T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULAN SİSTİT ÜZERİNDE HÜNNAP MEYVESİNİN ETKİSİ

Perihan ULULAR

TIBBİ FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Cemil GÖÇMEN

ADANA-2024

T.C.

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULAN SİSTİT ÜZERİNDE HÜNNAP MEYVESİNİN ETKİSİ

Perihan ULULAR

TIBBİ FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Cemil GÖÇMEN

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2024-16575 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2024

KABUL VE ONAY

ETİK BEYANI

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 03/01/2025

Perihan ULULAR

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Farmakoloji
Tezin Konusu : Sıçanlarda Siklofosfamid ile Oluşturulan Sistit Üzerinde Hünnap Meyvesinin Etkisi

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: ☐

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Cemil GÖÇMEN
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon : (+90) 506 449 43 31
E-Posta : gocmenc@gmail.com
Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : (+90) 539 369 27 25
E-Posta : perihanulular95@gmail.com
Adresi :Turgut Özal Bulv 79102. Sk No:5 Daire: 14 Çukurova/Adana

TEŞEKKÜRLER

Eğitimimde çok büyük katkıları olan Çukurova Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet Ata SEÇİLMİŞ hocama, tez süresince ve öncesinde değerli katkıları ile her zaman yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cemil GÖÇMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince desteğini ve katkılarını esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç. Dr. Sinem BÜYÜKNACAR hocama ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma sonsuz teşekkürlerim sunarım.

Tezime katkılarından dolayı Çukurova Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Şeyda ERDOĞAN'a, Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Aysun ŞENER GEDÜK'e,, Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e ve Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'ndan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülçin DAĞLIOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü teknik ve idari personele ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan aileme de çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY……..……..ii

ETİK BEYAN…...……...…….……...iv

TEŞEKKÜRLER..……..…….…….……v

İÇİNDEKİLER…….vi

ŞEKİLLER DİZİNİ……..……..viii

ÇİZELGELER DİZİNİ…….……...…….xi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……xii

ÖZET……...……..xiii

ABSTRACT……...…….…..xiv

1. GİRİŞ……..…….…….……1

2. GENEL BİLGİLER……..……..……..3

2.1. MESANE…….…….……..3

2.2. SİSTİT……....5

2.3. SİKLOFOSFAMİD……....7

2.4. HÜNNAP…….…….…..8

3. GEREÇ VE YÖNTEM…….…….…….…..10

3.1. HÜNNAP EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI…..……...…….….10

3.2. DENEYSEL HAYVAN ÇALIŞMALARI…….……...…...10

3.3. HEMORAJİK SİSTİT OLUŞTURULMASI…….……...…10

3.4. DENEY GRUPLARI…….……..….11

3.5. İN VİTRO İZOLE TÜM MESANE BASINÇ ÇALIŞMALARI..……...11

3.6. HİSTOPATOLOJİK İNCELMELER……...……12

3.7. ANTİOKSİDAN MARKERLAR……...……..13

3.8. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ……..……13

3.9. KULLANILAN İLAÇLAR VE SOLÜSYON HAZIRLANMASI……..…14

4. BULGULAR…….……..15

4.1. BAZAL SPONTAN KASILMA, EĞRİ ALTINDAKİ ALAN VE FREKANS CEVAPLARI…….……..……..…15

4.2. KARBAKOL İLE OLUŞUTURULAN KASILMA CEVAPLARI…….....21

4.3. ELİZA DEĞERLENDİRMELERİ……..…….……24

4.4. HİSTOPATOLOJİ DEĞERLENDİRMELERİ…….…….…….….26

5. TARTIŞMA……..……...…….……..33

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER…….…….…….……..36

7. KAYNAKLAR……...…….…….…….…..38

8. ÖZGEÇMİŞ……..…….……43

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 1. Kontrol grubu (grup1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grup (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grup (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan elde edilen izole sıçan tüm mesane dokularında bazal spontan kasılma cevaplarının amplitüd (cm.su) değerleri. * Kontrol (grup 1) cevaplarına göre anlamlılığı, † hemorajik sistit (grup 2) grubuna göre anlamlılığı göstermektedir (p<005). …..……..**17**

ŞEKİL 2. Kontrol grubu (grup1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grup (grup3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grup (grup 4), Siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan elde edilen izole sıçan tüm mesane dokularında bazal spontan kasılma cevaplarının EAA (cm.su.saniye) değerleri. * Kontrol (grup 1) cevaplarına göre anlamlılığı, † hemorajik sistit (grup 2) grubuna göre anlamlılığı göstermektedir (p<005). ……**.18**

ŞEKİL 3. Kontrol grubu (grup 1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grup (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grup (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250 mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan elde edilen izole sıçan tüm mesane dokularında oluşan spontan kasılma cevaplarının frekans (kasılma sayısı/dakika); değerleri)….……..……**...19**

ŞEKİL 4. (a) Kontrol grubu (grup 1), (b) siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), (c) siklofosfamid + düşük doz (250 mg /kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve (d) siklofosfamid + yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 6) sıçan izole tüm mesane spontan fazik kasılmaların aktivitesini gösteren trase örnekleri.……...……...……**20**

ŞEKİL 5. Kontrol grubu (grup 1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grup (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grup (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan elde edilen izole sıçan tüm mesane dokularında 1 µM karbakol ile oluşturulan tonik kasılma üzerine binişik spontan fazik kasılma cevaplarının amplitüd (cm.su) değerleri. * Kontrol (grup 1) cevaplarına göre anlamlılığı, † hemorajik sistit (grup 2) grubuna göre anlamlılığı göstermektedir (p<005)...……..**22**

ŞEKİL 6. (a) Kontrol grubu (grup 1), (b) siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), (c) siklofosfamid + düşük doz (250 mg /kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve (d) siklofosfamid + yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 6) 1 µM karbakol ile oluşturulan tonik kasılmaları ve ardından bu tonik kasılma üzerinde gelişen binişik spontan fazik kasılmaların aktivitesini gösteren trase örnekleri.……...……...**23**

ŞEKİL 7. Kontrol grubu (grup 1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan alınan kan örneklerinden ölçülen CAT değerleri……....**24**

ŞEKİL 8. Kontrol grubu (grup 1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan alınan kan örneklerinden ölçülen SOD değerleri……..……..**25**

ŞEKİL 9. Kontrol grubu (grup 1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan alınan kan örneklerinden ölçülen MDA değerleri.……..……..**25**

ŞEKİL 10. Kontrol grubu (grup 1), normal karaciğer dokusu, portal alan ve parankim doğal sınırlarda görülüyor. x200 (Hematoksilen & Eozin boyama)……..……..**26**

ŞEKİL 11. Tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grupta (grup 3) izlenen tek hücre nekrozu okla işaretlenmiştir. x200 (Hematoksilen & Eozin boyama)……...…….**27**

ŞEKİL 12. Tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grupta (grup 4) izlenen tek hücre nekrozu okla işaretlenmiştir. x200 (Hematoksilen & Eozin boyama)……....**27**

ŞEKİL 13. Siklofosfamid+ düşük doz (250 mg /kg) HE verilen tedavi grubunda (grup 5) izlenen grade 1 portal inflamasyon alanı izleniyor. x400 (Hematoksilen & Eozin boyama)……**28**

ŞEKİL 14. Siklofosfamid+ yüksek doz (500 mg /kg) HE verilen tedavi grubunda (grup 6) izlenen grade 1 portal inflamasyon alanı izleniyor. x400 (Hematoksilen & Eozin boyama)……**28**

ŞEKİL 15. Siklofosfamid+ yüksek doz (500 mg /kg) HE verilen tedavi grubunda (grup 6) izlenen tek hücre nekrozu okla işaretlenmiştir. x400 (Hematoksilen & Eozin boyama)……**29**

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE 1. Kontrol grubu (grup 1) histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması……..……...……**29**

ÇİZELGE 2. Siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2) histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması…….……..**30**

ÇİZELGE 3. Tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grup (grup 3), histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması……...**30**

ÇİZELGE 4. Tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grup (grup 4), histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması……..…….**31**

ÇİZELGE 5. Siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5), histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması……...**31**

ÇİZELGE 6. Siklofosfamid + yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 6), histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması…….**32**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

HE	Hünnap ekstresi
EAA	Eğri altında kalan alan
CCh	Karbakol
i.p.	İntraperitoneal
CAT	Katalaz
SOD	Süperoksit dismutaz
MDA	Malondialdehit
ELIZA	Enzim bağlantılı sterünosorbent testi

ÖZET

Sıçanlarda Siklofosfamid ile Oluşturulan Sistit Üzerinde Hünnap Meyvesinin Etkisi

Antineoplastik tedavide alkilleyici ajan olarak kullanılan siklofosfamidin başlıca yan etkisi steril hemorajik sistittir. Hemorajik sistit, mesane kapasitesinde azalma ve idrar yapma refleksinin önemli derecede artması ile karakterizedir. "Aşırı aktif mesane" diye adlandırılan ciddi patolojik bozukluğa neden olur. Sistitin tedavisi, hiperaktif mesane ve gelişen inflamasyon nedeni ile önemlidir. Hünnap, geleneksel Çin tıbbında sıklıkla kullanılmıştır ve son çalışmalarla anti-inflamatuar ve antioksidan etkinliğinin olduğu gösterilmiştir. Literatür taramasında, hemorajik sistit üzerinde hünnap meyvesinin etkisinin araştırılmadığı saptanmıştır. Bu nedenle hemorajik sistit modeli üzerinde hünnap meyvesi ekstresinin etkisini inceledik. Çalışmamızda, siklofosfamid enjeksiyonun sıçan mesane aktivitesini arttırdığı görüldü. Hemorajik sistit grubunda izole tüm mesane basıncının kaydedildiği dokularda, bazal spontan kasılmaların amplitüdü ve EAA değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Ayrıca, bazal spontan kasılmaların amplitüd ve EAA değerleri HE uygulaması ile anlamlı olarak azaldı. Aynı şekilde karbakol ile oluşturulan tonik kasılmalar üzerine binişik fazik kasılmalarda da anlamlı bir artış görüldü. Hemorajik sistit oluşturulan grupta azalmış olan CAT ve SOD ELİZA değerleri, tedavi gruplarında kontrole yakın artmış; MDA ELİZA değerleri de kontrol değerlerine yakın bulunmuştur. Çalışmamızda karaciğer histopatolojileri de değerlendirmiştir. Bulgularımız, kullanılan dozlarda hünnap ekstresinin karaciğer üzerinde anlamlı bir toksik etki yapmadığını göstermektedir. Çalışmamızdaki in vitro izole tüm mesane deneyleri sonuçları ve ELİZA ölçümleri hünnap ekstresinin, sistit patolojini kısmen düzeltebileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar, hemorajik sistit gibi komplikasyonların önlenmesinde yeni tedavi ajanların geliştirilmesi açısından bir fikir verebilir.

Anahtar kelimeler: Sistit, Hünnap, Siklofosfamid, Sıçan

ABSTRACT

Effect Of Jujube Fruit on Cyclophosphamide-Induced Cystitis in Rats

The main side effect of cyclophosphamide, an alkylating agent used in antineoplastic treatment, is sterile hemorrhagic cystitis. Hemorrhagic cystitis is characterized by a decrease in bladder capacity and significant increase in urination reflex. It causes serious pathological disorder called "overactive bladder". Treatment of cystitis is important due to hyperactive bladder and developing inflammation. Jujube has been frequently used in traditional Chinese medicine and recent studies prove it's anti-inflammatory and antioxidant activities. In the literature review, it was determined that the effect of jujube fruit on hemorrhagic cystitis was not investigated. Therefore, we examined the effect of jujube fruit extract on hemorrhagic cystitis model. In our study, it was observed that cyclophosphamide injection increased rat bladder activity. Bladder pressure, amplitude of basal spontaneous contractions and AUC (area under curve) values of hemorrhagic cystitis group, were significantly higher than the control group. In addition, amplitude and AUC values of basal spontaneous contractions decreased significantly with HE application. Similarly, a significant increase was observed in phasic contractions imposed on tonic contractions induced by carbachol. CAT and SOD ELISA values, which were decreased in the hemorrhagic cystitis group, increased close to the control values. On the other hand, the increased MDA ELISA values were found close to the control values. Liver histopathology was also evaluated, and our findings show that jujube extract does not have a significant toxic effect on the liver at the doses used. The in vitro isolated whole bladder experiment results and ELISA results show that jujube extract can partially treat cystitis. These results may provide another option for the development of new treatment agents in the prevention of hemorrhagic cystitis.

Keywords: Cystitis, Jujube, Cyclophosphamide, Rat

1. GİRİŞ

Mesanede gerçekleşen spontan kasılmalar, yapılan deneysel çalışmalar ile kanıtlanmıştır.[1, 2] Bahsedilen çalışmalarda, mesanenin spontan kasılmalarında gözlemlenen frekans ve amplitüd artışının, hiperaktif mesane bulgularına benzerlik gösterdiği ve bunun aferent yolağın aktivasyonu ile ilgili olduğu öne sürülmüştür.[1, 2] İzole mesane dokusunda gözlenen fazik kasılmaların, mesanenin dolum evresinde görülen aktivitelerle ilgili olabileceği de belirtilmiştir. Bu kasılmalar, idrar yapmadan bağımsız olduğu için "non-voiding kasılmalar" ismiyle nitelendirilmiştir.[3, 4, 5] Sağlıklı mesanede yalnızca idrar yapma evresinde detrüsör kasılmalar oluşur ancak hiperaktif mesanede dolum evresinde de kasılmalar gözlenir. Alkilleyici bir ajan olarak antineoplastik tedavide kullanılan siklofosfamid, çeşitli otoimmün hastalıklarda da kullanılmaktadır (vaskülitler, Behçet hastalığı, lupus, Sjögren, skleroderma, romatoid artrit vb.)

Siklofosfamid kullanımında görülen başlıca yan etki steril hemorajik sistittir. Mesane kapasitesinde düşüş ve idrar yapma refleksindeki artış, hemorajik sistitin karakterize özellikleridir. Tıbbi tabir ile "aşırı aktif mesane" ya da "hiperaktif mesane", günümüzde birçok insanı etkileyen ve günlük yaşantılarında büyük zorluklar yaşatan bir hastalıktır.

Hemorajik sistit, siklofosfamid kullanımıyla görüldüğü gibi, yan etki olarak da görülebilmektedir. Bu sebepten ötürü hastalığı doğal yöntemlerle tedavi etmek önem taşımaktadır.

Siklofosfamid, bu sebepten ötürü deneysel hayvan hemorajik sistit modellerinde sıklıkla kullanılmaktadır ve deney hayvanlarının mesanelerinde gözlenen spontan ve fazik kasılmaları büyük ölçüde arttırmaktadır.[6, 7] Sistit tedavisi, hiperaktif mesane ve inflamasyon nedenlerinden ötürü önem taşımaktadır ve çeşitli antioksidan maddeler ile yeni tedavi metotları geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Geleneksel Çin tıbbında hünnap meyvesinin, kronik hastalıklardan, kardiyovasküler hastalıklara kadar birçok alanda kullanıldığı belirtilmiştir.[1] Hünnap meyvesinin anti-inflamatuar, immünomodilatör, antioksidan, hepatoprotektif,

gastrointestinal protektif etkilerinin varlığı yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur.[1, 2, 3] Hünnap meyvesi içeriğinde flavonidler, saponinler, taninler, vitaminler, Polisakkaritler, çeşitli aminoasitler barındırmaktadır.[4]

Yaptığımız literatür taramaları sonucunda, siklofosfamid ile hemorajik sistit ve hiperaktif mesane oluşturulan deneysel hayvan modellerinde, hünnap meyvesinin etkisinin araştırılmadığı saptadık.

Bu nedenle bu tez çalışmasında deney hayvanlarında siklofosfamid ile oluşturulan hemorajik sistit modeli üzerinde, hünnap meyvesinin antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliklerinin tedavi edici etkisini incelemeyi amaçladık.

Hünnap meyvesinin tedavi edici etkisi gösterilebilirse, hemorajik sistit gibi çok önemli bir yan etkinin önlenmesi veya tedavi edilmesinde yeni terapötik etkiye sahip potansiyel ilaçların geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane

2.1.1. Mesanenin Anatomik ve Fizyolojik Yapısı

Mesane, temel görevi idrar biriktirmek olan, düz kastan oluşan ve iki ana kısımdan oluşan torbadır. Mesanenin esas olan ve idrarı toplamada görevli olan gövde kısmı ve gövdenin uzantısı olan huni görünümlü boyun bölgesi ise mesane gövdesini üretraya bağlar. Mesane boynunun alt bölümü, üretra bağlantısı dolayısıyla arka üretra adını almıştır.[8]

Mesanenin boynu bölgesinin üst kısmında trigon denilen küçük bir kısım bulunur. Trigon üçgen şekline benzemesinden ötürü bu ismi almıştır. Trigonun en alt tepesi arka üretraya açılır ve iki üreter ise trigonun en üst köşelerinden mesaneye girerler. Trigonun mukoza yapısı, daha ince ve düz yapısı ile farklılık gösterir.[8, 9]

Üreterler erişkinde yaklaşık 30 cm uzunluğundadır. Üreterler mesaneye musküler ve submukozal katmanları arasındaki yaklaşık 1-2 cm'lik oblik geçiş bölümünden giriş yapar. Bu yapıya üreterovezikal bileşke adı verilir.[8,9]

Mesane içi basıncının artması halinde, submukozal üreter sıkışır ve idrarın geri böbreklere kaçmasına engel olur.[9]

Mesane boynu 2-3 cm uzunluğunda ve duvarı bol miktarda elastik doku ile örülmüş detrüsör kasından oluşur. Bu bölgedeki kas iç sfinkter adını alır. İç sfinkterin normal tonusu, mesane boynu ve arka üretrayı idrarsız tutar ve böylece, mesanenin ana kısmında basınç kritik eşiğin üstüne çıkıncaya kadar mesanenin boşalmasını engeller. Üretra, arka üretranın arkasından mesane dış sfinkteri denilen bir kas tabakası içeren ürogenital diyaframi geçer. Mesane gövdesi ve boynundaki kasın tamamen düz kas olmasına karşın bu kas istemli çalışan iskelet kasıdır. Dış sfinkter kası sinir sisteminin istemli kontrolü altında ve istemsiz kontrol mekanizmaları mesaneyi boşaltmaya teşebbüs ettiği zaman idrar çıkışını bilinçli olarak engellemede kullanılır.[8]

2.1.2. Mesanenin İnervasyonu

Mesanenin esas sinir kaynağı, medulla spinalisin sakral 2 ve 3 segmentleri arasında bağlantıyı sağlayan sakral pleksus ile bağlanan pelvik sinirlerdir. Pelvik sinirler hem motor hem duysal sinir liflerini taşır. Duysal lifler mesane duvarındaki gerimi algılarlar.[8]

Arka üretradaki gerilme sinyalleri özellikle güçlü olup mesane boşalmasının başlıca sorumlusu olan refleksleri başlatır. Pelvik sinir içinde iletilen parasempatik lifler mesane duvarında yerleşmiş gangliyon hücrelerinde sonlanır. Bunlardan çıkan kasa postgangliyonik lifler detrusor kasını inerve ederler. Pelvik sinire ilaveten iki farklı inervasyonun mesane fonksiyonlarında önemi vardır. Bunlardan en önemlisi mesane dış sfinkterini inerve eden ve pudendal sinir içinde seyreden iskelet kası motor lifleridir. Bunlar, dış sfinkterin istemli iskelet kasını inerve ve kontrol eden somatik sinir lifleridir. Mesane aynı zamanda sempatik zincirle medulla spinalisin L-2 segmenti arasında bağlantı kuran hipogastrik sinirler aracılığı ile sempatik inervasyon da alır. Bu sempatik liflerin başlıca etkisi kan damarlarını uyarmaktır ve mesane kasılmasına çok az etkilidirler. Sempatik sinirler içinde ilerleyen bazı duysal lifler dolgunluk hissi ve bazı durumlarda ağrının hissedilmesinde önemli olabilirler.[8]

T11-L2 spinal segmentlerinden kaynaklanan sempatik lifler hipogastrik sinirde ilerler ve sırasıyla β3 adrenerjik ve α1 adrenerjik reseptörleri aracılığıyla mesanenin tabanına ve üretraya bağlanır. Birincil işlevleri mesane depolamasını kolaylaştırmaktır. Sempatik postganglionik nöronlar noradrenalin salgıladığında, β3 reseptörleri mesane düz kasını gevşetmek için uyarılırken, α1 reseptörleri idrarı depolamak için üretra düz kasını aktive eder ve kasar.[8, 10]

S2-S4 motor nöronlarından gelen somatik motor sinirleri pudendal sinirlerde seyahat eder ve nikotinik kolinerjik reseptör aracılığıyla dış üretra sfinkterinin çizgili kaslarına bağlanır. Somatik aksonlardan asetilkolinin salınması, dış sfinkterin nikotinik reseptörlerini uyarır ve bunların kasılmasına neden olarak mesane depolamasını kolaylaştırır.[10]

"Koruma refleksi" ayrıca öksürme, hapşırma, ıkınma, Valsalva manevrası ve gülme gibi mesane içi basıncı aniden artıran durumlarda kontinansın korunmasına

yardımcı olur. Mesane içi basınçta böyle ani bir artış, mesane duvarının gerilmeye duyarlı mekanoreseptörlerini uyarır ve bu da sakral omuriliğe ve Onuf çekirdeğine (S2'nin ön boynuzunda bulunan pudendal sinirin sakral kökeni) afferent sinyaller gönderir. Onuf çekirdeğinden gelen efferent sinyaller daha sonra pudendal sinir yoluyla iletilir ve dış sfinkter kasının kasılmasını uyararak kontinansı korur. Süreç normalde otomatik, hızlı, etkili ve istemsizdir.[10, 11,12]

2.1.3. İşeme Fizyolojisi

Mesanenin boşaltılması fazına işeme denir. İki basamaktan oluşur. Birinci basamakta renal parenkim tarafından böbreklerde oluşturulan idrar, toplayıcı sistem aracılığıyla üreterlere iletilir böylece mesane giderek dolarak ve mesane duvarı gerimi eşik değerin üstüne çıkar.8, 9 İkinci basamakta artan gerim ile oluşan işeme refleksi denilen sinirsel refleks ile mesane boşalır veya idrar yapılmazsa bile idrar yapma isteğine neden olur. İşeme, spinal kord refleksi olmasına karşın beyin korteksi ve beyin sapı tarafından kolaylaştırılır ya da baskılanır.[8]

2.2. Sistit

2.2.1. Sistit Patolojisi

Sistit, en kısa şekilde idrar alt yolu iltihaplanması, daha da spesifik olarak mesane iltihaplanması olarak tanımlanabilir. Yapılan çalışmalarda %50'den fazla kadının ömründe en az bir kere bu problemi yaşadığı belirlenmiştir.[13, 14]

Sistit genellikle 2 farklı şekilde kategorize edilir. Komplike olmayan ve komplike sistit bunlardan birisidir. Komplike olmayan sistit sağlıklı erkeklerde ve hamile olmayan, sağlıklı kadınlarda görülen idrar alt yolu enfeksiyonu (İYE/UTI) olarak tanımlanır.[6] Mesanenin bakteriyel enfeksiyonu ile meydana gelir. Kadınlarda erkeklerden daha yüksek oranda görülür. Bunun başlıca sebebi, rektumun üretra meatusuna yakınlığı ve üretranın daha kısa olmasıdır. Komplike olan sistit ise,

ürogenital sistemin yapısal ya da fonksiyonel bozuklukları veya enfeksiyonun virülansının yüksekliği ile görülen enfeksiyonlardır.[15, 16, 17]

Sistitin bir başka kategorisi ise enfeksiyonel ve steril sisittir. Enfeksiyonel sistit, en yaygın görülen sistittir. Üropatolojik E. Coli (UPEC), bu enfeksiyonlara en sık sebep olan bakteridir. Ancak farklı virüslerin ve mantarlarında enfeksiyonel sistit oluşumuna neden olduğu bilinmektedir.[13]

Steril sistit ise enfeksiyondan bağımsız gelişen sistittir. Hemorajik sistit olarak anılır. Etiyolojileri, radyasyon veya kimyasal tahriştir. Steril sistit, enfeksiyonel sistite kıyasla daha şiddetli olma eğilimindedir. Hemorajik sistit, radyasyon ve kimyasal sistitin şiddetli klinik görünümüdür. Radyasyon kaynaklı sistit, ürolojik ve pelvik malignite için pelvik dış ışın radyasyon tedavisiyle ilişkilidir. Radyasyon kaynaklı sistit için "risk altında" penceresini oluşturan kesin bir zaman çerçevesi yoktur; hastalar hafif pelvik ağrıdan tedaviden haftalar, aylar veya yıllar sonra yaşamı tehdit eden hemorajik sistite kadar çok çeşitli semptomlar yaşayabilirler. Bugüne kadar, radyasyon tedavisi gören hastaların hangi alt grubunun bu potansiyel olarak yıkıcı komplikasyonu yaşayacağını tahmin etmenin bir yolu yoktur. Kimyasal sistit birçok ilaç sınıfından kaynaklanabilir ancak en sık siklofosfamid ve ifosfamid ile meme kanseri ve lenfoma için intravenöz kemoterapi tedavisi nedeniyle oluşur. Bu ilaçlar, böbrekler tarafından serbestçe filtrelenerek mesanede biriken akrolein adı verilen aşındırıcı bir karaciğer metabolitine sahiptir. Akrolein, mesane ürotelyumunda ülserasyon ve alttaki muskularis mukoza ve damar yapısının açığa çıkmasıyla birlikte piroptotik bir reaksiyona neden olur. Siklofosfamid başlatılmadan önce Mesna (2-merkaptoetan sülfonat sodyum) uygulanması, akroleine bağlanarak ve onu nötralize ederek hemorajik sistitin önlenmesine yardımcı olabilir. Ancak, akroleinin en büyük kaynağı sigara dumanıdır. Mesna, başlangıcından sonra hemorajik sistitin tedavisinde hiçbir rol oynamaz. Hemorajik sistitin alternatif tedavi yöntemleri arasında pıhtıların boşaltılmasıyla sürekli mesane irrigasyonu, şap veya formalin damlatılması, elektrokoterle fulgurasyon, hiperbarik oksijen tedavisi ve aşırı durumlarda idrar yönlendirmeli kistektomi bulunur.[14, 18]

2.2.2. Hiperaktif Mesane

Hiperaktif mesane ya da aşırı aktif mesane, sıklıkla idrara çıkma ihtiyacı ve zaman zaman idrar tutamama şikayetiyle birlikte de görülebilen bir semptomdur.[19]

Yaşla birlikte görülme sıklığının arttığı ve hastaların yaşam kalitesini düşürdüğü bilinmektedir.[19, 20]

Yapılan çalışmalarda, idrara çıkma sıklığının gün içinde 8'den fazla, noktürinin ise iki ve üzeri olduğu durumlarda, hiperaktif mesaneden bahsedilebileceği öne sürülmüştür.[21]

Hiperaktif mesane, mesanenin dolum evresinde detrüsörün istemsiz kasılmalarının artması ve bu kasılmaların tüm mesaneye anormal yayılmasıyla oluşur. Bu istemsiz kasılmalar mesane muskarinik reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir.[20, 22]

2.3. Siklofosfamid

Siklofosfamid, multipl miyelom, sarkom ve meme kanseri dahil olmak üzere neoplazmların yönetimi ve tedavisinde öncelikli olarak kullanılan bir ilaçtır.[23]

Farmasötik şekilleri oral ve parenteraldır. "Endoxan" ticari adıyla piyasada bulunur.

Siklofosfamidin temel etki mekanizması DNA'nın alkilasyonudur. Yapısında, bis(2-chloroethyl) amino ($(ClC_2H_4)_2NR$) fonksiyonel grubunu barındırdığı için nitrojen hardalı olarak da anılır.

Siklofosfamid karaciğerde, CYP-450 enzimleri tarafından hidroksisiklofosfamide, daha sonra aldofosfamide dönüştürülür. Aldofosfamid, ise fosforamid hardalı ve akrolein metabolitlerine ayrılır. Fosforamid metaboliti, DNA zincirleri içinde ve arasında çapraz bağlar oluşturur. Bu etki kalıcıdır ve programlanmış hücre ölümüne yol açar. Akrolein grubu ise anti-tümör aktivitesinde etkili değildir ve hemorajik sistitin oluşumundan sorumlu başlıca ajandır.[23, 24]

Akrolein, ürotelyum hücrelere hızlıca nüfuz eder ve mesanede kimyasal doku tahribatına sebep olur. Ürotelyum hücrelerinde oksidatif stresi arttırarak hemorajik sistit oluşumuna sebebiyet verir. Düzenli olarak akroleine maruz kalan mesane dokusu, sistit semptomlarının zamanla daha da şiddetlenmesine sebep olur ve iltihaplanmalara karşı savunmasız kalır.[25, 26]

Siklofosfamid ile oluşan hemorajik sistit, mesanenin idrar tutma kapasitesini azaltma ve idrar yapma arzusunun sıklığını önemli derecede arttırması ile karakterizedir. "Hiperaktif mesane/ Aşırı aktif mesane" olarak bilinen ciddi bir patolojik bozukluğa yol açmaktadır.[27]

Siklofosfamid hemorajik sistite sebep olması özelliğinden ötürü deneysel hayvan modellerinde sık olarak kullanılmaktadır.

Siklofosfamid alan hastalarda oluşan hemorjik sistit gelişiminden korunmak için "Mesna" profilaksisi önerilmektedir.[28]

Mesna (sodyum 2-merkapto etan sülfonat), yüksek doz siklofosfamidin yan etkisi olan hemorajik sistiti önlemek için kullanılan bir ilaçtır. Mesna, kan dolaşımında dimesnaya dönüşür (mensa disülfür), ve inaktif bir formda kan dolaşımda yer alır. Böbreklerden mesaneye geçişinde yeniden aktif form alır. Tekrar aktive olan mesna, mesanedeki akroleinlere doğrudan bağlanarak, ürotelyuma verilecek zararı önüne geçer.[29]

Mesnanın en sık görülen yan etkileri bulantı, kusma ve ishalin yanı sıra yüksek ateş, titreme, kas ağrıları, yorgunluk ve tat duyusunda değişikliklerdir. Bu yan etkiler, kemoterapi tedavisi gören hastaları zorlamaktadır. Bu sebepten ötürü, siklofosfamidin sebep olduğu hemorajik sistite yönelik ilaç araştırmaları hala devam etmektedir.

2.4. Hünnap

Hünnap, orijini Çin olan bir bitkidir. Çin üzerinden Rusya, Hindistan, Kuzey Afrika, güney Avrupa ve Anadolu'ya yayılmıştır. Hünnap bitkisinin soğuk iklimlere,

sıcak ve kurak iklimlere ve subtropikal iklimlere uyum sağlayabildiği bilinmektedir. (Reichl, 1991).

Olgunlaşmış hünnap meyveleri sarı veya kırmızı-kahverengi renklerde olabilmektedir. Olgunlaşmış ortalama bir hünnap meyvesi 2 cm uzunluğunda, 1 cm genişliğindedir. Kültürü yapılmış olan hünnap bitkilerinin meyveleri daha büyük olabilmektedir. Her hünnap meyvesi 1 adet çekirdek içerir. Çekirdeklerin iki ucu sivridir ve hafiftir.

Geleneksel Çin tıbbında hünnap bitkisi ve meyvesi yaygın olarak kullanılmıştır. Bilinen kullanım alanları sindirim problemleri, cilt enfeksiyonları, karaciğer problemleri, yüksek ateş, halsizlik, obezite, üriner hastalıklar, farenjit, bronşit, uykusuzluk ve ishaldir.[3, 30]

Ayrıca hünnap bitkisi ve meyvesi, bir gıda katkı maddesi olarak da çokça kullanılmış ve Çin içecekleri de dahil olmak üzere diğer fonksiyonel gıdalarda da kullanıldığı bilinmektedir.[31]

Hünnap, Türkiye'de çoğunlukla Batı ve Güney Anadolu bölgelerinde yetiştirilmektedir. Türkiye'deki hünnap üretiminde, başta Denizli olmak üzere, Isparta, Hatay, Antalya, Kayseri, Bursa, Çanakkale illeri öne çıkmaktadır.

Hünnap meyvesi besin değeri yüksek, içeriğinde birçok vitamin ve mineral barındıran bir meyvedir. 100 gr hünnap meyvesinin 77,86 gr su, 79 kcal enerji, 1,20 gr protein, 0,20 g yağ ve 20,23 gr karbonhidrat; 21 mg kalsiyum, 0,48 mg demir, 10 mg magnezyum, 23 mg fosfor, 3 mg sodyum, 0,05 mg çinko içerdiği bilinmektedir. Bunlara ek olarak 69,0 mg vitamin C, 0,02 mg tiamin, 0,04 mg riboflavin, 0,9 mg niasin, 0,081 mg vitamin B-6 ve 40 IU vitamin A bulunmaktadır.[32]

Yapılan bilimsel çalışmalarda hünnap bitkisinin ve meyvesinin anti-inflamatuvar [33, 34, 35], anti-hiperglisemik [36, 37, 38], immünoregülatör [39], nöroprotektif [40], antiviral [41], ve anti-oksidan [42, 43, 44] aktiviteleri ortaya çıkarılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hünnap Ekstrelerinin Hazırlanması

Manisa Demirci Yöresinde (Seymenler çiftliği Demirci ilçesi İmrenler mahallesi) zamanında toplanan Hünnap meyvesinin ekstresi Kam ve arkadaşlarının (2013) kullandığı yöntemin modifiye edilmesiyle hazırlanmıştır. Meyve örnekleri liyofilizatörde kurutulduktan sonra toz haline getirildi. Toz haline getirilen örneklerden 15 g alınıp üzerine 200 mL metanol eklenerek blenderden geçirildi ve ultrasonik su banyosunda 30°C'de 45 dakika bekletildi. Daha sonra 20 ^{o}C'da 10 dakika boyunca 3500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım (santrifüj sonrası karışım üzerinde oluşan berrak kısım) ayrıldıktan sonra katı kısımlar üzerine 30 mL metanol ilave edildi ve bu işlem 2 kez tekrarlandı. Elde edilen süpernatantlar birleştirildikten sonra vakum evaporatörde kurutuldu ve kalan kısmı 15 mL saf su ile çözündürülerek ekstre elde edildi.

3.2. Deneysel Hayvan Çalışmaları

Deneylerde Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (SABİDAM) temin edilen 250- 300 gram ağırlığında Wistar Albino türü erişkin dişi sıçanlar (Çukurova Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurul onayı alınarak 28.11.2023/ TOPLANTI SAYI 9; ÇÜSABİDAM) kullanılmıştır.

Bu çalışmada toplam 60 adet dişi sıçan kullanıldı. Tüm deneyler 6 ayrı grup hayvanlar üzerinde yapılmıştır.

3.3. Hemorajik Sistit Oluşturulması

Sıçanlara intraperitoneal olarak Siklofosfamid (150 mg/kg) enjeksiyonu yapıldı. Uygulamadan 72 saat sonra hayvanlar deneysel çalışmaya alındı.

3.4. Deney Grupları

Bu tezde 6 deney grubu oluşturulmuştur.

1. Deney grubu (Kontrol Grubu): Bu gruba intraperitoneal olarak serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. (n=10)

2. Deney grubu (Hemorojik Sistit grubu): bu gruba intraperitoneal olarak Siklofosfamid (150 mg/kg) enjeksiyonu yapıldı. (n=10)

3. Deney grubu: tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) hünnap ekstresi (HE) uygulandı. (n=10)

4. Deney grubu: tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) hünnap ekstresi (HE) uygulandı. (n=10)

5. Deney grubu: i.p. siklofosfamid (150 mg/kg) ile birlikte intragastrik olarak düşük doz (250 mg/kg) HE uygulandı. (n=10)

6. Deney grubu: i.p. siklofosfamid (150 mg/kg) ile birlikte intragastrik olarak yüksek doz (500 mg/kg) HE uygulandı. (n=10)

HE, siklofosfamid enjeksiyonundan önce 5 gün, enjeksiyondan sonrası ise 3 gün olmak üzere, toplam 8 gün intragastrik olarak uygulandı. Siklofosfamid enjeksiyonundan 72 sonra yani 8. günde hayvanlar aşağıda bahsedilen tüm mesane basıncı deney yöntemi ile çalışmaya alındı. Sıçanların mesane aktiviteleri tüm mesane basıncı yöntemi ile değerlendirildi. Ayrıca hünnap ekstresinin karaciğer üzerindeki etkisini değerlendirmek için doku örnekleri patolojiye gönderildi ve alınan kanlarda antioksidan markerlar (MDA, SOD, CAT) bakıldı. Sonuçların kontrol grubuna göre anlamlılığı GraphPad programı kullanılarak istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi.

3.5. İn Vitro İzole Tüm Mesane Basınç Çalışmaları

Sevofluran ile anestezi edilen sıçanlar servikal dislokasyon ile öldürülerek abdominal kısım açıldı ve mesane üretrasıyla birlikte bütün olarak çıkarıldı. Ardından 26 gauge'luk (26 g) bir iğne ile üretradan mesane içine girildi ve iğne ucu 5-0 ipek

yardımı ile bağlanarak mesane sabitleştirildi. İğnenin diğer ucu ise bir polietilen kanül (PE50) ile üçlü musluk kullanılarak basınç transdusırına (MayCom) ve infüzyon pompasına (Harvard Apparatus) bağlandı. Doku, Krebs solüsyonu (mM kompozisyon: NaCl 113, $NaHCO_3$ 19.8, Glukoz 11.1, KH_2PO_4 1.2, KCl 4.7, $MgCl_2$ 2.5, $CaCl_2$ 1.7) içeren ve %95 O_2- %5 CO_2 ile havalandırılan ve 37 ^oC sıcaklığında sabit tutulan 12 ml hacimli izole organ banyolarına yerleştirildi. 30 dakikalık inkübasyon periyodunun ardından dokular dakikada 50 µl olacak şekilde infüzyon pompası yardımıyla Krebs solüsyonu ile yavaşça dolduruldu. Her bir 50 µl infüzyonun sonunda elektriksel saha stimülasyonu (Grass S88; ESS, 50 volt, 1.5 milisaniye durasyon, 10 Hz ve 15 saniye) uygulandı. Elektriksel saha simülasyon kasılması maksimum olana kadar mesaneye aralıklı olarak 50 µl Krebs solüsyonu infüze edildi. Her bir mesaneye infüze edilen toplam Krebs solüsyonu 250 ± 10.5 µl olması sağlandı. Mesanede doluluk sağlandıktan sonra infüzyon durdurularak Krebs solüsyonu ile banyo ortamı yıkandı ve dokunun dengelenmesi için 30 dakika beklendi. Preparattaki tonus değişiklikleri bir basınç trandusırı ile cm-su cinsinden bir Veri Toplama Sistemi'ne (BIOPAC-MP36) aktarıldı. Cevaplar bilgisayar ortamına kaydedildi. Mesane içinde yeterli doluluk ve basınç sağlandıktan sonra, dokular 15-20 dakikalık bir dengelenme periyoduna bırakıldı. Daha sonra bazal spontan kasılma cevapları 3 saat boyunca kaydedildi. Ardından banyo ortamına karbakol (1 µM) ortama kümülatif olarak ilave edildi ve oluşturulan tonik etkiye bakıldı. Tonik kasılmalar en az 10 dakika boyunca izlendi ve ardından banyo ortamı Krebs solüsyonu ile yıkanarak karbakol ortamdan uzaklaştırıldı. Spontan kasılmaların boyutunun ilacın uygulanmasından önceki seviyesine gelmesi beklendikten sonra dokular 100 mM KCl içeren Krebs solüsyonu ile kastırılarak deneyler tamamlandı.

3.6. Histopatolojik İnceleme

4 ayrı deney grubuna ait sıçanlardan karaciğer çıkarılıp formaldehit içine alınıp Çukurova Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na incelenmek üzere gönderildi. %10'lık formaldehit solüsyonunda en az 24 saat tespit edilen karaciğer dokuları rutin takip işleminde, dehidratasyon işlemi için sırasıyla %70, %95, %100'lük alkol ve şeffaflandırma için ksilol solüsyonlarından geçirilip, parafin bloklara gömüldü. Parafine

gömülmüş dokular 5 mikron (μm) kalınlığında ince kesitlerle kesilip rutin hematoksilen eozin (H&E) boyası ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskobi düzeyinde Olympus marka mikroskop kullanılarak, farklı büyütmelerde x10, x20, x40 değerlendirildi.

Histopatolojik İnceleme hangi doku örneğinin hangi gruba dahil olduğu bilinmeden Çukurova Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında, H&E ile boyanan preperatlar ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Portal inflamasyon, periportal interface hepatit, tek hücre nekrozu derecelendirmesi, Modifiye ishak histolojik aktivite indeksi (HAİ) skorlama sistemine göre yapılmıştır. (Ishak K. et al, 1995)

3.6. Antioksidan Markerler

Alınan kanlarda ELİZA yöntemi ile antioksidan markerlar (MDA, SOD, CAT) bakıldı.

3.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçların kontrol grubuna göre anlamlılığı GraphPad programı kullanılarak istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi.

Şıçan mesane dokusunda yapılan deneylerde spontan kasılmaların amplitüdü in vitro izole tüm mesane çalışmalarında cm.su olarak ölçüldü. Elde edilen spontan fazik kasılmalar, her deneyin sonunda uygulanan 100 mM KCl ile elde edilen kasılma cevaplarına oranlanarak kasılmanın yüzdesi olarak ifade edildi. Spontan kasılma Yüzde (%) Kasılma = x 100 KCl kasılması Ayrıca sıçan mesanesinde sırası ile oluşan spontan kasılmaların eğri altında kalan alanı (EAA) cm.su.saniye ve 1 dakika boyunca oluşan kasılmaların sayısı yani frekans ise kasılma sayısı / dakika olarak ifade edildi.

Elde edilen spontan fazik kasılmalar, her deneyin sonunda uygulanan 100 mM KCl ile elde edilen kasılma cevaplarına oranlanarak kasılmanın yüzdesi olarak ifade edildi.

Spontan kasılma Yüzde (%) Kasılma = x 100 KCl kasılması

İkiden fazla grubun olduğu deneylerde, gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) ile değerlendirildi. Bu karşılaştırma Bonferoni-t kullanılarak yapıldı. (GraphPad Prism). İkili grupların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde ise student-t testi kullanıldı. 0,05'ten küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Bütün veriler, Ortalama ± Standart Hata olarak ifade edildi.

3.8. Kullanılan İlaçlar ve Solüsyonların Hazırlanması

Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin tümü SIGMA firmasından temin edildi. Deneylerde kulanılan kimyasal ajanlar; siklofosfamid ve karbakoldür. Karbakol distile suda çözülerek günlük taze hazırlandı. 100 mM KCl Krebs solusyonunda çözülerek hazırlandı. Deney boyunca bütün kimyasal maddeler günlük olarak hazırlandı.

Siklofosfamid serum fizyolojik içinde eritilerek günlük olarak hazırlandı ve sıçanlara intraperitoneal uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Bazal Spontan Kasılma, Eğri Altındaki Alan ve Frekans Cevapları

Grup 1 (Kontrol grubu), sıçanlardan izole edilen tüm mesaneler spontan kasılma aktivitesi gösterdi (Şekil 1). Bu spontan kasılma aktivitesi 3 saat boyunca izlendi, Spontan kasılmaların ortalama amplitüd değeri 2.77 ± 0.16 cm.su bulundu (Şekil 1). EAA ise 13.52 ± 0.22 cm.su.saniye bulundu (Şekil 2). Spontan kasılmaların frekansı 5.93 ± 0.50 kasılma sayısı/dakika olarak tespit edildi (Şekil 3).

Grup 2 (Hemorojik Sistit grubu), siklofosfamid enjeksiyonun izole tüm mesanelerin spontan kasılma aktivitesini ve EAA değerlerini kontrol grubuna kıyasla dramatik bir şekilde arttırdığı görülmüştür (Şekil 1 ve Şekil 2). Bu grupta spontan kasılmaların ortalama amplitüd değeri 12.34 ± 0.45 cm.su olarak bulundu (Şekil 1). EAA ise 90.83 ± 2.45 cm.su.saniye bulundu (Şekil 2). Spontan kasılmaların frekansı ise 4.81 ± 0.30 olarak tespit edildi (Şekil 3).

Grup 3, tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) hünnap ekstresi (HE) uygulanan sıçanlardan izole edilen tüm mesanelerin amplitüd ve EAA değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (Şekil 1 ve Şekil 2). Bu grupta spontan kasılmaların ortalama amplitüd değeri 2.39 ± 0.18 cm.su bulundu (Şekil 1). EAA ise 11.26 ± 0.26 cm.su.saniye bulundu (Şekil 2). Spontan kasılmaların frekansı 4.83 ± 0.21 kasılma sayısı/dakika olarak tespit edildi (Şekil 3).

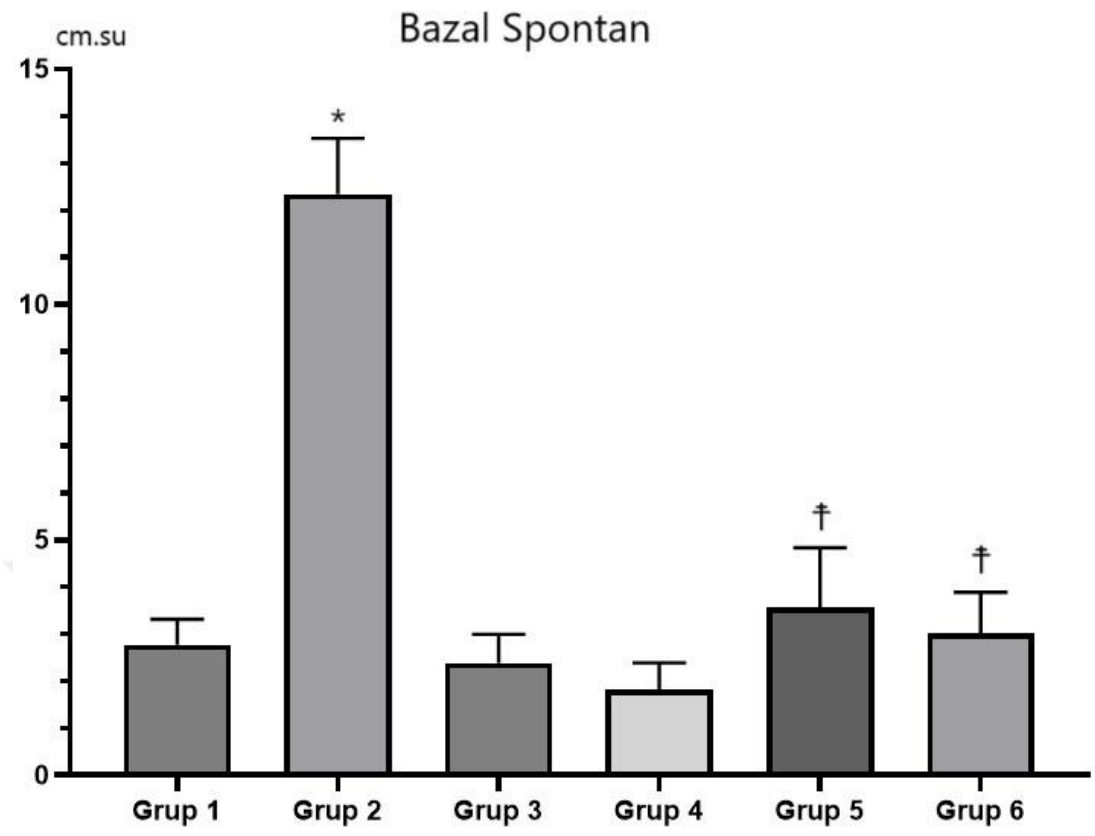
Grup 4, tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) hünnap ekstresi (HE) uygulanan sıçanlardan izole edilen tüm mesanelerde, düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grupta olduğu gibi, kontrol grubuna yakın bir spontan aktivite göstermiştir. Bu grupta spontan kasılmaların ortalama amplitüd 1.83 ± 0.19 cm.su bulundu (Şekil 1). EAA ise 7.42 ± 0.27 cm.su.saniye bulundu (Şekil 2). Spontan kasılmaların frekansı 6.00 ± 0.32 kasılma sayısı/dakika olarak tespit edildi (Şekil 3).

Grup 5, i.p. siklofosfamid (150 mg/kg) ile intragastrik olarak düşük doz (250 mg/kg) HE uygulanan bu grupta izole tüm mesane spontan aktivitelerinin amplitüd ve EAA değerlerinin hemorajik sistit grubuna göre anlamlı azaldığı tespit edilmiştir. (Şekil 1 ve Şekil 2) Bu grupta spontan kasılmaların ortalama amplitüd değeri 3.57 ±

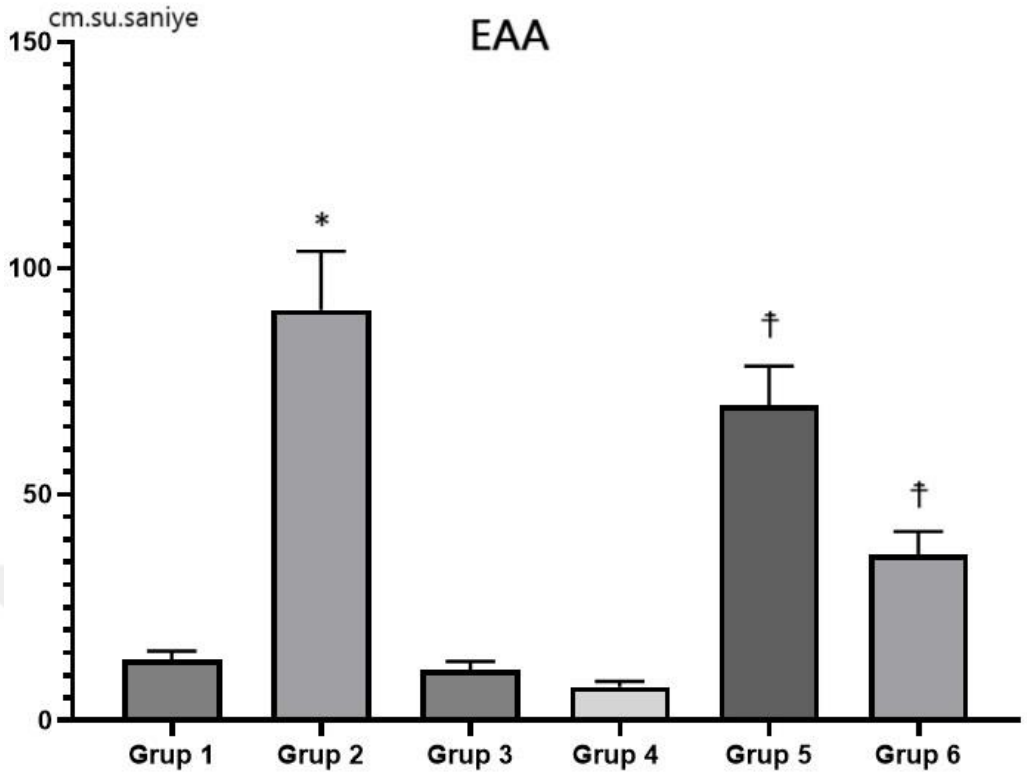
0.42 cm.su olarak bulundu. (Şekil 1) EAA ise 69.62 ± 1.70 cm.su.saniye bulundu. (Şekil 2) Spontan kasılmaların frekansı ise 4.84 ± 0.43 kasılma sayısı/dakika olarak tespit edildi (Şekil 3).

Grup 6, i.p. siklofosfamid (150 mg/kg) ile intragastrik olarak yüksek doz (500 mg/kg) HE uygulanan grupta, izole tüm mesane spontan aktivitelerinin amplitüd ve EAA değerlerinin, hemorajik sistit grubuna göre anlamlı azaldığı tespit edilmiştir. Bu grupta spontan kasılmaların ortalama amplitüd değeri 3.01 ± 0.31 cm.su bulundu (Şekil 1). EAA ise 36.79 ± 1.30 cm.su.saniye bulundu (Şekil 2). Spontan kasılmaların frekansı ise 4.20 ± 0.47 kasılma sayısı/dakika olarak tespit edildi (Şekil 3). Elde edilen veriler yüksek doz HE ile düşük doz HE uygulamaları arasında hemorojik sistit grubunda dramatik bir şekilde artış gösteren spontan kasılma aktivitesini azaltmakta anlamlı bir fark görülmemiştir.

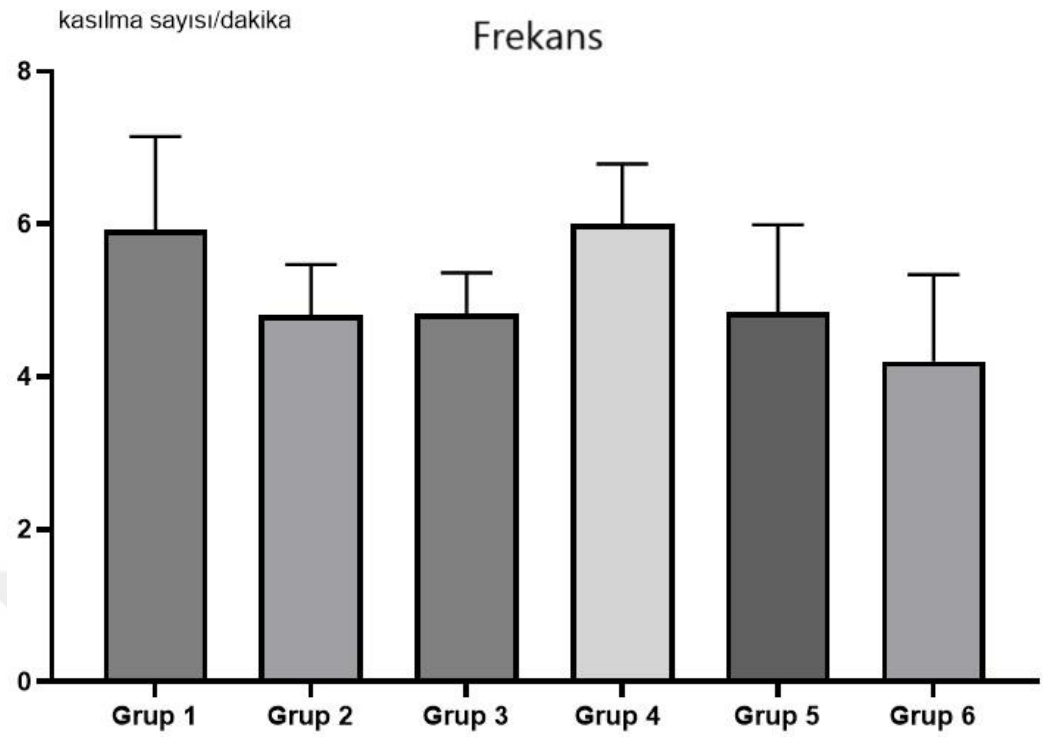
İzole sıçan tüm mesanelerinin trase sonuçları da siklofosfamid (150 mg/kg) ile intragastrik olarak HE uygulanan tedavi gruplarında (grup 5 ve grup 6), mesane spontan kasılma aktiviteleri kontrol grubuna yakınsamaktadır. (Şekil 4)



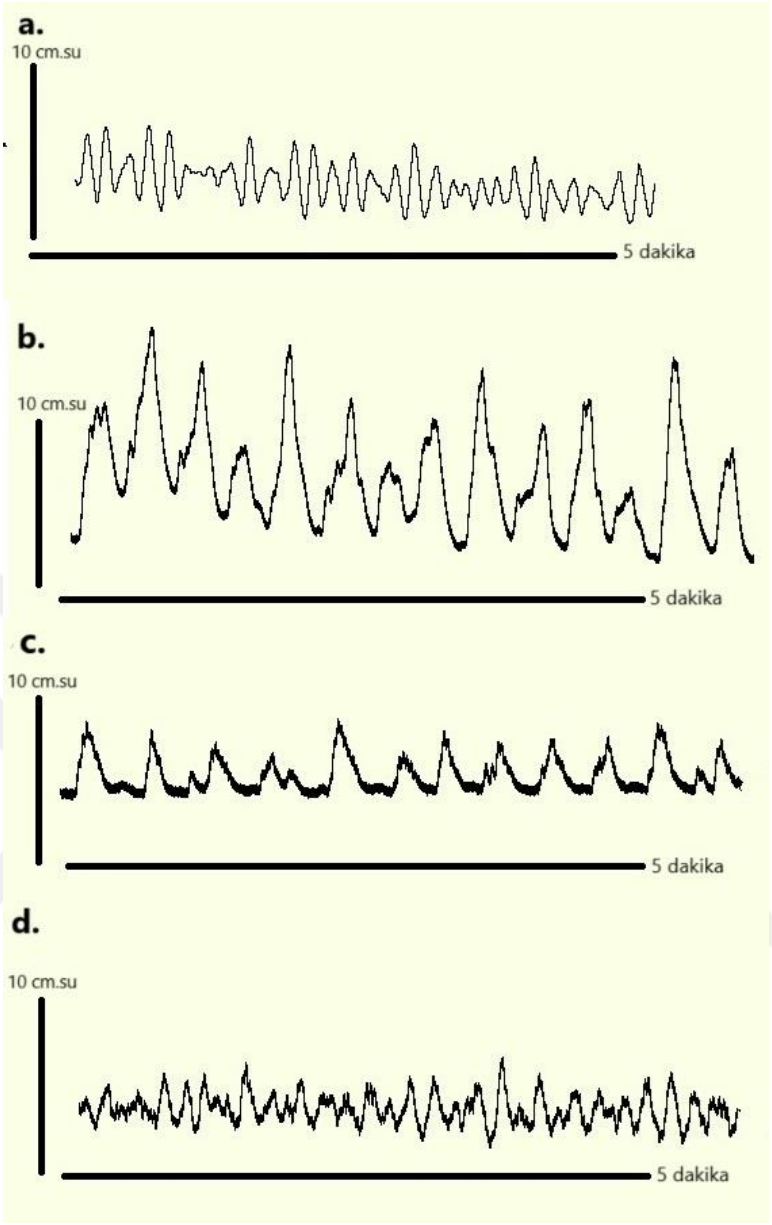
Şekil 1. Kontrol grubu (grup1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grup (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grup (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan elde edilen izole sıçan tüm mesane dokularında bazal spontan kasılma cevaplarının amplitüd (cm.su) değerleri. * Kontrol (grup 1) cevaplarına göre anlamlılığı, † hemorajik sistit (grup 2) grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($p<005$).



Şekil 2. Kontrol grubu (grup1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grup (grup3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grup (grup 4), Siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan elde edilen izole sıçan tüm mesane dokularında bazal spontan kasılma cevaplarının EAA (cm.su.saniye) değerleri. * Kontrol (grup 1) cevaplarına göre anlamlılığı, † hemorajik sistit (grup 2) grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($p<005$).



Şekil 3. Kontrol grubu (grup 1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grup (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grup (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250 mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan elde edilen izole sıçan tüm mesane dokularında oluşan spontan kasılma cevaplarının frekans (kasılma sayısı/dakika); değerleri.



Şekil 4. (a) Kontrol grubu (grup 1), (b) siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), (c) siklofosfamid + düşük doz (250 mg /kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve (d) siklofosfamid + yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 6) sıçan izole tüm mesane spontan fazik kasılmaların aktivitesini gösteren trase örnekleri.

4.2. Karbakol ile oluşturulan Kasılma Cevapları

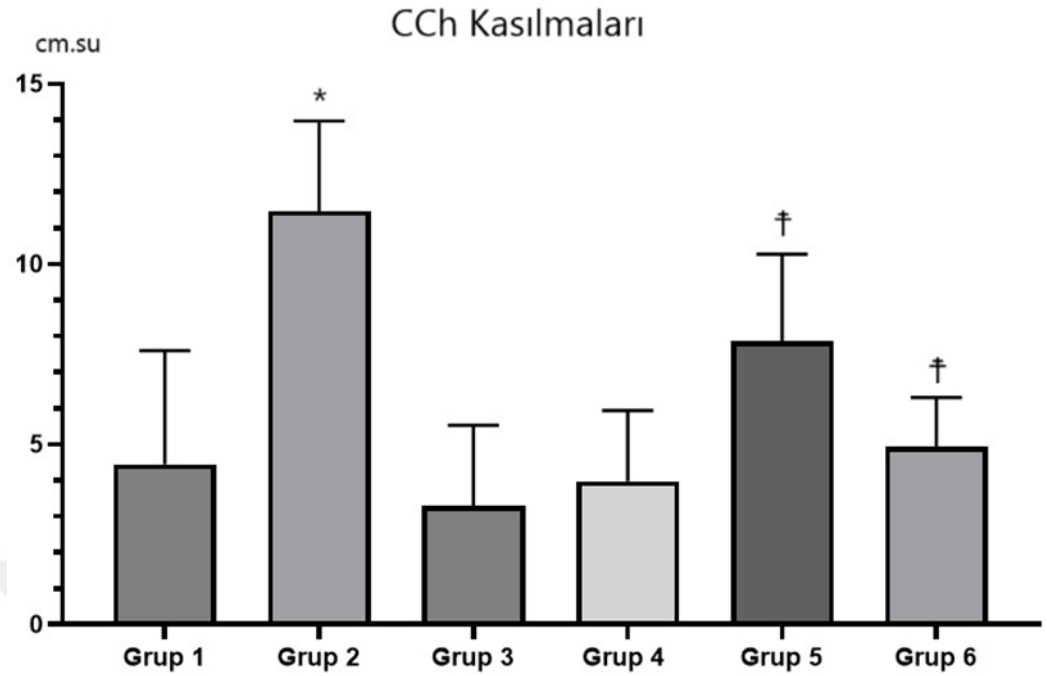
Kontrol grubunda, izole tüm mesane dokusunda 1 μM karbakol tonik kasılmalara ve ardından bu tonik kasılma üzerine binişik spontan fazik kasılmalara neden oldu. Kontrol (grup 1) grubuna kıyasla, hemorajik sistit (grup 2) grubunda spontan aktivitede olduğu gibi, dramatik bir artış görüldü. Karbakol ile gözlenen tonik kasılma üzerine binişik spontan fazik kasılma ölçümlerinin ortalamasında, kontrol grubu (grup 1) için 4.44 ± 1.05 cm.su, hemorojik sistit grubu (grup 2) için 11.47 ± 0.64 cm.su ölçümü yapıldı. (Şekil 5)

Tek başına HE verilen gruplarda (grup 3 ve grup 4), bu değerlerin kontrol grubuna göre anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü (Şekil 5). Karbakol ile gözlenen tonik kasılma üzerine binişik spontan fazik kasılma değerlerinin ortalaması tek başına düşük doz HE uygulanan (grup 3) grupta ortalama 3.29 ± 0.53 cm.su olarak ölçüldü. Tek başına yüksek doz (500 mg/kg) HE uygulanan (grup 4) grupta ise bu ortalamanın 3.98 ± 0.46 cm.su olduğu tespit edildi. (Şekil 5)

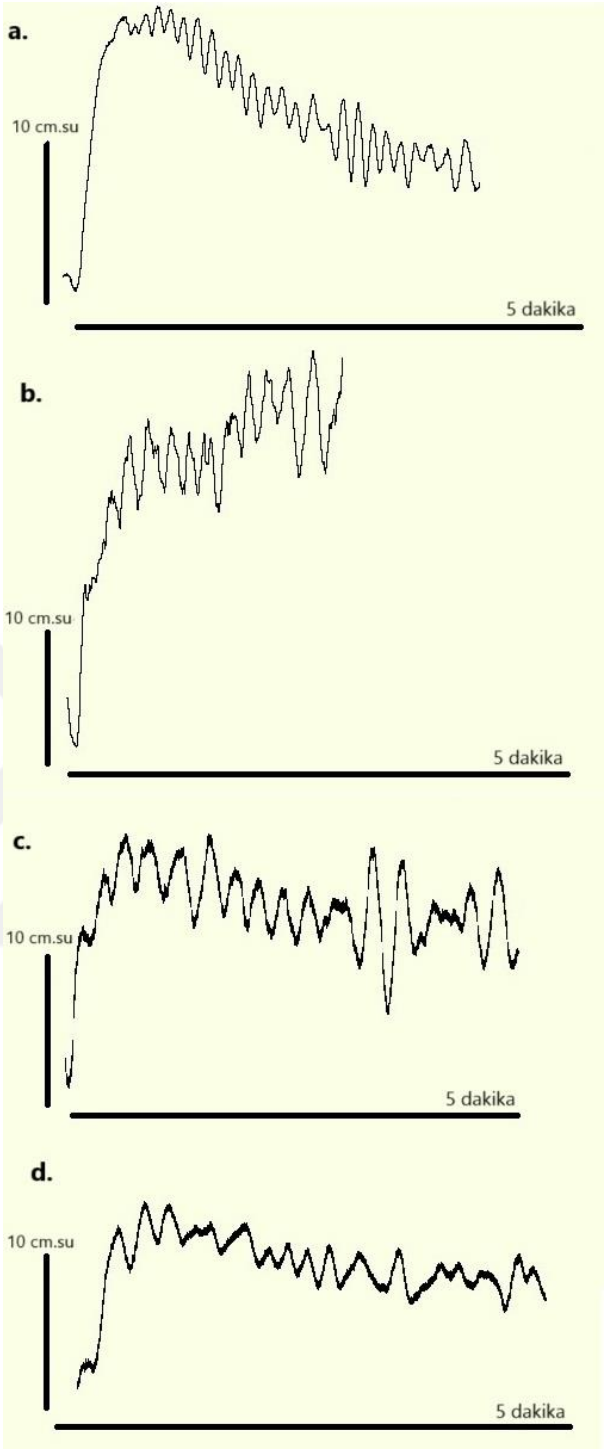
Siklofosfamid ile birlikte HE verilen tedavi gruplarında (grup 5 ve grup 6) değerlerin, kontrole yakın bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 5). Siklofosfamid + düşük doz (250 mg/kg) HE uygulanan (grup 5) grupta 7.86 ± 0.57 cm.su olduğu tespit edilirken, Siklofosfamid + yüksek doz (500 mg/kg) HE uygulanan (grup 6) grupta ortalama 4.93 ± 0.32 olarak bulunmuştur. (Şekil 5)

Diğer yandan bazal spontan kasılmalardan farklı olarak, karbakol kasılmaları üzerinde oluşan bu spontan aktiviteler üzerinde yüksek doz HE'nin düşük doz HE'ye göre daha etkin olduğu görülmüştür. (Şekil 5)

İzole sıçan tüm mesanelerine uygulanan 1 μM karbakol ile oluşan tonik kasılma üzerine binişik spontan fazik kasılmaların trase sonuçları, siklofosfamid (150 mg/kg) ile intragastrik olarak HE uygulanan tedavi gruplarının (grup 5 ve grup 6), kontrol grubuna (grup 1) yakın cevaplar verdiğini göstermektedir. (Şekil 6)



Şekil 5. Kontrol grubu (grup 1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grup (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grup (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan elde edilen izole sıçan tüm mesane dokularında 1 µM karbakol ile oluşturulan tonik kasılma üzerine binişik spontan fazik kasılma cevaplarının amplitüd (cm.su) değerleri. * Kontrol (grup 1) cevaplarına göre anlamlılığı, † hemorajik sistit (grup 2) grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($p<005$).

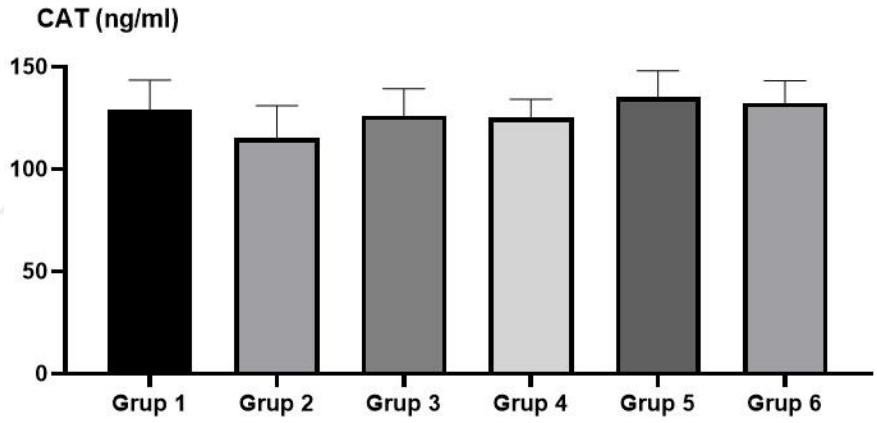


Şekil 6. (a) Kontrol grubu (grup 1), (b) siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), (c) siklofosfamid + düşük doz (250 mg /kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve (d) siklofosfamid + yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 6) 1 μM karbakol ile oluşturulan tonik kasılmaları ve ardından bu tonik kasılma üzerinde gelişen binişik spontan fazik kasılmaların aktivitesini gösteren trase örnekleri.

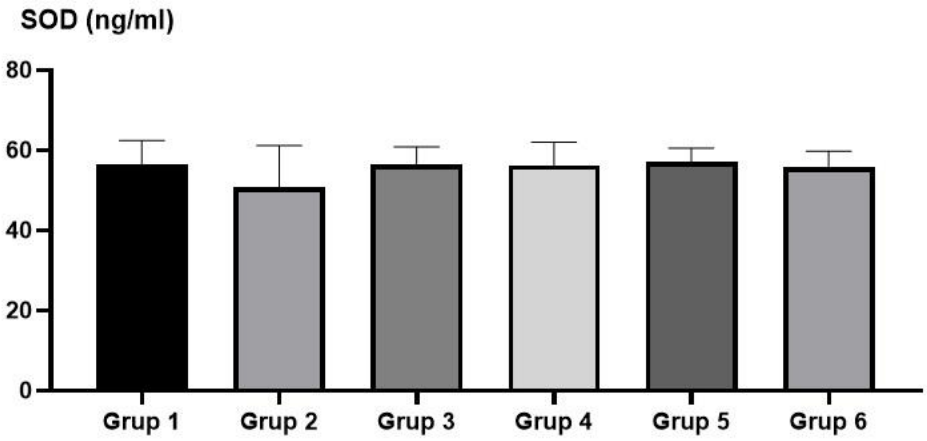
4.3. ELİZA Değerlendirilmeleri

Siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubunda (grup 2), CAT düzeyleri kontrol grubuna göre hafif azalmıştır. Ancak bu azalma istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 7). Aynı şekilde SOD düzeylerinde de istatiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma görülmüştür. (Şekil 8) Tek başına HE verilen gruplarda da (grup 3 ve 4), bu enzim düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir fark göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 7 ve Şekil 8).

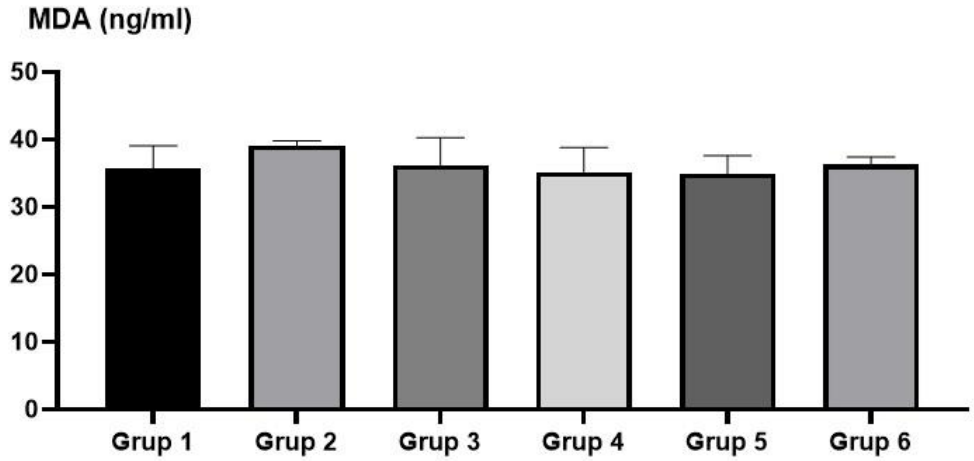
Diğer yandan siklofosfamid ile oluşturulan hemorajik sistit grubunda (grup 2) MDA düzeyleri de hafif yükselmiştir (Şekil 9). Ancak bu artış da istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Diğer gruplarda da MDA düzeyleri kontrole yakın düzeyde seyretmiştir (Şekil 9).



Şekil 7. Kontrol grubu (grup 1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan alınan kan örneklerinden ölçülen CAT değerleri.



Şekil 8. Kontrol grubu (grup 1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan alınan kan örneklerinden ölçülen SOD değerleri.



Şekil 9. Kontrol grubu (grup 1), siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2), tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen (grup 3), tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen (grup 4), siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5) ve siklofosfamid + yüksek doz HE (500 mg/kg) verilen tedavi grubu (grup 6) sıçanlardan alınan kan örneklerinden ölçülen MDA değerleri.

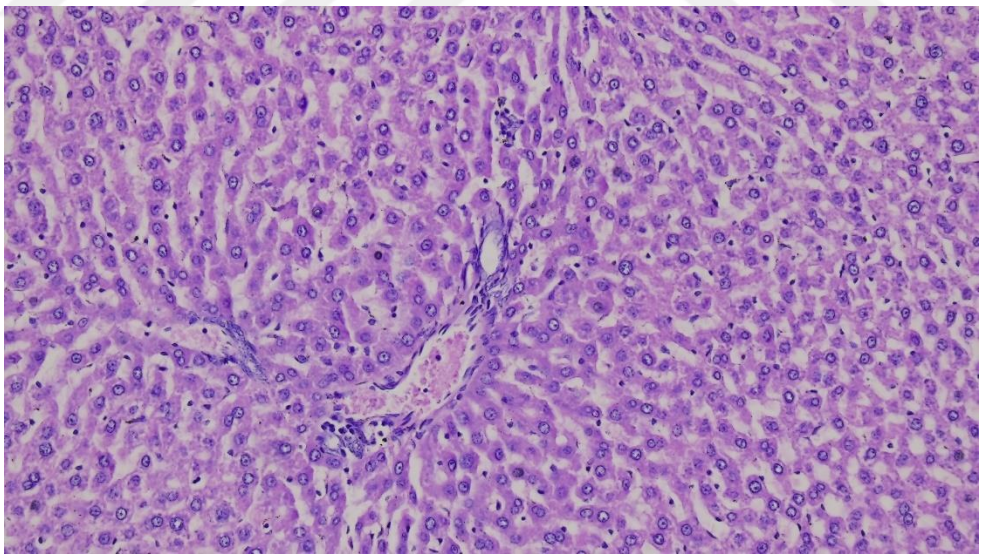
4.4. Histopatoloji Değerlendirmeleri

Deney gruplarındaki her bir sıçandan alınan karaciğer doku örnekleri bir karaciğer üzerinde muhtemel bir toksik etkinin belirlenmesi amacı ile histopatolojik olarak incelenmiştir.

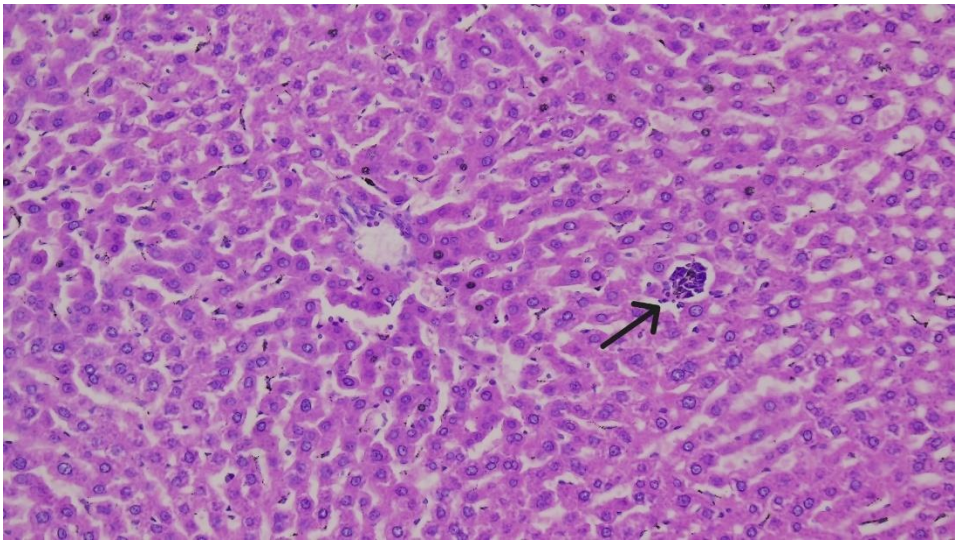
Siklofosfamid enjekte edilen hemorajik sistit grubunda (grup 2) alınan karaciğer doku örneklerinin histopatolojik incelemesi kontrol grubuna (Şekil 10) yakın bir görünüm sergilemiştir. Bu dokularda normal parankim ve portal alanlar tespit edilmiş herhangi bir patolojiye rastlanmamıştır.

Her bir sıçandan alınan karaciğer dokuları ayrı ayrı değerlendirilerek skorlanmıştır ve çizelgeler halinde sunulmuştur (Çizelge 1, Çizelge 2, Çizelge 3, Çizelge 4, Çizelge 5 ve Çizelge 6). Değişiklikler 4 basamaklı skalada derecelendirdi.

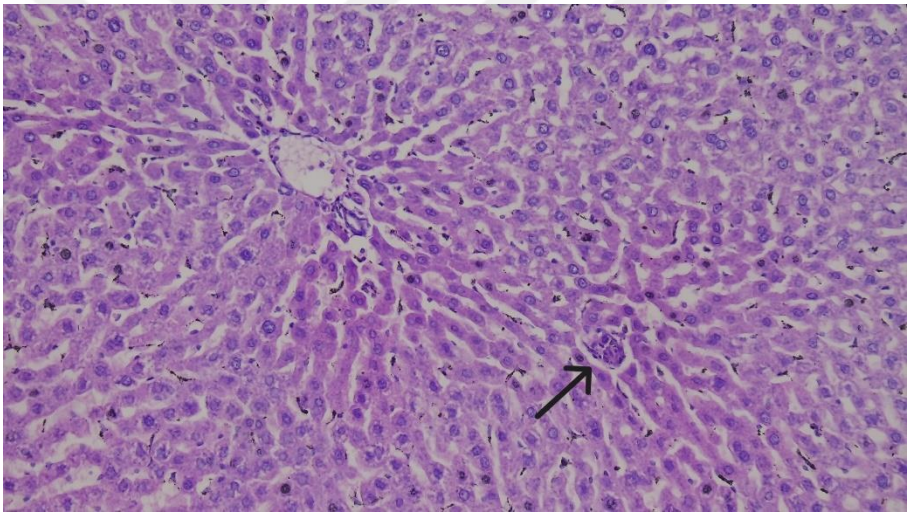
Grade 0- hasar saptanmamış; Grade 1<%10 eser miktarda; Grade 2 %10-25 hafif derece; Grade 3 %26-50 orta derece; Grade 4 %>50 şiddetli derece olarak belirlenmiştir.



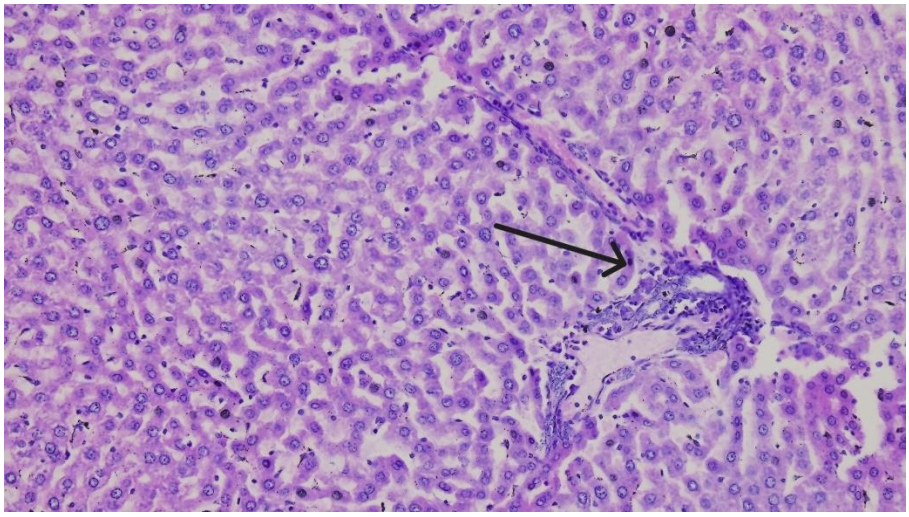
Şekil 10. Kontrol grubu (grup 1), normal karaciğer dokusu, portal alan ve parankim doğal sınırlarda görülüyor. x200 (Hematoksilen & Eozin boyama)



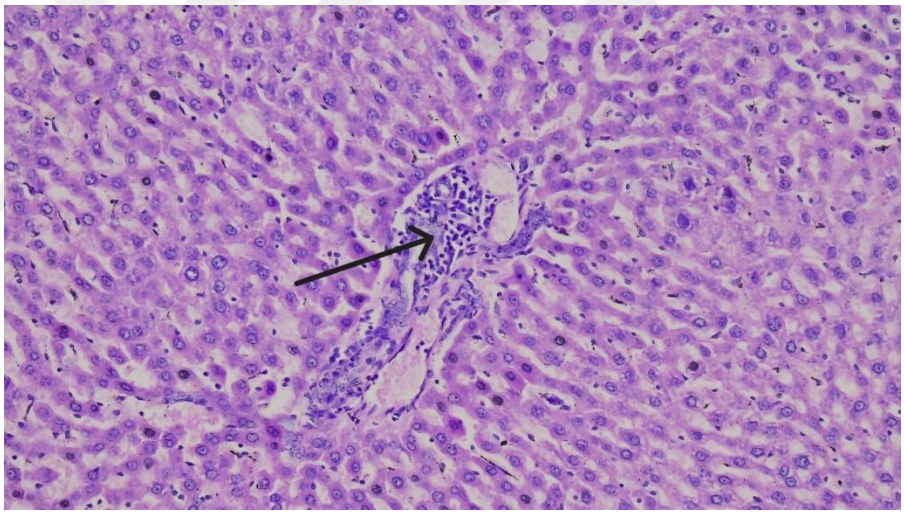
Şekil 11. Tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grupta (grup 3) izlenen tek hücre nekrozu okla işaretlenmiştir. x200 (Hematoksilen & Eozin boyama)



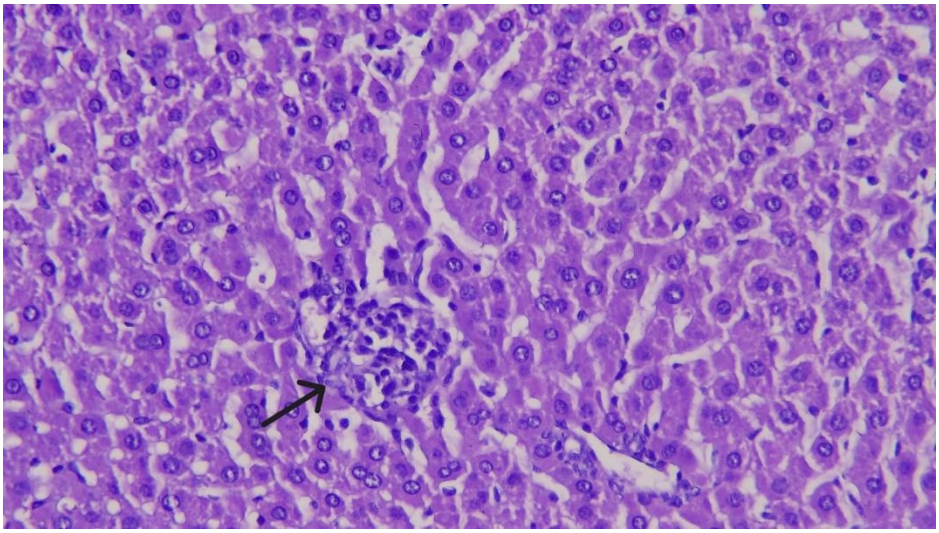
Şekil 12. Tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grupta (grup 4) izlenen tek hücre nekrozu okla işaretlenmiştir. x200 (Hematoksilen & Eozin boyama)



Şekil 13. Siklofosfamid+ düşük doz (250 mg /kg) HE verilen tedavi grubunda (grup 5) izlenen grade 1 portal inflamasyon alanı izleniyor. x400 (Hematoksilen & Eozin boyama)



Şekil 14. Siklofosfamid+ yüksek doz (500 mg /kg) HE verilen tedavi grubunda (grup 6) izlenen grade 1 portal inflamasyon alanı izleniyor. x400 (Hematoksilen & Eozin boyama)



Şekil 15. Siklofosfamid+ yüksek doz (500 mg /kg) HE verilen tedavi grubunda (grup 6) izlenen tek hücre nekrozu okla işaretlenmiştir. x400 (Hematoksilen & Eozin boyama)

Çizelge 1. Kontrol grubu (grup 1) histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması.

Sıçan Grubu/ Numarası	Portal İnflamas-yon	İnterface Hepatit	Tek Hücre Nekrozu	Konfluent Nekroz	Fibrozis	Fokal Dejene-rasyon	Hemora-ji Konjes-yon
Grup 1/1	0	0	0	0	0	-	+
Grup 1/2	0	0	0	0	0	-	+
Grup 1/3	0	0	0	0	0	-	-
Grup 1/4	0	0	0	0	0	-	+
Grup 1/5	1	0	1	0	0	-	-
Grup 1/6	0	0	0	0	0	-	-
Grup 1/7	0	0	0	0	0	-	+
Grup 1/8	0	0	0	0	0	-	-

Çizelge 2. Siklofosfamid enjeksiyonu yapılan hemorajik sistit grubu (grup 2) histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması.

Sıçan Grubu/ Numarası	Portal İnflamas-yon	İnterface Hepatit	Tek Hücre Nekrozu	Konfluent Nekroz	Fibrozis	Fokal Dejene-rasyon	Hemora-ji Konjes-yon
Grup 2/1	0	0	0	0	0	-	-
Grup 2/2	1	0	0	0	0	-	+
Grup 2/3	0	0	0	0	0	-	+
Grup 2/4	0	0	0	0	0	-	+
Grup 2/5	1	0	0	0	0	-	+
Grup 2/6	0	0	0	0	0	-	++
Grup 2/7	0	0	0	0	0	-	+

Çizelge 3. Tek başına intragastrik düşük doz (250 mg/kg) HE verilen grup (grup 3), histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması.

Sıçan Grubu/ Numarası	Portal İnflamas-yon	İnterface Hepatit	Tek Hücre Nekrozu	Konfluent Nekroz	Fibrozis	Fokal Dejene-rasyon	Hemora-ji Konjes-yon
Grup 3/1	0	0	1	0	0	-	+
Grup 3/2	1	0	1	0	0	-	+
Grup 3/3	0	0	0	0	0	-	-
Grup 3/4	1	0	0	0	0	-	+
Grup 3/5	0	0	0	0	0	-	-
Grup 3/6	1	0	1	0	0	-	-
Grup 3/7	0	0	0	0	0	-	+

Çizelge 4. Tek başına intragastrik yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen grup (grup 4), histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması.

Sıçan Grubu/ Numarası	Portal İnflamas-yon	İnterface Hepatit	Tek Hücre Nekrozu	Konfluent Nekroz	Fibrozis	Fokal Dejene-rasyon	Hemora-ji Konjes-yon
Grup 4/1	0	0	0	0	0	-	-
Grup 4/2	1	0	1	0	0	-	+
Grup 4/3	1	0	1	0	0	-	+
Grup 4/4	1	0	0	0	0	-	-
Grup 4/5	0	0	0	0	0	-	-
Grup 4/6	0	0	0	0	0	-	+
Grup 4/7	1	0	1	0	0	-	+
Grup 4/8	0	0	0	0	0	-	-

Çizelge 5. Siklofosfamid + düşük doz (250mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 5), histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması.

Sıçan Grubu/ Numarası	Portal İnflamas-yon	İnterface Hepatit	Tek Hücre Nekrozu	Konfluent Nekroz	Fibrozis	Fokal Dejene-rasyon	Hemora-ji Konjes-yon
Grup 5/1	0	0	0	0	0	-	-
Grup 5/2	1	0	0	0	0	-	+
Grup 5/3	0	0	0	0	0	-	-
Grup 5/4	0	0	0	0	0	-	-
Grup 5/5	1	0	0	0	0	-	+
Grup 5/6	0	0	0	0	0	-	-
Grup 5/7	0	0	0	0	0	-	-
Grup 5/8	0	0	0	0	0	-	-

Çizelge 6. Siklofosfamid + yüksek doz (500 mg/kg) HE verilen tedavi grubu (grup 6), histolojik aktivite indeksi modifiye skorlaması.

Sıçan Grubu/ Numarası	Portal İnflamas-yon	İnterface Hepatit	Tek Hücre Nekrozu	Konfluent Nekroz	Fibrozis	Fokal Dejene-rasyon	Hemora-ji Konjes-yon
Grup 6/1	0	0	0	0	0	-	-
Grup 6/2	1	0	0	0	0	-	-
Grup 6/3	0	0	0	0	0	-	+
Grup 6/4	0	0	0	0	0	-	-
Grup 6/5	1	0	1	0	0	-	-
Grup 6/6	0	0	0	0	0	-	-
Grup 6/7	0	0	0	0	0	-	-

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, siklofosfamid enjeksiyonun sıçan tüm mesane aktivitesini arttırdığı görüldü. Hemorajik sistit oluşturulan grupta izole tüm mesane basıncının kaydedildiği dokularda bazal spontan kasılmaların amplitüdü ve EAA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Aynı şekilde, karbakol ile oluşturulan tonik kasılmalar üzerine binişik fazik kasılma aktiviteleri, bazal spontan aktivitesinde de görüldüğü gibi, kontrole göre anlamlı arttı. Ayrıca, bazal spontan kasılmaların amplitüd EAA değerleri HE uygulaması ile anlamlı olarak azaldı.

Hemorajik sistit oluşturulan grupta azalmış CAT ve SOD ELİZA değerleri, kontrole yakın artmıştır. Diğer yandan artmış MDA ELİZA değerleri de kontrol değerlerine yakın bulunmuştur.

Daha önce yayınlanmış çalışmalardan[6,7] elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak, siklofosfamidin periton içi uygulaması, sıçanlarda hemorajik sistit ve buna eşlik eden artmış mesane aktivitesi (hiperaktif mesane) patolojisi oluşturmuştur. Siklofosfamid enjeksiyonu, izole tüm mesane dokusunda bazal spontan fazik kasılmalarını kontrole göre dramatik bir şekilde stimüle etmiştir. Bazal spontan fazik kasılmaların amplitüd ve EAA değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artması mesane hiperaktivitesini teyit etmektedir.

Ancak bu çalışmada frekans değerleri kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bunun nedeni amplitüd ve buna bağlı olarak EAA değerlerinin aşırı artması sonucu her fazik kasılmanın başlangıç ve bitiş süresinin uzaması olarak yorumlayabiliriz.

Sıçanlardan alınan kan örneklerinde CAT, SOD VE MDA ELİZA bulguları da bu sonucu desteklemektedir.[45] İzole tüm mesane aktivitesine bakılan deneylerde gözlemlenen bazal spontan fazik kasılma artışı, in vivo deneylerdeki "non-voiding" olarak tanımlanan ve idrar yapma ile sonuçlanmayan kasılmaları temsil edebilir.[47, 48] İn vitro izole tüm mesane preparatlarındaki spontan kasılmaların genellikle myojenik orijinli olduğu ve değişik reseptör tipleri (adrenerjik, muskarinik ve purinerjik) ile modüle edildiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.[49, 50, 51, 52, 53, 54] Bu spontan kasılmaların mekanizmaları henüz tam anlamıyla anlaşılamamıştır.

Çalışmamızda 1 μM karbakol ile oluşturulan tonik kasılma üzerinde binişik fazik kasılmaların görülmesi myojenik gelişen bu fazik kasılmalarda kolinerjik uyarıların katkı sağladığı fikrini destekleyebilir.[7] Aynı şekilde, siklofosfamid enjeksiyonunun myojenik kabul edilen bazal spontan fazik kasılmalardaki anlamlı patolojik değişiklikleri, karbakol ile stimüle edilen fazik kasılmalar üzerinde de göstermesi bu düşüncemizi daha da güçlendirmektedir.

Hünnap, yaygın olarak geleneksel Çin tıbbında birçok kronik hastalıkta, kanser hastalıklarında, kardiyovasküler hastalıklarda oksidatif stresi azalttığı için kullanılmaktadır.[3, 4] Hünnap meyvesinin anti kanser, anti-inflamatuar, obezite tedavisinde immünomodilatör, antioksidan, hepatoprotektif, gastrointestinal protektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir.[3] Hünnap içeriğinde; flavonidler, saponinler, taninler, vitaminler polisakkaritler, multiple aminoasitler bulunmaktadır.4 Deneysel hayvan çalışmalarında siklofosfamid uygulamasının oksidatif stresi arttırdığı bilinmektedir.[45] Bu nedenle HE uygulamasının siklofosfamid kullanımına bağlı oksidatif stresi azaltarak mesane patolojisini azaltacağı muhtemeldir.

Bu tez çalışmasında denenen HE uygulaması, siklofosfamid enjeksiyonunun stimüle ettiği mesane hiperaktivitesini kontrole yakın seviyelere getirmiş hemorajik sistit grubundaki sıçanların tüm mesane aktivitesinde izlenen dramatik bir şekilde artan spontan fazik kasılmaların amplitüdünü ve buna bağlı EAA değerlerini kontrol seviyelerine yakın anlamlı olarak azaltmıştır. HE'nin tek başına oral verilmesinin kontrole göre anlamlı bir fark oluşturmaması, HE verilen hemorajik sistit grubundaki artmış tüm mesane hiperaktivitesini anlamlı bir şekilde düzeltmesi onun antioksidan ve muhtemel anti-inflamatuvar etkisine bağlı olabilir. ELİZA ölçümleri de HE'nin antioksidan etkisinin, bu düzeltici etkiye katkısı olduğunu gösterebilir. Bu çalışmada 2 ayrı doz HE kullanılmıştır. Düşük ve yüksek doz HE arasında etki açısından istatiksel açıdan anlamlı olmasa da hafif bir doza bağımlılık oluşmuştur. Çalışmada, HE, siklofosfamid enjeksiyonundan önce 5 gün, enjeksiyondan sonrası ise 3 gün olmak üzere, toplam 8 gün intragastrik olarak uygulandı HE'nin siklofosfamid enjeksiyonundan 5 gün önce verilmeye başlanması ve siklofosfamid verildiği günden itibaren de 3 gün daha verilmesi HE'nin hem koruyucu hem de düzeltici etkilerinin bir arada görüldüğünü ileri sürebiliriz.[6] Tüm mesane aktivitesi ve ELİZA sonuçları

HE’nin hemorajik sistitte hem koruyucu hem de düzeltici etkilerinin olduğunu gösterebilir.

Doğu'da bitkisel terapötik yaklaşımlar artmaktadır. Dolayısı ile batı ülkelerinde de bitkisel ilaç kullanımın popülaritesi artmıştır. Bitkisel ilaç kullanımı haksız yere yan etki içermediği kabul edilerek tercih edilmektedir. Halbuki tam tersi olarak, bitkisel ilaç kullanımının da yıkıcı hepatik hasar da dahil olmak üzere, şiddetli toksisite kullanımıyla ilişkili toksik etkileri olabileceği rapor edilmiştir.[46] Bu sebepten ötürü çalışmamızda karaciğer histopatolojilerini değerlendirdik. Siklofosfamid enjekte edilen hemorajik sistit grubundan alınan karaciğer doku örneklerinin histopatolojik incelemesi, kontrol grubuna yakın bir görünüm sergilemiştir. HE verilen gruplardan alınan karaciğer örneklerinde de normal parankim ve portal alanlar tespit edilmiş, herhangi bir anlamlı patolojiye rastlanmamıştır. Bulgularımız kullanılan dozlarda hünnap ekstresinin karaciğer üzerinde anlamlı bir toksik etki yapmadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasındaki bulgular, siklofosfamid uygulamasının diğer yayınlanmış çalışmalara da uygun olarak belirgin hemorojik sistit patolojisi oluşturduğunu, bunun çalışmamızdaki in vitro izole tüm mesane deneyleri sonuçları ve ELİZA ölçümleri ile desteklendiğini ve HE’nin sistit patolojisini kısmen düzeltilebileceğini göstermektedir. HE’nin bu etkisi onun güçlü anti-inflamatuar ve antioksidan etkilerine bağlı olabilir. HE’nin sistit üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalara gerek vardır. Bu sonuçlar, hemorajik sistit gibi komplikasyonların önlenmesinde yeni tedavi ajanların geliştirilmesi açısından bir fikir verebilir. Aynı zamanda hünnap ekstresinin karaciğer üzerine anlamlı bir patolojik değişikliklere neden olmaması da onun ileride potansiyel bir bitkisel kaynaklı ilaç olması ihtimalini güçlendirmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda, siklofosfamid enjeksiyonu sıçan mesane aktivitesini arttırdı.

2. Siklofosfamid enjeksiyonu, in vitro izole tüm mesane deneylerinde bazal spontan fazik kasılmaların amplitüdünü ve EAA değerlerini anlamlı olarak arttırdı. Aynı şekilde karbakol ile oluşturulan tonik kasılmalar üzerine binişik fazik kasılmalarında aktiviteleri, bazal spontan aktivitesinde görüldüğü gibi kontrole göre anlamlı arttı. Ayrıca, bazal spontan kasılmaların amplitüd EAA değerleri HE uygulaması ile anlamlı olarak azaldı. Ayrıca siklofosfamid enjeksiyonu yapılan grupta azalmış CAT ve SOD ELİZA değerleri kontrole yakın artmıştır. Diğer yandan artmış MDA ELİZA değerleri de kontrol değerlerine yakın değerlere azalma göstermiştir.

3. Hünnap ekstresi verilen gruplardan alınan karaciğer örneklerinde de normal parankim ve portal alanlar tespit edilmiş herhangi bir anlamlı patolojiye rastlanmamıştır. Bulgularımız bu çalışmada kullanılan dozlarda HE'nin karaciğer üzerinde anlamlı bir toksik etki yapmadığını göstermektedir. Ancak daha ileri çalışmalarda kan örneklerinden ALT VE AST 'nin de bakılması muhtemel bir karaciğer toksisitesi varlığını daha netleştirebilir. Bu tez çalışmasında kısıtlı bütçe nedeniyle bu enzimlere bakılamamıştır. Aynı nedenle gruplara alınan deney hayvanı sayısı azaltıldığından ve izole tüm mesane basıncı deneylerinde her bir sıçanın mesanesi ayrı ayrı kullanıldığından, mesane histopatolojine bakılması için mesane dokusu ayrılamamıştır. İleride bu çalışmaların yapılmasında fayda vardır.

4. HE'nin siklofosfamid ile oluşturulan mesane hiperaktivitesini kısmen düzeltmesi onun muhtemel anti-inflamatuvar ve antioksidan etkinliğine bağlı olabilir. Hünnap ekstresinin sistit üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalara gerek vardır.

5. Bu sonuçlar, hemorajik sistit gibi komplikasyonların önlenmesinde yeni tedavi ajanların geliştirilmesi açısından bir fikir verebilir. Hünnap ekstresinin kullanılan dozlarda herhangi bir karaciğer toksisitesinin görülmemesi onun hemorajik sistit gibi

önemli yan etkilerin önlenmesi ve/veya tedavisinde ileride potansiyel bir ilaç olarak geliştirilmesi olasılığını güçlendirebilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Kumar PSR, SYED A, Kumar PN, ASAD M, Deepak Kumar K**. Protective effect of Zizyphus jujuba fruit extract against paracetamol and thioacetamide induced hepatic damage in rats. *The Internet Journal of Pharmacology*, **2009**;7(1).
2. **Jena BK, Ratha B, Kar S**. Wound healing potential of Ziziphus xylopyrus Willd. (Rhamnaceae) stem bark ethanol extract using in vitro and in vivo model. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, **2012**;2(6).
3. **Han B., M. Park**. Folk medicine: The art and science. *The American Chemical Society Washington*, **1986**;7(2):206-210.
4. **Özkan Hİ.** Hünnap (Zizyphus Jujuba Mill.) meyvesinin bazı biyokimyasal bileşenleri ile antibakteriyel hipoglisemik ve total antioksidan aktivitesinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir/ Türkiye, **2017**.
5. **Resim S, Koluş E, Barut O, Küçükdurmaz F, Bahar AY, Dağlı H.** Ziziphus jujube ameliorated cavernosal oxidative stress and fibrotic processes in cavernous nerve injury-induced erectile dysfunction in a rat model. *Andrologia*, **2020**; 52 (7).
6. **Eser N, Göçmen C, Erdoğan Ş, Büyüknacar HS, Kumcu E, Açıkalın A.** Effect of silymarin on bladder overactivity in cyclophosphamide-induced cystitis rat model. *Phytomedicine*, **2012**;19: 840-845.
7. **Büyüknacar HS, Kumcu EK, Göçmen C, Önder S.** Effect of phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram on cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *European Journal of Pharmacology*, **2008**; 586(1-3): 293
8. **Guyton AC, Hall JE.** Guyton & Hall Tıbbi Fizyoloji. 12. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Yayınevi, **2013**.
9. **SİVRİOĞLU K.** Mesane Anatomisi ve işeme Fizyolojisi. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg*, **2005**; 51 (Özel Ek A):16-18.
10. **Chai TC**. Continence and micturition: physiological mechanisms under behavioral control. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2015**; 309(1) 33-4.
11. **Chancellor MB, Yoshimura N**. Neurophysiology of stress urinary incontinence. *Rev Urol*, **2004**;6 (3):19-28.

12. **Park JM, Bloom DA, McGuire EJ.** The guarding reflex revisited. *Br J Urol*. **1997**; 80(6): 940-5.

13. **Haldar S, Dru C, Bhowmick NA.** Mechanisms of hemorrhagic cystitis. *Am J Clin Exp Urol*, **2014**; 2(3) :199-208.

14. **Li R, Leslie SW**. Cystitis. Treasure Island, StatPearls Yayınevi; **2024**.

15. **Goldman JD, Julian K.** Urinary tract infections in solid organ transplant recipients: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Transplant*, **2019**;33(9).

16. **Duane S, Vellinga A, Murphy AW, Cormican M, Smyth A, Healy P, Moore M, Little P, Devane D.** COSUTI: a protocol for the development of a core outcome set (COS) for interventions for the treatment of uncomplicated urinary tract infection (UTI) in adults. *Trials*, **2019**; 20(1):106.

17. **Behzadi P, Behzadi E, Yazdanbod H, Aghapour R, Akbari Cheshmeh M, Salehian Omran D.** A survey on urinary tract infections associated with the three most common uropathogenic bacteria. *Maedica (Bucur)*, **2010**;5(2):111-5.

18. **Haldar S, Dru C, Bhowmick NA.** Mechanisms of hemorrhagic cystitis. *Am J Clin Exp Urol*., **2014**;2(3):199-208.

19. **Jefferson FA, Linder BJ.** Hemorrhagic Cystitis: Making Rapid and Shrewd Clinical and Surgical Decisions for Improving Patient Outcomes. *Res Rep Urol*, **2023**;15:291-303.

20. **Haylen BT, de Ridder D, Freeman RM, Swift SE, Berghmans B, Lee J, Monga A, Petri E, Rizk DE, Sand PK, Schaer GN.** An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction. *Int Urogynecol J.*, **2010**;21(1):5-26.

21. **Robinson D, Cardozo L.** Overactive bladder: diagnosis and management. *Maturitas*, **2012**;71(2):188-93.

22. **Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A**. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn*. **2002**;21(2).

23. **Anderson KE.** The overactive bladder: pharmacologic basis of drug treatment. *Urology* **1997**;50:74–89.

24. **Ogino MH, Tadi P.** Cyclophosphamide. Treasure Island, StatPearls Yayınevi, **2024**.

25. **Colvin OM.** An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Curr Pharm Des*, **1999**;5(8):555-60.

26. **Korkmaz A, Topal T, Oter S.** Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol Toxicol*, **2007**;23(5):303-12.

27. **Stillwell TJ, Benson RC Jr.** Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. A review of 100 patients. *Cancer*, **1988**;61(3).

28. **Reddy V, Winston NR.** Mesna. Treasure Island, StatPearls Yayınevi, **2024**.

29. **Manikandan R, Kumar S, Dorairajan LN.** Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. *Indian J Urol*, **2010**;26(2):159-66.

30. **Çıtıl R, Sorhan S, önder Y, Eğri M.** A Promising Drog for Phytotheraphy; Jujuba (Ziziphus jujuba Mill). *Journal of Integrative and Anatolian Medicine*, **2022**; 3(2)51-62.

31. **Wang S, Zhang J, Zhang Z, Gao W, Yan Y, Li X, Liu C.** Identification of Chemical Constituents in the Extract and Rat Serum from Ziziphus Jujuba Mill by HPLC-PDA-ESI-MSn. *Iran J Pharm Res*, **2014**;13(3):1055-63.

32. **Gao QH, Wu CS, Wang M.** The jujube (Ziziphus jujuba Mill.) fruit: a review of current knowledge of fruit composition and health benefits. *J Agric Food Chem*, **2013**;61(14):3351-63.

33. **Han X, Bai B, Zhou Q, Niu J, Yuan J, Zhang H, Jia J, Zhao W, Chen H.** Dietary supplementation with polysaccharides from Ziziphus Jujuba cv. Pozao intervenes in immune response via regulating peripheral immunity and intestinal barrier function in cyclophosphamide-induced mice. *Food Funct*, **2020**;11(7): 5992-6006

34. **Periasamy S, Wu WH, Chien SP, Liu CT, Liu MY.** Dietary Ziziphus jujuba fruit attenuates colitis-associated tumorigenesis: a pivotal role of the NF-κB/IL-6/JAK1/STAT3 pathway. *Nutr Cancer*, **2020**;72(1): 120-132.

35. **Mesaik AM, Poh HW, Bin OY, Elawad I, Alsayed B.** In vivo anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-diarrhoeal activity of Ziziphus jujuba fruit extract. *Maced J Med Sci*, **2018**;6(5): 757-766.

36. **Jeong O, Kim HS.** Dietary chokeberry and dried jujube fruit attenuates high-fat and high-fructose diet-induced dyslipidemia and insulin resistance via activation of the IRS-1/PI3K/Akt pathway in C57BL/6 J mice. *Nutr Metab*, **2019**;16:38.

37. **Kawabata K, Kitamura K, Irie K, Naruse S, Matsuura T, Uemae T, Taira S, Ohigashi H, Murakami S, Takahashi M, Kaido Y, Kawakami B.** Triterpenoids isolated from Ziziphus jujuba enhance glucose uptake activity in skeletal muscle cells. *J Nutr Sci Vitaminol*, **2017**;63(3): 193-199.

38. **Ji X, Liu F, Peng Q, Wang M.** Purification, structural characterization, and hypolipidemic effects of a neutral polysaccharide from Ziziphus Jujuba cv. *Muzao. Food Chem*, **2018**;245: 1124-1130.

39. **Cai Y, Zhou X, Han A, Chen P, Bai H.** In vitro immunological and anti-complementary activities of two water-soluble lignins from Zizyphus jujube cv. *Jinchangzao. Int J Biol Macromol*, **2017**;105(1): 204-212.

40. **Lam CT, Gong AG, Lam KY, Zhang LM, Chen JP, Dong TT, Lin HQ, Tsim KW.** Jujube-containing herbal decoctions induce neuronal differentiation and the expression of anti-oxidant enzymes in cultured PC12 cells. *J Ethnopharmacol*, **2016**; 188: 275-283.

41. **Hong EH, Song JH, Kang KB, Sung SH, Ko HJ, Yang H.** Anti-influenza activity of betulinic acid from Zizyphus jujuba on influenza A/PR/8 virus. *Biomol Ther (Seoul)*, **2015**;23(4): 345-349.

42. **Wang Y, Xu Y, Ma X, Liu X, Yang M, Fan W, Ren H, Efehi N, Wang X, Zhu X.** Extraction, purification, characterization and antioxidant activities of polysaccharides from Zizyphus jujuba cv. Linzexiaozao. *Int J Biol Macromol*, **2018**;118: 2138-2148.

43. **Lin X, Ji X, Wang M, Yin S, Peng Q.** An alkali-extracted polysaccharide from Zizyphus jujuba cv. Muzao: structural characterizations and antioxidant activities. *Int J Biol Macromol*, **2019**;136: 607-615.

44. **Ghimire S, Kim MS.** Jujube (Ziziphus Jujuba Mill.) fruit feeding extends lifespan and increases tolerance to environmental stresses by regulating aging-associated gene expression in Drosophila. *Biogerontology*, **2017**;18(2): 263-273.

45. **Yılmaz S, Kaya E.** Ratlarda Siklofosfamid ile Oluşturulmuş Hemorajik Sistitte Propolis ve Enginarın Koruyucu Etkileri. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg*. **2018;** 32(2): 93-98.

46. **Stournaras E, Tziomalos K.** Herbal medicine-related hepato-toxicity. *World J Hepatol*, **2015**; 7(19): 2189-2193.

47. **Szigeti GP, Somogyi GT, Csernoch L, Szell EA.** Age-dependence of spontaneous activity of the rat urinary bladder. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, **2005**; 26: 23-29.

48. **Mills IW, Greenland JE, McMurray G, McCoy R, Ho KM, Noble JG, Brading AF.** Studies of the pathophysiology of idiopathic detrusor instability: the physiological properties of the detrusor smooth muscle and its pattern of innervation. *J. Urol*, **2000**; 163(2): 646–651.

49. **Levin RM, Ruggieri MR, Velagapudi S, Gordon D, Altman B, Wein AJ.** Relevance of spontaneous activity to urinary bladder function: an in vitro and in vivo study. *J. Urol*, **1986**;136: 517–521.

50. **Sugaya, K, de Groat,WC.** Inhibitory control of the urinary bladder in the neonatal rat in vitro spinal cord-bladder preparation. *Developmental Brain Research*. **2002**; 138: 87–95.

51. **Drake MJ, Harvey IJ, Gillespie JI.** Autonomous activity in the isolated guinea pig bladder. *Exp Physiol*, **2003**; 88: 19-30.

52. **Gillespie JI, Harvey IJ, Drake MJ.** Agonist and nerve induced phasic activity in the isolated Whole bladder of the guinea pig. Evidence for two types of bladder activity. *Exp Physiol*, **2003**; 88: 343-357.

53. **Szell EA, Somogyi GT, de Groat WC, Szigeti GP.** Developmental changes in Spontaneous smooth muscle activity in the neonatal rat urinary bladder. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. **2003**; 285.

54. **Ng YK, de Groat, WC, Wu HY.** Muscarinic regulation of neonatal rat bladder spontaneous contractions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*, **2006;** 291.

8. ÖZGEÇMİŞ

Perihan Ulular 19 Nisan 1995 yılında Seyhan/Adana'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Adana'da tamamladı. 2019 yılında İstanbul Bilgi Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünden mezun oldu. 2022 yılında Çukurova Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.