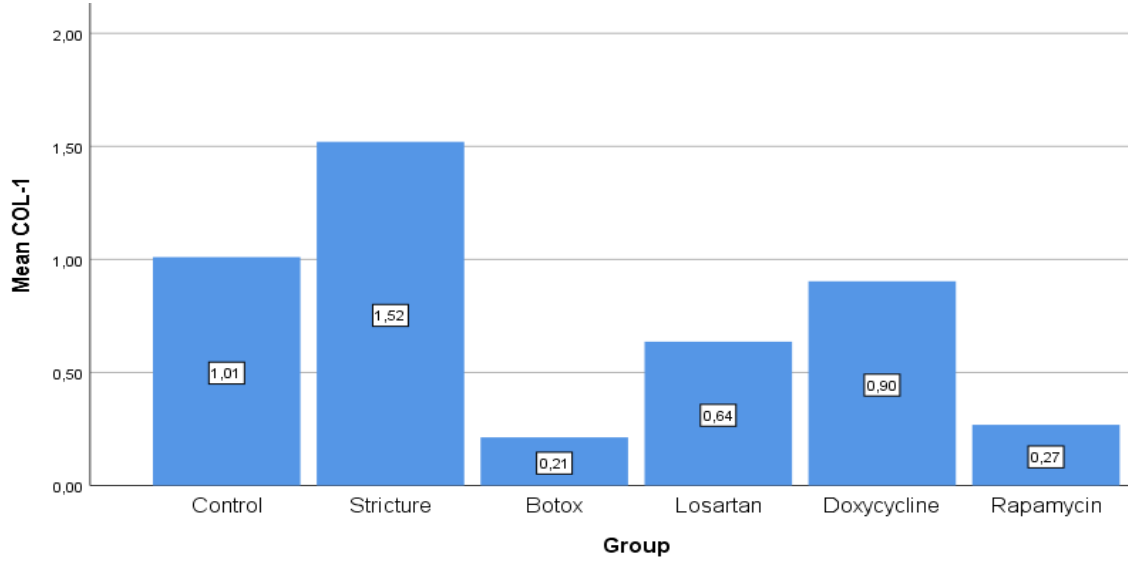
(Mean α -SMA: ortalama α -SMA değeri)

Grupların platelet kaynaklı büyüme faktör- beta (PDGF- β) ortalama değerleri ve dağılımı Tablo 2’de ve Şekil 6’da özetlenmiştir. Darlık grubu en yüksek ortalama PDGF- β değerine ($1,88\pm 0,9$ ng/mL) sahip grup idi. Gruplar arasında PDGF- β ortalaması açısından istatistiki olarak anlamlı fark vardı ($p<0,001$). Üretra dokusundaki PDGF- β oranı kontrol grubuna göre darlık grubunda artmıştı ve tedavi gruplarında (BOTOX, Losartan, Doksisisiklin,Rapamisin) ise kontrol grubuna göre azalmış idi. Yine, PDGF- β oranı tedavi gruplarının hepsinde, Darlık grubuna göre azalmış idi. Yapılan post-hoc analiz sonucunda bu farkın darlık ve kontrol gruplarından kaynaklandığı tespit edildi (Tablo 16).



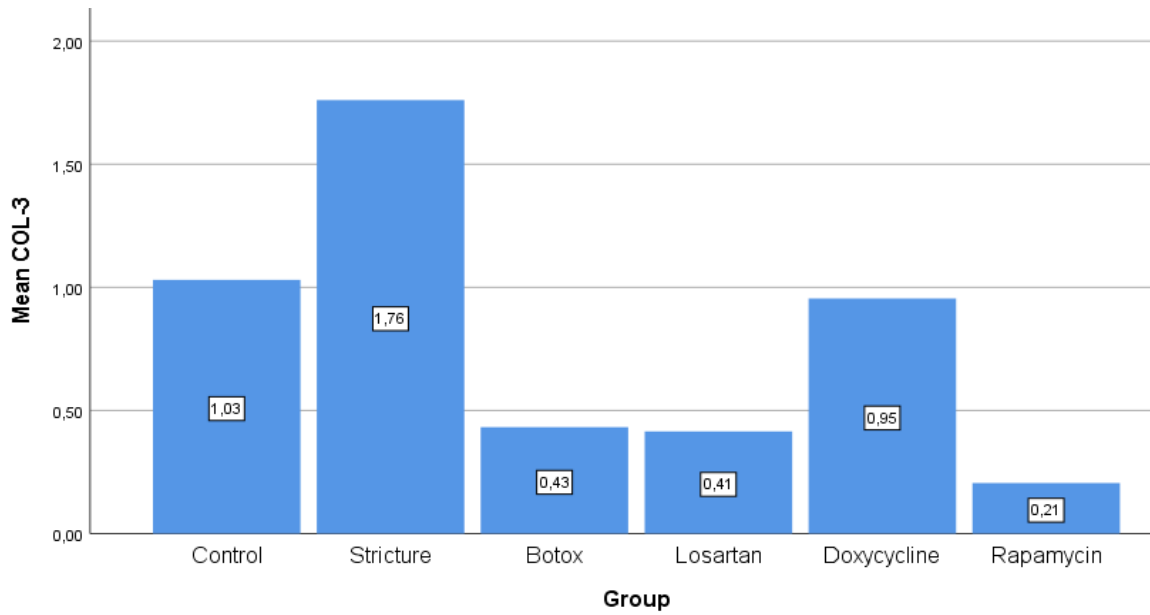
Şekil 15. Ortalama PDGF- β değerinin gruplara göre dağılımı
(Mean PDGF- β :ortalama PDGF- β değeri)

Grupların COL-1 ortalama değerleri ve dağılımı Tablo 2’de ve Şekil 7’de özetlenmiştir. Darlık grubu en yüksek ortalama COL-1 değerine ($1,52\pm 0,4$ ng/mL) sahip grup idi. Gruplar arasında COL-1 ortalaması açısından istatistiki olarak anlamlı fark vardı ($p<0,001$). Üretra dokusundaki COL-1 oranı kontrol grubuna göre darlık grubunda artmıştı ve tedavi gruplarında (BOTOX, Losartan, Doksisisiklin,Rapamisin) ise kontrol grubuna göre azalmış idi. Yine, COL-1 oranı tedavi gruplarının hepsinde, Darlık grubuna göre azalmış idi. Yapılan post-hoc analiz sonucunda bu farkın darlık ve kontrol gruplarından kaynaklandığı tespit edildi (Tablo 16).



Şekil 16. Ortalama COL-1 değerinin gruplara göre dağılımı
(Mean COL-1: ortalama kollajen 1 değeri)

Grupların COL-3 ortalama değerleri ve dağılımı Tablo 2’de ve Şekil 8’de özetlenmiştir. Darlık grubu en yüksek ortalama COL-3 değerine ($1,76 \pm 8$ ng/mL) sahip grup idi. Gruplar arasında COL-3 ortalaması açısından istatistiki olarak anlamlı fark vardı ($p < 0,001$). Üretra dokusundaki COL-3 oranı kontrol grubuna göre darlık grubunda artmıştı ve tedavi gruplarında (BOTOX, Losartan, Doksisisiklin, Rapamisin) ise kontrol grubuna göre azalmış idi. Yine, COL-3 oranı tedavi gruplarının hepsinde, darlık grubuna göre azalmış idi. Yapılan post-hoc analiz sonucunda bu farkın darlık ve kontrol gruplarından kaynaklandığı tespit edildi (Tablo 16).



Şekil 17. Ortalama COL-3 değerinin gruplara göre dağılımı
(Mean COL-3: ortalama kollajen-3 değeri)

Tablo 16. Genetik değerlerin posthoc analizi

		Elastin	TGF-β	PDGF-α	α-SMA	PDGF-β	COL-1	COL-3
		<i>p</i>						
Kontrol	Darlık	0,233	0,149	0,403	0,537	0,259	0,084	0,212
	Botox	0,001	0,003	0,018	0,001	0,000	0,000	0,001
	Losartan	0,001	0,003	0,004	0,429	0,000	0,821	0,001
	Doksisiklin	0,232	0,001	0,000	0,599	0,000	1,000	1,000
	Rapamisin	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Darlık	Kontrol	0,233	0,149	0,403	0,537	0,259	0,084	0,212
	Botox	0,000	0,000	0,124	0,129	0,005	0,000	0,005
	Losartan	0,000	0,000	0,096	0,159	0,004	0,031	0,004
	Doksisiklin	0,003	0,000	0,049	0,109	0,003	0,054	0,997
	Rapamisin	0,000	0,000	0,050	0,055	0,005	0,000	0,001
Botox	Kontrol	0,001	0,003	0,018	0,001	0,000	0,000	0,001
	Darlık	0,000	0,000	0,124	0,129	0,005	0,000	0,005
	Losartan	1,000	1,000	1,000	1,000	0,833	0,639	1,000
	Doksisiklin	0,695	0,899	0,028	1,000	0,280	0,004	1,000
	Rapamisin	0,134	0,240	0,034	0,081	1,000	0,999	0,078
Losartan	Kontrol	0,001	0,003	0,004	0,429	0,000	0,821	0,001
	Darlık	0,000	0,000	0,096	0,159	0,004	0,031	0,004
	Botox	1,000	1,000	1,000	1,000	0,833	0,639	1,000
	Doksisiklin	0,884	0,964	0,204	1,000	0,984	0,992	1,000
	Rapamisin	0,951	0,629	0,237	0,834	0,915	0,794	0,311
Doksisiklin	Kontrol	0,232	0,001	0,000	0,599	0,000	1,000	1,000
	Darlık	0,003	0,000	0,049	0,109	0,003	0,054	0,997
	Botox	0,695	0,899	0,028	1,000	0,280	0,004	1,000
	Losartan	0,884	0,964	0,204	1,000	0,984	0,992	1,000
	Rapamisin	0,997	1,000	1,000	1,000	0,381	0,009	0,998
Rapamisin	Kontrol	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Darlık	0,000	0,000	0,050	0,055	0,005	0,000	0,001
	Botox	0,134	0,240	0,034	0,081	1,000	0,999	0,078
	Losartan	0,951	0,629	0,237	0,834	0,915	0,794	0,311
	Doksisiklin	0,997	1,000	1,000	1,000	0,381	0,009	0,998

Sıçanların genetik değerlerine ait korelasyon analizi sonuçları Tablo 17’te sunuldu.

Tablo 17. Korelasyon analizi

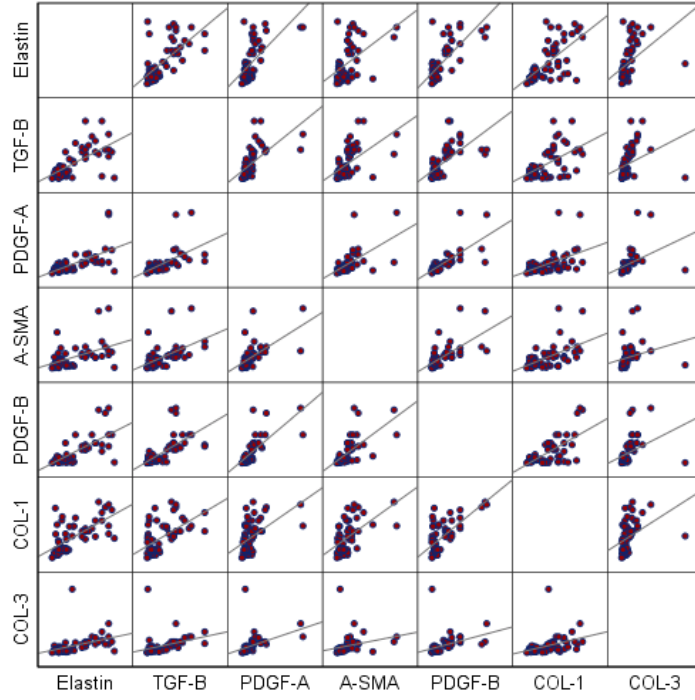
		Elastin	TGF- β	PDGF- α	α -SMA	PDGF- β	COL1A1	COL3A1
Elastin	r	1	0,612	0,610	0,437	0,644	0,681	0,588
	p		<0,001*	<0,001*	0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
TGF- β	r		1	0,852	0,659	0,761	0,525	0,686
	p			<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,001*	<0,001*
PDGF- α	r			1	0,733	0,773	0,523	0,793
	p				<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
α -SMA	r				1	0,754	0,572	0,703
	p					<0,001*	<0,001*	<0,001*
PDGF- β	r					1	0,516	0,653
	p						<0,001*	<0,001*
COL1A1	r						1	0,585
	p							<0,001*
COL3A1	r							1
	p							

*.

Spearman’s rho korelasyon testi

p<0,05

Sıçan üretra dokusundan PCR yöntemi ile çalışılan parametreler arasında bir korelasyon olup olmadığı analiz edildi ve Tablo 17’de özetlendi. Yapılan analizde bütün parametreler (elastin, TGF- β , α -SMA, PDGF- α , PDGF- β , COL-1, COL-3) arasında korelasyon (birlikte artma veya azalma) olduğu tespit edildi.



Şekil 18. Korelasyon analiz grafiği

Tablo 18. korelasyon analiz sonuçları

	elastin	PDGF- α	PDGF- β	α -SMA	COL-1	COL-3	TGF- β	
elastin		Y	Y	O	Y	O	Y	
PDGF- α	Y		Y	Y	O	Y	Ç-Y	
PDGF- β	Y	Y		Y	O	Y	Y	
α -SMA	O	Y	Y		O	Y	Y	
COL-1	Y	O	O	O		O	O	
COL-3	O	Y	Y	Y	O		Y	
TGF- β	Y	Ç-Y	Y	Y	O	Y		

(Y:yüksek, O:orta, Ç-Y: çok yüksek)

5. TARTIŞMA

Üretra darlığı gelişim patogenezinde fibrozis anahtar rol oynamaktadır ve etyolojisinde; iatrojenik nedenler, travma ve enfeksiyon yer almaktadır. Buna rağmen üretra darlığının etyolojini oluşturan önemli bir oranın hangi nedenden dolayı meydana geldiği bilinmemektedir (1).

Günümüzde üretra darlığı tedavisi için uygulanan yöntemler yetersiz kalmaktadır. Endoskopik yaklaşımların en önemli dezavantajı; yüksek rekürrens oranlarıdır. Üretroplastinin ise yüksek maliyet, öğrenme eğrisinin uzunluğu ve her merkezde uygulanmamasından dolayı hastaların bu tedaviye ulaşım konusunda yaşadıkları sıkıntılar en sık karşılaşılan dezavantajlardır. Bu nedenle üretra darlığı tedavisinde yeni yöntem veya uygulamalara ihtiyaç vardır. Epitelde meydana gelen hasar sonrasında başlayan yara iyileşmesinin sonucunda ortaya çıkan skar dokusunun mekanizması net olarak bilinmemektedir. Hücresel ve moleküler düzeyde birçok faktörün rol aldığı karmaşık bir sistem olduğu tahmin ediliyor (86). Çalışmaların odak noktası darlığın nedenini oluşturan fibrozisi azaltmaya yöneliktir. Fibrozis oluşumunu azaltan tedaviler, endoskopik yaklaşımla kombine edildiğinde darlığın tekrarlamasının önüne geçebilme ihtimali ortaya çıkar. Böylece hem üretroplasti gibi majör cerrahinin rolü azalacak hem de bu hastalığın yönetiminde tam bir konsensus oluşturulmasının önü açılacaktır.

Tıp alanında kullanılacak bir medikal veya cerrahi tedavi üzerinde araştırma yapılırken, hem kanunen ve hem de etik açıdan bu araştırmanın öncelikle insan patofizyolojisini taklit edebilecek deneysel ortamlarda veya kobaylar üzerinde kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla en sık kullanılan canlılar laboratuvar sıçanlarıdır. Ratlar, maliyeti az ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilebilecek sayıya ulaşılması kolay hayvanlardır. Üretra çalışmaları bakımından idealdir (87). Fizyolojik olarak insana benzemeleri, dayanıklı olmaları ve ortama kolay adapte olmaları en önemli avantajlarıdır. Temel tıp, ilaç ve toksisite gibi çalışmalarda en çok tercih edilen hayvanlardır. Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan bilimsel çalışmalarda en temel nokta, doğru deneysel modelin oluşturulmasıdır. Literatür incelendiğinde küçük deney hayvanlarında üretra darlığı modeli oluşturmak için farklı tekniklerin kullanıldığı görülmektedir.

Elektrokoagülasyon darlık modeli oluşturmak amacıyla kullanılan yöntemlerden biridir. Meria ve ark. tavşanlarda elektrokoagülasyonu, pediatrik rezektoskop ile bulber üretrada darlık modeli oluşturmak amacıyla kullandı. Darlık oluşma kriteri üretra çapının %50'den fazla

daralması olarak belirlendi. Çalışma sonucunda kontrol grubunda hiç darlık gözlenmezken, darlık grubundaki 18 tavşanın 9 tanesinde %50'den fazla üretral çap daralması olduğu gözlemlendi. Endoskopik elektrokoagülasyonun darlık modelinde etkili bir yöntem olduğu belirtildi (88).

Ayyıldız ve ark. ise çalışmasında darlık modeli oluşturmak için internal üretrotomi bıçağıyla saat 4 ve 8 hizasından 5 mm'lik longitudinal kesiler oluşturdu. Kronik inflamasyon ve fibrozisin değerlendirildiği çalışmada yapılan işlemin darlık modelini oluşturmada başarılı olduğu gözlemlendi (2). Hu ve ark. da transüretral endoskopi ile darlık modeli oluşturmak için soğuk bıçak yerine holmium YAG lazeri kullandı. Çalışmada darlık modeli oluşturulan grupta kontrol grubuna göre idrar akım hızında önemli derecede azalma olduğu saptandı (3).

TGF- β enjeksiyonu, darlık modeli oluşumu için kullanılan başka bir yöntemdir. Sangkum ve ark, darlık modelini oluşturmak amacıyla 10 mikrogram TGF- β 'yı üretraya enjekte etti. 4 hafta sonunda salin grubuyla kıyaslandığında üretral fibrozis ile COL-1 ve COL-3'te anlamlı derecede artış olduğu kaydedildi (4).

Bu teknikler dışında lümeni tam kapatmayacak şekilde emilmeyen suturelerle üretrayı bağlama ile karakterize ligasyon tekniği ve periüretral dokuya kadar uzanan rezeksiyon teknikleri de tanımlanmıştır (89, 90). Tanımlanan bütün tekniklerin birbirlerine üstünlüğünü gösteren çalışmalar yeterli değildir. Yapılmış sınırlı çalışmalardan birinde Faydaci ve ark üretrada darlık modeli oluşturmada elektrokoagülasyon ile rezeksiyonun etkinliğini karşılaştırdı. Sonuçlar üretroskopi ve retrograt üretrografi ile değerlendirildi. Rezeksiyon yapılan gruptaki bütün hayvanlarda elektrokoagülasyon ve kontrol grubuyla kıyaslandığında önemli derecede darlık formasyonu oluştuğunu belirtti (89). Başka bir çalışmada ise Sievert ve ark. erkek domuz üretrasında elektrokoagülasyon, ligasyon ve üretrotominin darlık oranlarını karşılaştırdı. Sonuçlar üretrografi ve COL-1/ COL-3 oranıyla değerlendirildi. En şiddetli darlık elektrokoagülasyon grubunda, en hafif darlık ise üretrotomi grubunda gözlemlendi. Elektrokoagülasyon grubundaki dokuların histolojisi insan üretral skar dokusuna benzer ve artmış COL-1/ COL-3 oranına sahipti (90). Ligasyon tekniğinin ciddi derecede yara ve fistüllere neden olması, üretrotomi ve rezeksiyon tekniklerinde ise insizyon derinliğinin kontrolünün zorluğu bu tekniklerin başlıca dezavantajlarıdır (91).

Biz, çalışmamızda darlık modelini oluşturmak için elektrokoagülasyon tekniğini uyguladık. Üretra çevre dokulardan tamamen serbestleştirilip ortaya çıkarıldıktan sonra 5 mm'lik aralıklarla 3 noktaya 10 wattlık koagülasyon 1 saniye süre ile yapıldı. Elektrokoagülasyon sonucu ratlarda ölüm gözlenmedi. 2 hafta sonundaki histolojik incelemede kontrol grubunda orta ve yüksek derecede fibrozis gözlenmezken, darlık grubunun %75'inde yüksek, %25'inde ise orta derecede fibrozis oluştu. Darlık grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlendi ($p=0,001$). Darlık grubunda %75 oranında yüksek derecede, %25 oranında orta derecede submukozal hemoraji gözlendi. Kontrol grubunda yüksek derecede submukozal hemoraji gözlenmezken orta derecede hemoraji sadece bir hayvanda gözlendi. Darlık grubunda submukozal hemoraji anlamlı derece artış gösterdi($p=0,001$). Darlık grubundaki hayvanların %87,5'inde yüksek derecede, %12,5'inde ise orta derecede epitelyal dejenerasyon ortaya çıkarken kontrol grubunda yüksek ve orta derecede dejenerasyona rastlanmadı. İki grup arasında anlamlı değişiklik oluştu($p=0,001$). Darlık grubundaki hayvanların %37,5'inde yüksek, %62,5'inde orta düzeyde vasküler konjesyon gözlenirken, kontrol grubunda bu düzeylerde vasküler konjesyona rastlanmadı. Darlık grubunda vasküler konjesyon önemli derecede arttı($p=0,001$). İnflamasyon oranlarında darlık grubunda kontrol grubuyla kıyaslandığında önemli derecede artış olduğu kaydedildi($p=0,003$). Histolojik parametrelerin tamamı elektrokoagülasyonun darlık modelini oluşturmada etkili olduğunu gösterdi. İmmünohistokimyasal değerlendirmede darlık grubunda %75 orta, %25 oranında düşük düzeyde İL1-B ekspresyonu izlendi. Kontrol grubunda %25 oranında zayıf ekspresyon izlenirken orta düzeyde ekspresyona rastlanmadı. Darlık grubundaki İL1-B ekspresyonu kontrol grubuna göre önemli derecede artış gösterdi ($p=0,001$). Yine PCR sonuçlarında elastin, TGF- β , PDGF- α , PDGF- β , α -SMA, COL-1 ve COL- 3 genlerinin tamamında darlık grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu kaydedildi($p<0,015$). Histolojik, immünohistokimyasal ve PCR parametreleri birlikte değerlendirildiğinde elektrokoagülasyon yöntemiyle darlık oluşturma modeli başarıyla sonuçlandı. Hayvanlarda üriner retansiyon ve ölümün olmaması elektrokoagülasyon yönteminin başarılı olmasının dışında güvenli olduğunu da göstermektedir. Ayrıca darlık modelimiz: histolojik, immünohistokimyasal ve 7 adet gen parametrelerini içererek darlık modelinin en geniş parametrelerle değerlendirildiği çalışma özelliğini de taşımaktadır.

Üretra darlığında fibrozisin rolü daha iyi anlaşıldıkça, yeni tedavi yaklaşımlarının fibrozisi azaltmaya yönelik olarak arttığı görülmektedir. Paklitaksel, mitomisin c, kollagenase klostridium histoliticum, tadalafil, docetaxel, plazmadan zengin platelet, kaptopril jel gibi

ajanlar ve insan hücre kültürü ile mezenkimal kök hücre gibi tedaviler bu amaçla denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (2, 4-12, 86, 92). Biz de çalışmamızda doksisisiklin, rapamisin, botox ve losartanı antifibrotik özelliklerinden dolayı üretra darlığında test etmek için kullandık.

Rapamisinin farklı organlardaki antifibrotik özelliği birçok çalışmayla test edilmiştir. Trabekülektomi sonrası oluşan skar dokusunu azaltmak için rapamisinin etkinliğini İgarashi ve ark. tavşan modelinde araştırmış. Hipotezini; rapamisinin TGF- β 1'i azaltarak insan konjunktival fibroblastlarında TGF- β 1 etkisiyle oluşan fibrozisi azaltabileceği yönünde kurdu. TGF- β 1 ile fibrozis indüklenen tavşanlarda rapamisin tedavisinin fibronektin, COL-1, α -SMA ve fibrozisi önemli ölçüde azalttığını gösterdi (93). Trabekülektomi yapılan tavşanlarda Tai ve ark. ise rapamisini göz damlası formunda uyguladı. Rapamisin alan gruplarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında subkonjunktival fibroblastlarda belirgin apoptozis olduğunu gözlemledi (94). Benzer bir çalışmada Kang ve ark. trabekülektomi yapılan ratlarda rapamisin tedavisinin fibrozis inhibisyonu üzerine etkinliğini araştırdı. Rapamisinin, kontrol grubuyla kıyaslandığında fibroblastların aşırı çoğalmasını engellenerek fibrozisi azalttığını gösterdi (95).

Korneal alkali yanıklar korneada neovaskülarizasyon ve fibrozisle sonuçlanan bir hastalıktır. Li ve ark. alkali yanıklar sonrası gelişen fibrozisi azaltmak amacıyla rapamisinin etkinliğini değerlendirdi. 5-aza-2'-deoksitidin ile korneal alkali yanık oluşturulan ratlara rapamisin tedavisi uyguladı. Rapamisin alan grupta tedavi almayan grup ile kıyaslandığında neovaskülarizasyon, doku kalınlığı, pan lökosit marker olan CD45, VEGF ve α -SMA düzeylerinin azaldığı gözlemlendi (96).

Liang ve ark. hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan ratlarda oluşan hasarı azaltmak için rapamisinin α -SMA üzerinden etkili olduğunu gösterdi. Sürekli oksijen verilerek hiperoksik hasar oluşturulan gruplar karşılaştırıldı. Rapamisin alan grupta, almayan gruba göre α -SMA ve mTOR düzeylerinin daha düşük ve oluşan akciğer hasarı ile fibrozisin azaldığı gözlemlendi (97).

Progresif fibrozise bağlı böbrek yetmezliği ile sonuçlanan lupus nefritinde rapamisinin antifibrotik özelliğe sahip olduğu Zhang ve ark. tarafından gösterildi. Çalışmada rapamisinin mezenkimal hücrelerde anti-dsDNA ve TGF- β 1 tarafından indüklenen fibrozisi inhibe ettiği gözlemlendi. TGF- β 1, α -SMA, fibronektin ve kollajen ekspresyonlarında azalma meydana geldi (98).

Periton diyalizi alan hastalarda gelişen periton fibrozisini rapamisinin hangi mekanizma ile inhibe ettiğini Liu ve ark. fare çalışmasında araştırdı. Çalışmada peritoneal fibrozise lipit

dengesindeki düzensizliğin neden olduğu ve rapamisin tedavisinin periton kalınlığı ve geçirgenliğini azalttığını, α -SMA ve kollajen birikimini baskıladığını ve lipit dengesini düzenleyerek peritonel fibrozisi inhibe ettiğini gösterdi (99).

Diabetes Mellitus (DM) kaynaklı erektil disfonksiyon, apoptoz ve fibrozisle karakterize ve yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltan bir hastalıktır. Lin ve ark. DM kaynaklı erektil disfonksiyonda rapamisinin antifibrotik etkinliğini araştırdı. Ratlar rastgele kontrol grubu, streptozosin grubu ve streptozosin + rapamisin grubu olarak üçe gruba ayrıldı. Streptozosin tip-1 DM'yi indüklemek amacıyla verildi. 10 haftalık takipten sonra maksimum intrakavernozal basınç ve arteriyel basınç ölçülerek erektil fonksiyonlar test edildi. Streptozosin grubunda erektil fonksiyonda önemli derece bozulma olduğu ve rapamisin alan grupta erektil fonksiyonun daha fazla korunduğu gözlemlendi. NO/cGMP yolağı streptozosin grubunda inhibe olurken, rapamisin grubunda bu inhibisyon önemli ölçüde düzeldi. Rapamisin grubunda apoptozis ve fibrozisin streptozosin grubuna oranla daha azalmış olduğu ve rapamisinin DM kaynaklı ED'de koruyucu olabileceği sonucu paylaşıldı (100).

Rapamisinin antifibrotik etkinliği insan üretral dokusunda in vivo olarak gösterilmiştir. Bulböz üretrada eksizyon ve primer anastomoz yapılan dört hastanın skarlı üretral dokularındaki fibroblastlar izole edilerek kültürlendi. Dokular kontrol grubu ve rapamisinin farklı dozlarını içeren toplam altı gruba ayrıldı. Rapamisin bütün dozlarda fibroblastların büyümesini engelledi. Ayrıca total COL-1 ve COL-3 seviyelerinde doz bağımlı olarak azalma olduğu gözlemlendi (101).

Chong ve ark. elektrokoagülasyonla üretrada deneysel darlık modeli oluşturduğu ratları yüksek (1 mg/gün) ve düşük (0,1 mg/gün) doz rapamisin, dimetil sülfoksit (DMSO) ve salin (kontrol) gruplarına ayırarak tedavi etti. Rapamisin tedavisi katater ile 4 hafta boyunca günlük olarak üretral yolla yapıldı. Tedavi sonucunda salin grubunda üretra çapı %82.9, DMSO grubunda ise %69.1 azalırken, düşük doz rapamisin grubunda çap azalması %56.6 ve yüksek doz rapamisin grubunda ise bu azalma %36.5 olarak gerçekleşti. Histopatolojik incelemede de rapamisin gruplarında rastlanmayan ancak salin ve DMSO gruplarında gözlenen fibroblast ve kollajen birikimleri üretra çapında gerçekleşen darlık oranlarını doğruladı. Rapamisin gruplarında gözlenen fibrozis submukozal tabaka ile sınırlı ve sirius kırmızısı ile boyanmada açık kırmızı lekelenme şeklinde bulgu verdi. Salin ve DMSO gruplarında ise fibrozis hem

submukozal hem de kas tabakasında gözlemlendi ve boyanmada koyu kırmızı bir görüntüye sahipti. Çalışma; rapamisinin deneysel darlık modelini inhibe ettiğini destekledi (76).

Histopatolojik değerlendirmemizde rapamisin fibrozisi darlık grubuna oranla önemli derecede düşürerek kontrol grubuna yakın sonuçların ortaya çıkmasını sağladı. Darlık grubundaki bütün hayvanların fibrozis yoğunluğu orta ve yüksek derecedeyken, rapamisin grubundaki hayvanlarda fibrozis yoğunluğu ya hiç gözlenmedi ya da düşük yoğunlukla sınırlı kaldı. Rapamisin inflamasyonu azaltmada oldukça başarılı oldu. Hayvanların %75'inde inflamasyon tamamen geriledi, diğerlerinde ise düşük düzeyde kaldı. Submukozal hemoraji, epitelyal dejenerasyon ve vasküler konjesyonun iyileştirilmesinde rapamisin darlık grubuna üstünlük kurarak kontrol grubuyla yakın sonuçlar elde etti. İmmünohistokimyasal incelemede rapamisin grubunda İL-1 β ekspresyonu ratların %25'inde izlenmezken, %75'inde ise zayıf ekspresyon ortaya çıktı. Darlık grubunun %75'inde orta, %25'inde ise zayıf ekspresyon izlendi. Rapamisin, İL-1 β ekspresyonunu darlık grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttı. PCR analizinde rapamisin; bütün gen ekspresyonlarında, hem darlık hem de kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltma kaydetti. Histopatolojik, immünohistokimyasal ve PCR parametreleri birlikte değerlendirildiğinde rapamisinin üretral fibrozisi önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiş olduk. Bu sonuçları, rapamisinin üretra darlığının tedavisinde etkili olabileceğinin bir göstergesi olarak yorumluyoruz. Çalışmamız; üretra darlığında rapamisinin oral yolla verildiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Literatürde rapamisinin in vivo ve lokal olarak denendiği iki adet çalışmayla kıyaslandığında; tedavi sonuç değerlendirmesinin histopatolojik, immünokimyasal ve PCR analizlerini içerdiği en kapsamlı çalışma olduğunu görmekteyiz.

Zhou, hipertrofik skar modeli oluşturulan tavşan kulağında BOTOX etkinliğini araştırdı. 8 adet tavşanın bir kulağından 6 mm çaplı cilt ve ciltaltı dokusu eksize edildi. Yarısına botox enjeksiyonu yapıldı, yarısı ise kontrol grubu olarak takip edildi. Tedavi grubunda 30. gündeki skar kalınlığı kontrol grubunun yarısı kadardı. Histopatolojik incelemede tedavi grubunun vaskülarizasyonu ve VEGF ekspresyonunu inhibe etti. Dolayısıyla skar oluşumunu engelleyerek kontrol grubuna önemli üstünlük sağladı (102). Benzer bir çalışmayı Liu ve ark. BOTOX'un antifibrotik etkinliğini tavşan kulağında travmatik model oluşturarak gözlemledi. BOTOX'u, skarını inhibe ettiği kanıtlanmış triamsinolon asetonid(TAC) ve kontrol grubuyla karşılaştırdı. Yüksek doz (2 IU) BOTOX, TAC ve kontrol grubuna göre skar kalınlığını daha fazla azalttı. Orta(1.5 IU) ve düşük(1 IU) doz BOTOX ile TAC grubu arasında anlamlı farklılık

gözlenmedi. Kollajen fibril ve fibroblast birikiminde BOTOX ve TAC benzer etkinlik göstererek kontrol grubuna oranla daha fazla inhibisyon sağladı (103).

İnsan skar dokusundan izole edilen fibroblastlarda BOTOX'un etkinliğini Li ve ark. ortaya koydu. BOTOX verilen grupta kontrol grubuna kıyasla TGF- β 1 ve ERK yolaklarının inhibe edildiği ve α -SMA, COL-1, COL-3 seviyelerinde azalma olduğu gözlemlendi($p<0,05$) (104).

Huang ve ark. yaptığı retrospektif randomize çift kör kontrollü çalışmada blefaroplasti yapılan hastalarda yara yeri skarını azaltmak amacıyla subkutan BOTOX(n:20), subkutan salin(n:20) ile karşılaştırıldı. BOTOX'un skar genişliğini kontrol grubuna göre önemli ölçüde daralttığı sonucu paylaşıldı (105).

Liu ve ark. 16 rat ile yaptığı çalışmada lokal BOTOX enjeksiyonunun antifibrotik etkisini araştırdı. Elektrokoagülasyon ile üretral hasar oluşturan ratlar tedavi ve kontrol grubu olarak ayrıldı. Retrograd üretrografide tedavi grubunda üretra çapı 5 mm iken kontrol grubunda 1,5 mm olarak izlendi. Histolojik incelemede; üretral epitelyum devamlılığı, fibroblast infiltrasyonu, submukozal fibrozis yoğunluğu ve kollajen liflerinin kalınlıkları değerlendirildi. Kriterlerin tamamında botox grubu kontrol grubuna üstünlük sağladı (106).

Çalışmamızda BOTOX'u intralezyoner enjeksiyon olarak kullandık. Histopatolojik incelemede; botox fibrozisi darlık grubuna kıyasla istatistiksel olarak azalttı. BOTOX grubunda yüksek yoğunlukta fibrozis gözlenmedi. Orta yoğunluklu fibrozis oranı %37,5 düşük yoğunluk fibrozis oranı ise %62,5 oldu. Vasküler konjesyon, inflamasyon, submukozal hemoraji ve epitelyal dejenerasyonda botox, darlık grubuna göre anlamlı derecede azalma sağladı. İmmünohistokimyasal değerlendirmemizde botox İL-1 β 'yi azalttı. Hayvanların %75'inde İL-1 β zayıf yoğunlukta izlenirken, %25'inde ise yoğunluk oluşmadı ve darlık grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede üstünlük sağlandı. PCR analizinde BOTOX, hem darlık hem de kontrol gruplarına göre bütün gen ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttı. Histopatolojik, immünohistokimyasal ve PCR parametreleri birlikte göz önüne alındığında BOTOX'un üretral fibrozisi azaltarak darlık oluşumunu engellemede başarılı olduğunu görmekteyiz. Literatürde çalışmamız; hem üretra darlığında BOTOX'un kullanıldığı ikinci yayının hem de tedavi sonuçlarının en fazla parametre ile değerlendirildiği çalışma özelliğine sahiptir.

Kistik fibroziste bronş epitel hücrelerindeki inflamasyonu azaltmak için Kim ve ark. losartanın antiinflamatuvar etkinliğini koyunlarda test etti. Losartanın nebulizasyon ve oral yolla

verildiği çalışmada TGF- β 1 düzeyi, hiperkonsantrasyon ve hücrel inflamasyonun azaldığı, siliyer atım sıklığı ve hava yolu sıvı hacminde düzelme olduğu gözlemlendi (107).

Song ve ark. üreter obstrüksiyonu düzeltildikten sonra, losartanın renal fibrozisi azaltabilme etkinliğini araştırdı. Ratlarda sol üreter kesilerek obstrüktif nefropati oluşturuldu. Bir hafta sonra üreterler mesaneye yeniden implante edildi. İmplantasyon sonrası tedavi grubuna losartan, plasebo grubuna ise serum fizyolojik verildi. Bir haftalık tedavi sonrasında plasebo ile kıyaslandığında losartan grubunda hidronefroz derecesi ve patolojik değişiklikler daha hafifti. Losartan grubunda kollajen, α -SMA ve TGF- β 1 konsantrasyonları daha düşük izlendi (108).

Progresif bir interstisyel akciğer hastalığı olan idiopatik pulmoner fibrozisli hastalarda Couloris ve ark losartanın antifibrotik etkinliğini değerlendirildi. 100mg/gün losartan başlanan 20 hastanın 17 tanesi 1 yıllık tedavi sürecini tamamladı. Hastalık klinik olarak progresif seyir gösterme özelliğine sahip olmasına rağmen losartan alan hastalarda bir yıllık takipte progresyon olmadığı, akciğer kapasitelerinde düzelme olduğu veya kapasitenin sabit kaldığı gözlemlendi. Hiç bir hastada hipotansiyon dahil olmak üzere önemli bir yan etki gözlenmedi (109).

Gay-Jordi ve ark. egzersizle indüklenen kardiyak fibroziste losartanın etkinliğini araştırdı. Egzersiz öncesi günlük losartan verilen grup ile sadece egzersiz yapılan gruptaki ventriküler kollajen birikimi histolojik ve biyokimyasal markırlarla ölçüldü. Losartan egzersize bağlı hipertrofiyi tamamen engellemese de fibroziste rol alan mRNA ekspresyonunda ve protein sentezinde azalmaya yol açtı (110).

Kastrasyon yapılan sıçanlarda korpus kavernozumda meydana gelen fibroze, losartanın etkisini Küçükdurmaz ve ark. değerlendirdi. Kastrasyon sonrası dört hafta losartan tedavisi alan grup ile sadece kastrasyon yapılan grup karşılaştırıldı. Sadece kastrasyon yapılan grupta trombospondin-1, TGF- β ve fibronektin ekspresyonu önemli ölçüde artış gösterirken, alfa aktin seviyelerinde düşme gözlemlendi. Losartan alan grupta trombospondin-1, TGF- β ve fibronektinde azalma gözlenirken alfa aktin seviyesinde artış olduğu saptandı. Kastre edilmiş sıçanların korpus kavernozumlarında fibrozis anlamlı olarak artarken, losartan tedavisi bu oranı azalttı (111).

He ve ark. nörojenik paralizi sonrası mesanede gelişen fibrozis ve renal fonksiyonun bozulmasına losartanın koruyucu etkisini araştırdı. Spinal sinir grubu kesilerek mesanede paralizi oluşturulan sıçanlar losartan alan ve almayan olarak iki gruba bölündü. Operasyon sonrası 32. günde mesane kapasitesi, mesane kompliyansı ve mesane kaçırma basıncı sistometri

ile ölçüldü. Kandan renal fonksiyon testleri ve anjiotensin-2 değerleri, mesane dokusundan ise Ang-2, Ang-2 tip1 reseptörü, TGF- β 1, COL-3 ve kollajen fibrin değerleri ölçüldü. Sonuçlar değerlendirildiğinde losartan grubunda böbrek fonksiyonlarının tedavi almayan gruba göre daha iyi olduğu gözlemlendi. TGF- β 1, COL-3 ve kollajen fibrin değerleri losartan grubunda önemli ölçüde daha az tespit edildi (112).

Tavşanlarda trabekülektomi sonrası gözde oluşan skarı azaltmak amacıyla losartanın antifibrotik etkinliği Shi ve ark. tarafından çalışıldı. Trabekülektomi sonrası losartan 0,1,2,3,5 ve 7. günlerde subkonjunktival olarak enjekte edildi. 28 günlük takip sonucunda yapılan incelemede losartanın hücre proliferasyonunu, migrasyonunu, transdifferasyonunu, α -SMA ve TGF- β 1'i azaltarak fibrozis gelişimini inhibe ettiği gözlemlendi (113).

Resesif epidermolizis bülloza; kollajen tip-7 eksikliğinde ortaya çıkan ve bozulmuş yara iyileşmesi sonucu el ve ayak parmaklarında deformite, eklem kontraktürleri ve yumuşak doku fibrozisi gibi klinik bulgularla ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu hastalığın patogeneğinde TGF- β 1'in önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Nyström ve ark. ratlarda losartanın TGF- β üzerindeki inhibisyon etkisinin fibrozis oluşumundaki rolünü değerlendirdi. Kollajen tip-7 hipomorfolojisi olan ratlara oral losartan verilerek 7 hafta takip edildi. Çalışmanın sonucunda losartanın TGF- β 'yi inhibe ederek fibrozisi azalttığı gözlemlendi (114).

Çalışmamızda losartan 30 mg/kg dozunda ve gavaj olarak verildi. Histopatolojik değerlendirmede losartan; submukozal hemoraji, vasküler konjesyon, epitelyal dejenerasyon, fibrozis ve inflamasyon parametrelerinde darlık grubuna üstünlük sağladı. Losartan alan hayvanlarda darlık grubuna göre fibrozis miktarında önemli ölçüde azalma kaydedildi. Darlık grubunda hayvanların %75'inde yüksek, %25'inde ise orta düzey yoğunlukta fibrozis gözlemlendi. Losartan grubunda ise yüksek düzeyde fibrozise rastlanmadı, orta düzey fibrozis ise sadece bir hayvanda gözlemlendi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Darlık grubundaki hayvanların %87'şinde yüksek oranda epitelyal dejenerasyon vardı, losartan grunda ise %12,5 oranında yüksek düzeyde epitelyal dejenerasyona rastlandı. Bu sonuçlar; losartanın travmaya bağlı hasarın iyileştirilmesine katkı sağladığını göstermektedir. İmmünohistokimyasal değerlendirmede IL-1 β yoğunluğu karşılaştırıldı. Darlık grubunda IL-1 β yoğunluğu hayvanların %75'inde orta düzeydeyken %25'inde zayıf düzeyde gözlemlendi. Losartan alan grubun %87,5'inde zayıf yoğunlukta iken %12,5'inde ise IL-1 β yoğunluğu gözlenmedi. Losartan darlık grubuna göre IL-1 β yoğunluğunu azaltmada üstünlük sağladı (p=0,002). PCR sonuçlarında ise TGF-1 β , COL1A1, COL3A1, elastin, α -SMA, PDGF- α ,

PDGF- β genleri karşılaştırıldı. Losartan grubunda bütün gen ekspresyonlarında darlık ve kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı azalma ortaya çıktı. Bulgularımızı birlikte değerlendirdiğimizde losartanın üretral dokuda meydana gelen fibrozisi azalttığı sonucuna vardık. Çalışmamız üretra darlığında losartan tedavisinin denendiği ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Literatür incelendiğinde sonuçlarımızın losartanın farklı organlardaki fibrozis üzerine olan etkiyle benzerlik gösterdiğini görmekteyiz.

Doksisiklinin birçok dokuda fibrozisi azaltıcı etkinliği çalışmalarda gösterildi. Fujita ve ark. bleomisin ile fibrozis indüklenen farelerin akciğerlerinde doksisiklinin antifibrotik etkinliğini araştırdı. Histolojik değerlendirmede fibrozisin azaldığı gözlemlendi. PCR analizinde ise COL-1, CTGF, TGF- β 1, MMP-2 ve MMP-9 seviyelerinde azalma olduğu gözlemlendi. Doksisiklinin idiopatik pulmoner fibroziste etkili bir ajan olabileceği sonucu paylaşıldı (115).

Trabekülektomi sonrası oluşan skarı azaltmak amacıyla doksisiklinin etkinliğini Sen ve ark. araştırdı. Çalışmada doksisiklinin topikal ve enjeksiyon formları bu tedavide altın standart olarak kabul edilen mitomisin c ile karşılaştırıldı. Fibrozis ve inflamasyon skorlamaları ile MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 ve TIMP-1 ekspresyonları ölçüldü. Skarın iyileşmesinde topikal doksisiklinin, kontrol grubu ve enjeksiyon grubuna üstün olduğu ve mitomisin ile benzer etkinlikte olduğu gözlemlendi (116).

Hori ve ark. izoproterenol ile indüklenen myokard fibrozisini azaltmada doksisiklinin başarılı olduğunu ortaya koydu. Ratlar kontrol, izoproterenol ve izoproterenol+doksisiklin grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı. Histopatolojik değerlendirmede fibrozis skoru, western blot yöntemi ile ise MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ölçüldü. İzoproterenol+doksisiklin grubunda hem fibrozisin skorunda hem de MMP-2 ve MMP-9 değerlerinde izoproterenol grubuna göre oldukça azalma olduğu gözlemlendi. Fibrozis skoru izoproterenol +doksisiklin grubunda kontrol grubuna göre fazla iken, MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri bu iki grupta anlamlı farklılık göstermedi. Çalışma bize doksisiklinin MMP inhibisyonu yaparak kardiyak fibrozisi azaltabileceğini göstermektedir (117).

İntratrakeal belomisin verilerek pulmoner fibrozisin indüklendiği ratlarda Huang ve ark. doksisiklinin antifibrotik başarı sergilediğini gösterdi. Bleomisin+doksisiklin alan grupta bleomisin grubuna göre fibrozis alanlarında belirgin düzelme ve kollajen tip-4 te %34.7 azalma oldu (118). Benzer bir çalışmayı da Fujita ve ark. yaptı. Bleomisin ile indüklenmiş pulmoner fibroziste, doksisiklin tedavisi uyguladı. Fibroziste prekürsör olarak bilinen serbest oksijen

radikalleri, apoptozis ve nötrofil kemotaksisini azaltarak pulmoner fibrozisi inhibe ettiğini gösterdi (119).

Cilt yaralarında oluşan skarda lokal subkutan olarak kullanılan doksisisiklinin antifibrotik özelliğe sahip olduğunu Moore ve ark. gösterdi. Doksisisiklin alan grupta skar kalınlığı kontrol grubuna göre %24.8 azalma gösterdi. Bu çalışma, lokal doksisisiklinin yara iyileşmesinde etkili olabileceğini ortaya koydu (58).

Çalışmamızda doksisisiklin 10mg/kg/gün dozunda ve gavaj olarak verildi. Histopatolojik incelemede doksisisiklin fibrozis yoğunluğunu darlık grubuna oranla azalttı. Yüksek yoğunluklu fibrozis darlık grubunun %75'inde varken, doksisisiklin grubunda ise bu oran %12,5 idi ve doksisisiklinin belirgin üstün olduğu gözlemlendi. Darlık grubunda %62,5 orta, %37,5 oranında zayıf düzeyde inflamasyon vardı. Doksisisiklin grubunda orta düzeyde inflamasyona rastlanmadı, hayvanların %75'inde zayıf düzeyde inflamasyon izlendi. Fibrozis ve inflamasyonda olduğu gibi vasküler konjesyon, epitelyal dejenerasyon ve submukozal hemoraji parametreleri incelendiğinde doksisisiklin darlık grubuna üstünlük sağladı. İmmünohistokimyasal değerlendirmede doksisisiklin grubu İL-1 β yoğunluğunu darlık grubuna göre anlamlı olarak azalttı. Doksisisiklin grubunda İL-1 β hayvanların %75'inde zayıf düzeyde ekspresyona edilirken, %25'inde ise ekspresyon gözlenmedi. PCR analizimizde doksisisiklin, bütün gen ekspresyonlarında darlık grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydetti. Sonuçlarımız doksisisiklinin doku iyileştirmesini arttırarak fibrozisi azalttığını göstermektedir. Çalışmamız, doksisisiklinin üretra darlığında tedavi amacıyla kullanıldığı ilk çalışmadır.

Kullanılan ilaçların karşılaştırılmasında; histopatolojik incelemede, fibrozisi en çok azaltan ajan rapamisin oldu. Losartan ikinci olurken, BOTOX ve doksisisiklin birbirlerine benzer düzeyde etkinlik gösterdiler. İnflamasyonu azaltmada rapamisin ile losartan aynı derecede etkili oldu ve BOTOX ile doksisisikline göre daha başarılıydı. Vasküler konjesyonu en fazla azaltan rapamisin ve ona yakın başarı oranıyla losartan oldu. Rapamisin; epitelyal dejenerasyon ve submukozal hemorajiyi en fazla azaltan ilaç oldu. Rapamisini losartan takip etti. BOTOX ve doksisisiklin birbirlerine üstünlük sağlayamadılar. İmmünohistokimyasal değerlendirmede rapamisin, botox ve doksisisiklin İL-1 β 'yi %75 oranında zayıf düzeyde ekspresyona ederken losartan grubunda zayıf ekspresyon oranı %87,5 oldu. PCR analizinde TGF- β , α -SMA ve COL-3'ü en fazla azaltan rapamisin oldu. Elastinin ve COL-1'in en düşük olduğu grup BOTOX grubu olarak izlendi. PDGF- α 'yı doksisisiklin ve rapamisin grupları en fazla azalttı. PDGF- β 'nin en düşük ekspresyonda olduğu grup ise losartan grubu oldu. Bulgulardaki bütün parametreler göz önüne alındığında rapamisinin darlığı azaltmada en başarılı ilaç olduğunu görmekteyiz.

Losartan rapamisinden sonra en başarılı ikinci ilaç oldu. BOTOX ile doksisiklin birbirlerine yakın başarı oranına sahip olmalarına rağmen özellikle histolojik sonuçlarda BOTOX'un biraz daha önde olduğunu görmekteyiz.



6. SONUÇ

Wistar cinsi erkek sıçan üretrasında, elektrokoagülasyon yöntemiyle yaptığımız üretral darlık modelinin başarılı olduğu gözlemlendi. Üretra darlığı tedavisinde yeni araştırmaların odak noktası fibrozisi azaltmaya yöneliktir. Bu alanda etkinliği gösterilmiş birçok ajan olsa da, tedavide kullanılabilir en ideal ilacı bulma çalışmaları devam etmektedir. Çalışmamızda kullandığımız rapamisin, losartan, doksisisiklin ve BOTOX'un fibrozisi azalttığını gösterdik. Rapamisin en başarılı ilaç olurken, losartan ikinci ilaç oldu. Doksisisiklin ve BOTOX benzer etkinlik gösterdi. Fibrozisi değerlendirmek için histopatolojik, immünohistokimyasal ve PCR'ı da içeren geniş bir parametre ağı kullandık. Losartan ve doksisisiklin üretra darlığında ilk defa bizim çalışmamızda kullanılmıştır. Yine çalışmamız rapamisinin üretra darlığındaki üçüncü, BOTOX'un ise kullanıldığı ikinci çalışmadır. Bu ilaçların üretra darlığında kullanılabilmesi için başka çalışmalar ve daha fazla veriye ihtiyaç vardır. Çalışmamızın bu alanda literatüre katkı sağlayacağına ve yeni çalışmalar için bir dayanak noktası olabileceğine inanıyoruz.

ÖZET

Sıçan Deneysel Üretral Travma Modelinde, Losartan, Rapamisin, Doksisisiklin ve Botulinum Toksin A'nın Etkileri

Üretra darlığı, üretra epitelinde meydana gelen hasar sonucu iyileşme esnasında fibrozise bağlı darlığın ortaya çıktığı bir hastalıktır. Mevcut cerrahi tedavilerin kür sağlamada yeterli olmadığı önemli bir sağlık sorunudur. Çalışmamızda sıçanlar üzerinde deneysel darlık modeli oluşturularak; losartan, rapamisin, doksisisiklin ve botulinum toksin A'nın üretra darlığı üzerindeki etkilerini araştırdık.

Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen, 260-460 g ağırlığında Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. 60 adet sıçan 6 gruba ayrıldı. Grup 1; kontrol (n:10), grup 2; darlık (n:10), grup 3:losartan (n:10), grup 4; doksisisiklin (n:10), grup 5; rapamisin (n:10), grup 6: botulinum toksin A (n:10). Genel anestezi altında bütün gruplara 0. günde penoskrotal insizyon yapıldı. 2-6. gruplarda elektrokoagülasyon ile darlık modeli oluşturuldu. 6. grubun üretrasına botulinum toksin A enjekte edildi. 14 gün sonra tüm hayvanlar sakrifiye edilerek üretra diseksiyonu yapıldı.

Histopatolojik değerlendirmede darlık grubunda; submukozal hemoraji, epitelyal dejenerasyon, vasküler konjesyon, inflamasyon ve fibroziste kontrol grubuna göre önemli artışlar olduğu ve losartan, rapamisin, doksisisiklin ve botulinum toksin A gruplarında bu parametlerde belirgin iyileşme olduğu kaydedildi. İmmünohistokimyasal değerlendirmede; tedavi gruplarında İL-1 β immünreaksiyonunda darlık grubuna göre önemli derecede azalma olduğu gözlemlendi. PCR analizinde tedavi grupları elastin, TGF- β , PDGF- α , α -SMA, PDGF- β , COL-1 ve COL-3 ekspresyonlarında darlık ve kontrol gruplarına göre önemli derecede azalma sağladı (p<0,001). Tedavi gruplarında; bütün parametreler birlikte değerlendirildiğinde rapamisin üretra darlığında en etkili ilaç oldu. Losartan, rapamisinden sonra ikinci başarılı ilaç oldu. Doksisisiklin ve botulinum toksin A benzer etkinliğe sahip oldu.

Çalışmamız; losartan ve doksisisiklinin üretra darlığında kullanıldığı ilk çalışmadır. Yine çalışmamız botulinum toksin A'nın kullanıldığı ikinci ve rapamisinin kullanıldığı üçüncü çalışma özelliğini taşımaktadır. Çalışmamızda kullanılan ilaçların üretra darlığında etkili olduğunu gösterdik. Ancak bu çalışmayı destekleyecek yeni çalışmalara ve klinik kullanım için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Üretra darlığı, rat, losartan, rapamisin, doksisisiklin, botulinum toksin A

SUMMARY

Investigation of the effects of Losartan, Rapamycin, Doxycycline and Botulinum Toxin A according to experimental urethral trauma model in rats with urethral injury.

Urethral stricture occurs as a result of damage to the urethral epithelium, and stenosis occurs due to fibrosis during healing. The fact that current surgical treatments are not sufficient to provide cure is considered as an important health problem. In our study, experimental stenosis was created on rats and then the effects of losartan, rapamycin, doxycycline and botulinum toxin A on urethral stricture were investigated.

The total of 60 adult male Wistar rats weighing between 260-460 g, were obtained from Süleyman Demirel University Experimental Animal Production and Experimental Research Laboratory. Six groups were formed with these rats used in the study. The groups could be listed as follows: Group 1; control (n:10), group 2; stenosis (n:10), group 3: losartan (n:10), group 4; doxycycline (n:10), group 5; rapamycin (n:10), group 6: botulinum toxin A (n:10). On day 0, penoscrotal incision was performed in all groups under general anesthesia. A stenosis model was created by electrocoagulation for groups other than the first group. Botulinum toxin A was injected into the urethra of the sixth group. After 14 days, all animals were sacrificed and the urethra was dissected.

Histopathology examination results showed that there were significant increases in submucosal hemorrhage, epithelial degeneration, vascular congestion, inflammation and fibrosis in the stenosis group compared to the control group. The results also revealed significant improvement in these parameters in losartan, rapamycin, doxycycline and botulinum toxin A groups.

Immunohistochemical evaluation results indicated that it was significant decrease in IL-1B immune reaction in the treatment groups compared to the stenosis group. PCR analysis results showed that elastin, TGF-B, PDGF-A, α -SMA, PDGF-B, collagen type1 and collagen type3 expressions were significantly decreased in the treatment groups compared to the stenosis and control groups ($p < 0.001$). The results of the study show that Rapamycin is the most effective drug in urethral stricture in all treatment groups when all parameters was considered. Losartan was determined to be the most effective drug after rapamycin. In addition, Doxycycline and botulinum toxin A were found to have equivalent efficacy.

The current thesis is the first study in which losartan and doxycycline were used for urethral stricture. In addition, this study is the second study in the literature using botulinum toxin A and the third study using rapamycin. Results revealed that the drugs used are effective in urethral stricture. However, new studies to support this study and more data for clinical use are needed.

Keywords: Urethral stricture, Rat, Losartan, Rapamycin, Doxycylin, Botulinum Toxin A.



KAYNAKÇA

1. Verla W, Oosterlinck W, Spinoit A-F, Waterloos M. A comprehensive review emphasizing anatomy, etiology, diagnosis, and treatment of male urethral stricture disease. *BioMed research international*. 2019;2019.
2. Ayyildiz A, Nuhoglu B, GüLERKAYA B, Caydere M, ÜSTÜN H, Germiyanoglu C, et al. Effect of intraurethral Mitomycin- C on healing and fibrosis in rats with experimentally induced urethral stricture. *International Journal of Urology*. 2004;11(12):1122-6.
3. Hu W-F, Li C-L, Zhang H-P, Li T-T, Zeng X-Y. An experimental model of urethral stricture in rabbits using holmium laser under urethroscopic direct visualization. *Urologia internationalis*. 2014;93(1):108-12.
4. Sangkum P, Yafi FA, Kim H, Bouljihad M, Ranjan M, Datta A, et al. Collagenase Clostridium histolyticum (Xiaflex) for the treatment of urethral stricture disease in a rat model of urethral fibrosis. *Urology*. 2015;86(3):647. e1-. e6.
5. Barbalias D, Lappas G, Ravazoula P, Liourdi D, Kyriazis I, Liatsikos E, et al. Evaluation of the distribution of paclitaxel after application of a paclitaxel-coated balloon in the rabbit urethra. *Journal of Endourology*. 2018;32(5):381-6.
6. Liourdi D, Kallidonis P, Kyriazis I, Tsamandas A, Karnabatidis D, Kitrou P, et al. Evaluation of the distribution of Paclitaxel by immunohistochemistry and nuclear magnetic resonance spectroscopy after the application of a drug-eluting balloon in the porcine ureter. *Journal of endourology*. 2015;29(5):580-9.
7. Elliott* S, Virasoro R, DeLong J, Estrella R, Pichardo M, Pichardo M, et al. PD22-06 one-year safety and efficacy outcomes on a novel drug coated balloon (DCB) for urethral stricture disease-the ROBUST I study. *The Journal of Urology*. 2019;201(Supplement 4):e389-e90.
8. Ali L, Shahzad M, Orakzai N, Khan I, Ahmad M. Efficacy of mitomycin C in reducing recurrence of anterior urethral stricture after internal optical urethrotomy. *Korean journal of urology*. 2015;56(9):650-5.
9. Kurt O, Yesildag E, Yazici CM, Aktas C, Ozcaglayan O, Bozdemir Y. Effect of tadalafil on prevention of urethral stricture after urethral injury: an experimental study. *Urology*. 2016;91:243. e1-. e6.
10. Fu D, Chong T, Li H, Zhang H, Wang Z. Docetaxel inhibits urethral stricture formation, an initial study in rabbit model. *PLoS One*. 2014;9(11):e112097.
11. Rezaei M, Badiie R, Badiie R. The effect of platelet-rich plasma injection on post-internal urethrotomy stricture recurrence. *World journal of urology*. 2019;37(9):1959-64.
12. Shirazi M, Khezri A, Samani SM, Monabbati A, Kojoori J, Hassanpour A. Effect of intraurethral captopril gel on the recurrence of urethral stricture after direct vision internal urethrotomy: Phase II clinical trial. *International journal of urology*. 2007;14(3):203-8.
13. Benjamin I. Chung, Sommer G, Brooks JD. Campbell-Walsh Üroloji. In: Wein AJ, editor. *alt Üriner Sistem ve Erkek Genital Sistem anatomisi*. 10 ed2014. p. 56-60.
14. Baykara M. Temel Üroloji. In: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N, editors. *Ürogenital Organların anatomik ve Histolojik yapısı*2007. p. 13-4.

15. Kızılay F, Şimşir a. Üretra Darlıklarına güncel Yaklaşım Özel Sayısı. Türkiye Klinikleri Üroloji. 2016;9:5-7.
16. Jung W-G, Cho S-Y, Lee J-Y. Anatomical Features of Male Rat Urethra and Comparison of Urethral Sphincter Contractility according to Different Urethral Strip Orientations. Korean Journal of Urology. 2002;887-93.
17. gürkan arıkan ha. ürogenital travmalarla ilgili sık kullanılan deney hayvan modelleri. In: bilal eryıldırım ak, editor. ürolojide sık kullanılan deney hayvan modelleri2020. p. 283.
18. Kurzrock EA, Baskin LS, Cunha GR. Ontogeny of the male urethra: theory of endodermal differentiation. Differentiation. 1999;64(2):115-22.
19. Park JM. Campbell-Walsh Üroloji 10. Baskı. In: Wein AJ, editor. Ürogenital Sistemin Normal Gelişimi2014. p. 2989-95.
20. Özgür GK, Özyavuz R. Temel Üroloji. In: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N, editors. Ürogenital Sistemin Embriyolojisi2007. p. 21-2.
21. Latini JM, McAninch JW, Brandes SB, Chung JY, Rosenstein D. SIU/ICUD consultation on urethral strictures: epidemiology, etiology, anatomy, and nomenclature of urethral stenoses, strictures, and pelvic fracture urethral disruption injuries. Urology. 2014;83(3):S1-S7.
22. Santucci RA, Joyce GF, Wise M. Male urethral stricture disease. The Journal of urology. 2007;177(5):1667-74.
23. Anger JT, Buckley JC, Santucci RA, Elliott SP, Saigal CS, Project UDiA. Trends in stricture management among male Medicare beneficiaries: underuse of urethroplasty? Urology. 2011;77(2):481-5.
24. Santucci RA, Payne CK, Saigal CS, Project UDiA. Office dilation of the female urethra: a quality of care problem in the field of urology. The Journal of urology. 2008;180(5):2068-75.
25. Conti P, Caraffa A, Mastrangelo F, Tettamanti L, Ronconi G, Frydas I, et al. Critical role of inflammatory mast cell in fibrosis: Potential therapeutic effect of IL- 37. Cell Proliferation. 2018;51(5):e12475.
26. Dees C, Chakraborty D, Distler JH. Cellular and molecular mechanisms in fibrosis. Experimental Dermatology. 2021;30(1):121-31.
27. Fenton AS, Morey AF, Aviles R, Garcia CR. Anterior urethral strictures: etiology and characteristics. Urology. 2005;65(6):1055-8.
28. Stein DM, Thum DJ, Barbagli G, Kulkarni S, Sansalone S, Pardeshi A, et al. A geographic analysis of male urethral stricture aetiology and location. BJU international. 2013;112(6):830-4.
29. Lumen N, Hoebeke P, Willemsen P, De Troyer B, Pieters R, Oosterlinck W. Etiology of urethral stricture disease in the 21st century. The Journal of urology. 2009;182(3):983-7.
30. Rassweiler J, Teber D, Kuntz R, Hofmann R. Complications of transurethral resection of the prostate (TURP)—incidence, management, and prevention. European urology. 2006;50(5):969-80.
31. Urethral Strictures. European Association of Urology. 2021.

32. Nuss GR, Granieri MA, Zhao LC, Thum DJ, Gonzalez CM. Presenting symptoms of anterior urethral stricture disease: a disease specific, patient reported questionnaire to measure outcomes. *The Journal of urology*. 2012;187(2):559-62.
33. Gallentine ML, Morey AF. Imaging of the male urethra for stricture disease. *Urologic Clinics*. 2002;29(2):361-72.
34. Wessells H, Angermeier KW, Elliott S, Gonzalez CM, Kodama R, Peterson AC, et al. Male urethral stricture: American urological association guideline. *The Journal of urology*. 2017;197(1):182-90.
35. Kumano Y, Kawahara T, Mochizuki T, Takamoto D, Takeshima T, Kuroda S, et al. Management of urethral stricture: High- pressure balloon dilation versus optical internal urethrotomy. *LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms*. 2019;11(2):O34-O7.
36. Karsli O, Ustuner M, Memik O, Ulukaradag E. Comparison of Urethral Dilation with Amplatz Dilators and Internal Urethrotomy Techniques for the Treatment of Urethral Strictures. *Urology journal*. 2020;17(1):68-72.
37. Yu S-c, Wu H-y, Wang W, Xu L-w, Ding G-q, Zhang Z-g, et al. High-pressure balloon dilation for male anterior urethral stricture: single-center experience. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 2016;17(9):722-7.
38. Milroy E, Cooper J, Wallsten H, Chapple C, Eldin A, Seddon A, et al. A new treatment for urethral strictures. *The Lancet*. 1988;331(8600):1424-7.
39. BADLANI GH. Role of permanent stents. *Journal of endourology*. 1997;11(6):473-5.
40. Soria F, Morcillo E, Lopez de Alda A, Pastor T, Sanchez-Margallo F. Biodegradable catheters and urinary stents. When? *Archivos espanoles de urologia*. 2016;69(8):553-64.
41. Joran GH, McCammon KA. penis ve üretra cerrahisi. In: Wein AJ, editor. *Campbell-Walsh üroloji 10 Baskı*2014. p. 971-2.
42. Sachse H. Treatment of urethral stricture: transurethral slit in view using sharp section. *Fortschritte der Medizin*. 1974;92(1):12-5.
43. Djulepa J, Potempa J. Urethrotomy technique in urethral strictures: 6-year results. *The Journal of urology*. 1983;129(5):955-7.
44. Naudé AM, Heyns CF. What is the place of internal urethrotomy in the treatment of urethral stricture disease? *Nature clinical practice Urology*. 2005;2(11):538-45.
45. Steenkamp J, Heyns C, De Kock M. Internal urethrotomy versus dilation as treatment for male urethral strictures: a prospective, randomized comparison. *The journal of Urology*. 1997;157(1):98-101.
46. Al Taweel W, Seyam R. Visual internal urethrotomy for adult male urethral stricture has poor long-term results. *Advances in urology*. 2015;2015.
47. Tao J, Hong L, Jiang L-h, Li W, Wang K-j. Safety and efficacy of laser and cold knife urethrotomy for urethral stricture. *LWW*; 2009.
48. Andrich DE, Mundy AR. What is the best technique for urethroplasty? *European urology*. 2008;54(5):1031-41.
49. Barbagli G, Palminteri E, Lazzeri M, Guazzoni G. Anterior urethral strictures. *BJU international*. 2003;92(5):497-505.

50. Waxman SW, Morey AF. Management of urethral strictures. *Lancet (London, England)*. 2006;367(9520):1379-80.
51. Barbagli G, Vallasciani S, Romano G, Fabbri F, Guazzoni G, Lazzeri M. Morbidity of oral mucosa graft harvesting from a single cheek. *European urology*. 2010;58(1):33-41.
52. Markiewicz MR, Lukose MA, Margarone JE, Barbagli G, Miller KS, Chuang S-K. The oral mucosa graft: a systematic review. *The Journal of urology*. 2007;178(2):387-94.
53. Grossman TH. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016;6(4):a025387.
54. Cunha BA, Sibley CM, Ristuccia AM. Doxycycline. *Therapeutic drug monitoring*. 1982;4(2):115-35.
55. Peyriere H, Makinson A, Marchandin H, Reynes J. Doxycycline in the management of sexually transmitted infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(3):553-63.
56. Hua X-F, Li X-H, Li M-M, Zhang C-Y, Liu H-J, Sun T, et al. Doxycycline attenuates paraquat-induced pulmonary fibrosis by downregulating the TGF- β signaling pathway. *Journal of thoracic disease*. 2017;9(11):4376.
57. Li H, Ezra DG, Burton MJ, Bailly M. Doxycycline prevents matrix remodeling and contraction by trichiasis-derived conjunctival fibroblasts. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(7):4675-82.
58. Moore AL. Doxycycline reduces scar thickness and improves collagen architecture. *Annals of surgery*. 2020;272(1):183.
59. Sica DA, Gehr TW, Ghosh S. Clinical pharmacokinetics of losartan. *Clinical pharmacokinetics*. 2005;44(8):797-814.
60. Munshi MK, Uddin MN, Glaser SS. The role of the renin-angiotensin system in liver fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236(5):557-66.
61. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(9):1383-94.
62. Rimola A, Londoño M-C, Guevara G, Bruguera M, Navasa M, Forns X, et al. Beneficial effect of angiotensin-blocking agents on graft fibrosis in hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Transplantation*. 2004;78(5):686-91.
63. Corey KE, Shah N, Misdraji J, Abu Dayyeh BK, Zheng H, Bhan AK, et al. The effect of angiotensin- blocking agents on liver fibrosis in patients with hepatitis C. *Liver International*. 2009;29(5):748-53.
64. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney international*. 1995;47(5):1285-94.
65. Heinze G, Mitterbauer C, Regele H, Kramar R, Winkelmayr WC, Curhan GC, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin II type 1 receptor antagonist therapy is associated with prolonged patient and graft survival after renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(3):889-99.

66. Zheng B, Fang Q-Q, Wang X-F, Shi B-H, Zhao W-Y, Chen C-Y, et al. The effect of topical ramipril and losartan cream in inhibiting scar formation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;118:109394.
67. Vezina C, Kudelski A, Sehgal S. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics*. 1975;28(10):721-6.
68. Özcan Ö, Dikmen M. Kanser Tedavisinde mTOR İnhibitörleri. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2015;19(3).
69. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science*. 2009;122(20):3589-94.
70. Moes DJA, Guchelaar H-J, de Fijter JW. Sirolimus and everolimus in kidney transplantation. *Drug discovery today*. 2015;20(10):1243-9.
71. Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD, Vanrenterghem Y, Neylan J, Group RS. SIROLIMUS REDUCES THE INCIDENCE OF ACUTE REJECTION EPISODES DESPITE LOWER CYCLOSPORINE DOSES IN CAUCASIAN RECIPIENTS OF MISMATCHED PRIMARY RENAL ALLOGRAFTS: A PHASE II TRIAL1. *Transplantation*. 1999;68(10):1526-32.
72. Chen Y-B, Sun Y-A, Gong J-P. Effects of rapamycin in liver transplantation. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT*. 2008;7(1):25-8.
73. Ussetti P, Laporta R, De Pablo A, Carreno C, Segovia J, Pulpón L, editors. Rapamycin in lung transplantation: preliminary results. *Transplantation proceedings*; 2003: Elsevier.
74. Leducq S, Giraudeau B, Tavernier E, Maruani A. Topical use of mammalian target of rapamycin inhibitors in dermatology: a systematic review with meta-analysis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2019;80(3):735-42.
75. Roos JC, Eglitis V, Murthy R. Inhibition of Fibrotic Contraction by Sirolimus (Rapamycin) in an Ex Vivo Model of Thyroid Eye Disease. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*. 2020;37(4):366-71.
76. Chong T, Fu D-l, Li H-c, Zhang H-b, Zhang P, Gan W-m, et al. Rapamycin inhibits formation of urethral stricture in rabbits. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011;338(1):47-52.
77. Ting PT, Freiman A. The story of Clostridium botulinum: from food poisoning to Botox. *Clin Med (Lond)*. 2004;4(3):258-61.
78. Sotos JG. Botulinum toxin in biowarfare. *JAMA*. 2001;285(21):2716.
79. Yiannakopoulou E. Serious and long-term adverse events associated with the therapeutic and cosmetic use of botulinum toxin. *Pharmacology*. 2015;95(1-2):65-9.
80. Schantz EJ, Johnson EA. Botulinum toxin: the story of its development for the treatment of human disease. *Perspectives in Biology and Medicine*. 1997;40(3):317-27.
81. Setler PE. Therapeutic use of botulinum toxins: background and history. *The Clinical journal of pain*. 2002;18(6):S119-S24.
82. Austin E, Koo E, Jagdeo J. The cellular response of keloids and hypertrophic scars to botulinum toxin A: a comprehensive literature review. *Dermatologic Surgery*. 2018;44(2):149-57.

83. Jabbari B. History of botulinum toxin treatment in movement disorders. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements*. 2016;6.
84. Jabbari B, editor *Botulinum toxin treatment in neurology*. *Seminars in neurology*; 2016: Thieme Medical Publishers.
85. Duthie JB, Vincent M, Herbison GP, Wilson DI, Wilson D. Botulinum toxin injections for adults with overactive bladder syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011(12).
86. El Agha E, Kramann R, Schneider RK, Li X, Seeger W, Humphreys BD, et al. Mesenchymal stem cells in fibrotic disease. *Cell stem cell*. 2017;21(2):166-77.
87. Hofer MD, Cheng EY, Bury MI, Park E, Xu W, Hong SJ, et al. Analysis of primary urethral wound healing in the rat. *Urology*. 2014;84(1):246. e1-. e7.
88. Meria P, Anidjar M, Brouland JP, Teillac P, Le Duc A, Berthon P, et al. An experimental model of bulbar urethral stricture in rabbits using endoscopic radiofrequency coagulation. *Urology*. 1999;53(5):1054-7.
89. Faydacı G, Tarhan F, Tuncer M, Eryıldırım B, Celik O, Keser SH, et al. Comparison of two experimental models for urethral stricture in the anterior urethra of the male rabbit. *Urology*. 2012;80(1):225. e7-. e11.
90. Sievert K-D, Selent-Stier C, Wiedemann J, Greiner T-O, Amend B, Stenzl A, et al. Introducing a large animal model to create urethral stricture similar to human stricture disease: a comparative experimental microscopic study. *The Journal of urology*. 2012;187(3):1101-9.
91. faydacı g. ürolojide sık kullanılan deney hayvan modeli. bilal yıldırım ak, editor2020. 379-81 p.
92. Mangir N, Chapple C. Recent Advances in treatment of urethral stricture disease in men. *F1000Research*. 2020;9.
93. Igarashi N, Honjo M, Aihara M. Effects of mammalian target of rapamycin inhibitors on fibrosis after trabeculectomy. *Experimental Eye Research*. 2021;203:108421.
94. Tai X, Shen Y, Zhao H, Wang Z, Guan W, Kang X, et al. Anti-scarring effect of rapamycin following filtering surgery in rabbit eyes. *Nan Fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*. 2020;40(9):1346-52.
95. Kang X, Shen Y, Zhao H, Wang Z, Guan W, Ge R, et al. Anti-scarring effect of rapamycin in rabbits following glaucoma filtering surgery. *Nan Fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*. 2018;38(11):1389-94.
96. Li J, Du S, Shi Y, Han J, Niu Z, Wei L, et al. Rapamycin ameliorates corneal injury after alkali burn through methylation modification in mouse TSC1 and mTOR genes. *Experimental Eye Research*. 2021;203:108399.
97. Liang M, Dang H, Li Q, Huang W, Liu C. Effects of rapamycin and OSI-027 on α -SMA in lung tissue of SD rat pups with hyperoxic lung injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2021;556:39-44.
98. Zhang C, Chan CC, Cheung KF, Chau MK, Yap DY, Ma MK, et al. Effect of mycophenolate and rapamycin on renal fibrosis in lupus nephritis. *Clinical Science*. 2019;133(15):1721-44.

99. Liu J, Jiang C-M, Feng Y, Zhu W, Jin B, Xia Y-Y, et al. Rapamycin inhibits peritoneal fibrosis by modifying lipid homeostasis in the peritoneum. *American journal of translational research*. 2019;11(3):1473.
100. Lin H, Wang T, Ruan Y, Liu K, Li H, Wang S, et al. Rapamycin Supplementation May Ameliorate Erectile Function in Rats With Streptozotocin–Induced Type 1 Diabetes by Inducing Autophagy and Inhibiting Apoptosis, Endothelial Dysfunction, and Corporal Fibrosis. *The journal of sexual medicine*. 2018;15(9):1246-59.
101. Fu D, Yin J, Huang S, Li H, Li Z, Chong T. Rapamycin inhibits the growth and collagen production of fibroblasts derived from human urethral scar tissue. *BioMed research international*. 2018;2018.
102. Zhou N, Li D, Luo Y, Li J, Wang Y. Effects of Botulinum Toxin Type A on Microvessels in Hypertrophic Scar Models on Rabbit Ears. *BioMed Research International*. 2020;2020.
103. Liu D-q, Li X-j, Weng X-j. Effect of BTXA on inhibiting hypertrophic scar formation in a rabbit ear model. *Aesthetic plastic surgery*. 2017;41(3):721-8.
104. Li YH, Yang J, Zheng Z, Hu DH, Wang ZD. Botulinum toxin type A attenuates hypertrophic scar formation via the inhibition of TGF- β 1/Smad and ERK pathways. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2021;20(5):1374-80.
105. Huang Y-L, Wallace CG, Hsiao Y-C, Lee M-C, Huang J-J, Chang FC-S, et al. Botulinum toxin to improve lower blepharoplasty scar: a double-blinded, randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Aesthetic Surgery Journal*. 2021.
106. Liu X-H, Wang Y, Liu G, Qin J-L, Li W-W, Gao D-J. Local injection of BTX-A prevents iatrogenic anterior urethral stricture in rabbits. *Zhonghua nan ke xue= National Journal of Andrology*. 2020;26(4):303-8.
107. Kim MD, Baumlin N, Yoshida M, Polineni D, Salathe SF, David JK, et al. Losartan rescues inflammation-related mucociliary dysfunction in relevant models of cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2020;201(3):313-24.
108. Song J, Xia Y, Yan X, Luo J, Jiang C, Zhang M, et al. Losartan accelerates the repair process of renal fibrosis in UUO mouse after the surgical recanalization by upregulating the expression of Tregs. *International urology and nephrology*. 2019;51(11):2073-81.
109. Couluris M, Kinder BW, Xu P, Gross-King M, Krischer J, Panos RJ. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with losartan: a pilot project. *Lung*. 2012;190(5):523-7.
110. Gay-Jordi G, Guash E, Benito B, Brugada J, Nattel S, Mont L, et al. Losartan prevents heart fibrosis induced by long-term intensive exercise in an animal model. *PloS one*. 2013;8(2):e55427.
111. Kucukdurmaz F, Efe E, Kurutas EB, Olmez C, Temizer M, Resim S. Losartan treatment significantly attenuates the fibrotic changes in the corpus cavernosum of castrated rats. *Revista internacional de andrologia*. 2020;18(1):14-20.
112. He YL, Wen JG, Pu QS, Wen YB, Zhai RQ, Chen Y, et al. Losartan prevents bladder fibrosis and protects renal function in rat with neurogenic paralysis bladder. *Neurourology and urodynamics*. 2021;40(1):137-46.
113. Shi H, Wang H, Fu S, Xu K, Zhang X, Xiao Y, et al. Losartan attenuates scar formation in filtering bleb after trabeculectomy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017;58(3):1478-86.

114. Nyström A, Thriene K, Mittapalli V, Kern JS, Kiritsi D, Dengjel J, et al. Losartan ameliorates dystrophic epidermolysis bullosa and uncovers new disease mechanisms. *EMBO molecular medicine*. 2015;7(9):1211-28.
115. Fujita M, Ye Q, Ouchi H, Harada E, Inoshima I, Kuwano K, et al. Doxycycline attenuated pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(2):739-43.
116. Sen E, Balikoglu-Yilmaz M, Bozdag-Pehlivan S, Sungu N, Aksakal FN, Altinok A, et al. Effect of doxycycline on postoperative scarring after trabeculectomy in an experimental rabbit model. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*. 2010;26(5):399-406.
117. Hori Y, Kunihiro S-i, Sato S, Yoshioka K, Hara Y, Kanai K, et al. Doxycycline attenuates isoproterenol-induced myocardial fibrosis and matrix metalloproteinase activity in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2009;32(10):1678-82.
118. Huang Y, Li Y, Shang Y, Ouyang Z, Zhen Y. Inhibition of pulmonary fibrosis by doxycycline: an experiment with mice. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2006;86(3):182-6.
119. Fujita H, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kakugawa T, Hara S, Hara A, et al. Effects of doxycycline on production of growth factors and matrix metalloproteinases in pulmonary fibrosis. *Respiration*. 2011;81(5):420-30.