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

SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULAN SİSTİT ÜZERİNDE YENİ BİR ANTİOKSİDAN OLAN SİLİMARİN'İN ETKİSİ

Nadire ESER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Cemil GÖÇMEN

ADANA-2011

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

SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULAN SİSTİT ÜZERİNDE YENİ BİR ANTİOKSİDAN OLAN SİLİMARİN'İN ETKİSİ

Nadire ESER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Cemil GÖÇMEN

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TF.2010.YL8 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2011

TEŞEKKÜR

Yetişmemde değerli katkılarından dolayı Farmakoloji Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Ergin Şingirik hocama, tez çalışmalarımın belirlenmesi ve yürütülmesinde ve yetişmemde değerli katkıları ile hep yanımda olan Sayın Prof. Dr Cemil Göçmen'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince katkıları olan Sayın Prof. Dr. Serpil Önder, Doç Dr. Eda Kumcu ve Dr. Sinem Büyüknacar'a ve Farmakoloji Anabilim Dalındaki diğer hocalarıma da sonsuz teşekkürler ederim.

Ayrıca tezime katkılarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç Dr. Şeyda Erdoğan'a, teknik ve idari personele ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan canım aileme de çok çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ii
İÇİNDEKİLER iii
ŞEKİLLER DİZİNİ v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ viii
ÖZET ix
ABSTRACT x
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİ 3
2.1. Mesane'nin Anatomik ve Fizyolojik Yapısı 3
2.2. Mesane'nin İnervasyonları 3
2.2.1. Sakral Parasempatik Sinirler (PELVİK SİNİRLER) 4
2.2.2. Torakolumbar sempatik sinirler (HİPOGASTRİK SİNİRLER) 6
2.2.3. Somatik Eferent Yolaklar 6
2.2.4. Aferent Yolaklar 6
2.3. İdrar Yapmanın Sinirsel Kontrolü 7
2.3.1.Kolinerjik Mekanizmalar 8
2.3.2. Adrenerjik Mekanizmalar 8
2.3.2.1. α Adrenerjik Reseptörler 8
2.3.2.2. β Adrenerjik Reseptörler 8
2.3.3. Purinerjik Mekanizmalar 9
2.4. Kalsiyum Kanalları 10
2.5. Potasyum Kanalları 11
2.6. Mesanenin Spontan Etkinliği 11
2.7. Siklofosfamid 11
2.8. Silimarin 12
3. GEREÇ VE YÖNTEM 14
3.1. İn Vitro İzole Mesane Strip Çalışmaları 14
3.2. İn Vitro İzole Tüm Mesane Basınç Çalışmaları 15

3.3. İn Vivo Sistometrogram (Mesane Basıncı) Çalışmaları 16
3.4. Deney Grupları 17
3.4.1. Deney Grubu 17
3.4.2. Deney Grubu 17
3.4.3. Deney Grubu 17
3.4.4. Deney Grubu 17
3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz 18
3.6. Kullanılan İlaçlar ve Solüsyonların Hazırlanması 18
3.7. Histopatolojik Çalışmalar 19
4. BULGULAR 20
4.1. İzole Sıçan Mesane Striplerinde Yapılan Deneyler 20
4.2. İzole Sıçan Tüm Mesane Dokusunda Yapılan Deneyler 28
4.3. İn vivo Sıçan Sistometrogram Ölçümleri 31
4.4. Histopatolojik Bulgular 34
5. TARTIŞMA 36
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 40
KAYNAKLAR 41
ÖZGEÇMİŞ 47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Mesane inervasyonlarının şematik olarak gösterilmesi 4

Şekil 2. M3 ve P2X reseptörlerin uyarılması sonucu detrusor kasının kasılma mekanizması 5

Şekil 3. A delta ve C lifleri 7

Şekil 4. Silimarin bitkisi 12

Şekil 5. Deney düzeneğinin şematik olarak gösterilmesi 16

Şekil 6. Deney düzeneğinin şematik olarak gösterilmesi 17

Şekil 7. Kontrol grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri. 20

Şekil 8. Siklofosfamid grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri. 21

Şekil 9. Siklofosfamid + silimarin grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri. 21

Şekil 10. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarının % amplitud değerleri. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, $n= 8$). 22

Şekil 11. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarının EAA değerleri. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir($p<0.05$, $n= 8$). 22

Şekil 12. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarının frekans (kasılma sayısı/dakika) değerleri. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, $n= 8$). 22

Şekil 13. Kontrol (A), siklofosfamid (B) ve siklofosfamid + silimarin (C) grubu izole sıçan mesane striplerinde, elektriksel saha stimülasyonu (1, 2, 4, 8,16 ve 32 Hz; 50 V; 0.5 ms; 15-30 saniye) ile oluşturulan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri. 23

Şekil 14. Kontrol (A), siklofosfamid (B) ve siklofosfamid + silimarin (C) grubu izole sıçan mesane striplerinde, elektriksel saha stimülasyonu (1, 2, 4, 8,16 ve 32 Hz; 50 V; 0.5 ms; 15-30 saniye) ile oluşturulan kasılma cevaplarının % amplitude değerleri. 24

Şekil 15. Kontrol grubu izole sıçan mesane striplerinde, karbakol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) kasılmalarını gösteren trase örnekleri. 24

Şekil 16. Siklofosfamid grubu izole sıçan mesane striplerinde, karbakol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) kasılmalarını gösteren trase örnekleri. 25

Şekil 17. Siklofosfamid + silimarin grubu izole sıçan mesane striplerinde, karbakol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) kasılmalarını gösteren trase örnekleri.26

Şekil 18. Kontrol (A), siklofosfamid (B) ve siklofosfamid + silimarin (C) grubu izole sıçan mesane striplerinde, karbakol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) kasılmalarını gösteren trase örnekleri. 27

Şekil 19. Kontrol (A), siklofosfamid (B) ve siklofosfamid + silimarin (C) grubu izole sıçan mesane striplerinde, karbakol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) ile oluşturulan kasılma cevaplarının % amplitud değerleri. 28

Şekil 20. Kontrol grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri. 28

Şekil 21. Siklofosfamid grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri. 29

Şekil 22. Siklofosfamid + silimarin grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri. 29

Şekil 23. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarının % amplitud değerleri. * control cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, $n= 8$). 30

Şekil 24. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarının EAA değerleri. ***** Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, $n= 8$). † "SP" grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, $n= 8$). 30

Şekil 25. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarının frekans (kasılma sayısı/dakika) değerleri. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, n= 8). 31

Şekil 26. Kontrol grubu sıçan sistometrogram cevaplarını gösteren trase örnekleri. 31

Şekil 27 Siklofosfamid grubu sıçan sistometrogram cevaplarını gösteren trase örnekleri. 32

Şekil 28. Siklofosfamid + silimarin grubu sıçan sistometrogram cevaplarını gösteren trase örnekleri. 32

Şekil 29. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu sıçanların mesane basıncı değerleri. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, n= 8). 33

Şekil 30. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu sıçanların idrar yapma aralıkları. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, n= 8). 33

Şekil 31. Kontrol grubundaki sıçan mesanesinden hazırlanan histolojik kesitlerde normal ürotelyal epitel ile döşeli mesane mukozası, submukoza ve kas tabakası.izlendi (Hematoksilen Eozin (H&E), x100). 34

Şekil 32. Siklofosfamid enjeksiyonu yapılan sıçanlardan 72 saat sonra alınan mesane dokusundan hazırlanan histolojik kesitlerde epitel tüm katı boyunca nükleer atipi, pleomorfizm, stratifikasyon kaybı (kırmızı oklar) ve mitoz (sarı ok) içeren in situ karsinom görüldü (H&E, x400). 35

Şekil 33. Siklofosfamid ve silimarin uygulanan sıçanlardan alınan mesane dokusundan hazırlanan histolojik kesitlerde epitelde hafif displazi (kalın kırmızı ok) ve ağır displazi (ince kırmızı oklar) görüldü (H&E, x400). 35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin trifosfat
EAA	Eğri altında kalan alan
$(Ca^{2+})_i$	Hücre içi kalsiyum
Ca^{2+}	Kalsiyum
ESS	Elektriksel saha stimulasyonu
sAMP	siklik Adenozin monofosfat

ÖZET

Sıçanlarda Siklofosfamid ile Oluşturulan Sistit Üzerinde Yeni Bir Antioksidan Olan Silimarin'in Etkisi

Silimarin, deve dikeni bitkisinden elde edilen bir flavonoid karışımıdır. Antioksidan, antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Siklofosfamid mesane hiperaktivitesi ile karakterize hemorajik sistite neden olmaktadır. Çalışmada 92 adet Wistar Albino türü erişkin dişi sıçan kullanıldı. Çalışmada, sıçanlarda intraperitoneal siklofosfamid enjeksiyonunu takiben 72 saat sonra oluşan hemorajik sistitte, 7 gün ağızdan intragastik kanül ile verilen silimarin'in etkisi araştırıldı. 56 sıçana i.p siklofosfamid uygulandı. Uygulamadan 72 saat sonra mesane fonksiyonları; 1. izole tüm mesane preparatlarında, 2. izole mesane striplerinde ve 3. üretan anestezisi altında devam eden serum fizyolojik solüsyonu infüzyonu ile yapılan sistometrogram ölçümleri ile değerlendirildi.

Siklofosfamid muamelesi izole tüm mesane ve mesane striplerinde oluşan spontan kasılmaları kontrole göre önemli ölçüde arttırdı. Diğer yandan kolinerjik reseptör agonisti karbokol ile oluşturulan kasılmalar ile elektriksel saha stimülasyonu ile oluşturulan nörojenik kasılmalar, kontrole göre anlamlı görülmedi. Siklofosfamid enjeksiyonu anestezi altındaki sıçanlarda yapılan sistometrogram ölçümlerinde idrar yapma aralıklarını anlamlı derecede kısalttı ve mesane basıncını ise anlamlı olarak arttırdı. Siklofosfamid uygulanan sıçanlarda izole tüm mesane preparatlarında ve izole mesane striplerinde sponton kasılmaların amplitüdü, eğri altında kalan alanları ve frekansları silimarin ile anlamlı olarak azaldı. Aynı şekilde silimarin uygulaması anestezi altındaki sıçanların sistometrogram ölçümlerinde idrar yapma aralıklarını anlamlı olarak uzattı, mesane kasılma basınçlarını ise azalttı. Silimarin uygulanan sıçanların mesanelerinin histopatolojik incelenmesinde kısmi düzelme görüldü.

Silimarin'in bu etkisi, güçlü anti-inflamatuvar ve antioksidan etki özelliğine bağlı olabilir. Silimarin, bu özellikleri nedeni ile siklofosfamid ile oluşan mesane hiperaktivitesi tedavisinde yeni bir stratejik hedef olabilir.

Anahtar Sözcükler: Silimarin, Siklofosfamid, sistit, hiperaktif mesane, sıçan

ABSTRACT

Effect of A Novel Antioxidant Silymarin on Cyclophosphamide-induced Cystitis in Rats

Silymarin is a mixture of flavonolignans extracted from Silybum marianum and it has beneficial antioxidant and anti-inflammatory properties. Cyclophosphamide induces a haemorrhagic cystitis characterized by bladder overactivity. 92 female Wistar rats were used. The study was conducted to examine effects of silymarin, was given the oral intragastrik tube for 7 days on bladder overactivity in rats with cyclophosphamide treatment. 56 rats received a single i.p. injection of cyclophosphamide, and after 72 h, bladder function was evaluated by 1. in vitro preparations of whole bladders, 2. in vitro isolated bladder strips and 3. cystometry with continuous saline infusion under urethane anesthesia. Cyclophosphamide-treatment potentiated the basal spontaneous contractions of isolated whole bladders and isolated bladder strips compared to control rats.

On the other hand cyclophosphamide-treatment did not affect the neurogenic or cholinergic contractions induced by electrical field stimulation or a muscarinic receptor agonist carbachol respectively. In anesthetized rats, during continuous infusion cystometry, intercontraction interval was significantly shorter and bladder voiding pressure was significantly greater in cyclophosphamide-injected rats than in control rats. Silymarin treatment caused a significant decrease on the amplitude, frequency (contractions/min) and area under the curve of spontaneous contractions in isolated whole bladder and isolated bladder strips. Also, silymarin treatment could increase the intercontraction intervals and decrease contraction pressure. Histopathological examination showed that silymarin had a partial improvement on rat bladders.

The protective and restorative effect of Silymarin can depend on its powerful anti-inflammatory and antioxidant effects. Silymarin may be considered as an attractive strategy for the treatment of cyclophosphamide-induced bladder overactivity

Key Words: Silymarin cyclophosphamide, cystitis, overactive bladder, rat

1.GİRİŞ

Deneysel olarak yapılan çalışmalarda mesanenin spontan kasılma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir[1,2]. Bu çalışmada gözlenen spontan kasılma sıklığı ve büyüklüğündeki kasılma artışının aferent yolağın aktivasyonu ile, idrar yapmadan oluşan kasılmaların görüldüğü hiperaktif mesane bulgularına benzer olduğu gösterilmiştir. Ayrıca izole mesane dokusunda meydana gelen fazik kasılmaların da,mesanenin dolum fazı sırasında, idrar yapmadan oluşan aktivitelerle ilgili olabileceği gösterilmiştir. Bu tür kasılmaların, idrar yapma ile ilişkisi olmadığından "Non voiding" kasılmalar olarak tanımlanmıştır[3,4,5]. Normalde mesane fonksiyon olarak, sadece idrar yapma esnasında kasılır, hiperaktif mesanede ise dolum fazı sırasında da detrusor kasında kasılmalar görülmektedir.

Antineoplastik tedavide alkilleyici ajan olarak kullanılan siklofosfamid, vaskülitler, Behçet hastalığı, lupus, Sjögren, skleroderma, romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarda da kullanılmaktadır. Başlıca yan etkisi steril hemorajik sistittir. Siklofosfamid ile oluşan hemorajik sistit mesane kapasitesinde azalma ve idrar yapma refleksinin önemli derecede artması ile karakterizedir. Tıbbi deyimi ile " aşırı aktif mesane veya hiperaktif mesane" diye adlandırılan ciddi patolojik bozukluğa neden olmaktadır[6,7]. Siklofosfamid bu özelliği nedeni ile deneysel hayvan modellerinde sık olarak kullanılmaktadır. Siklofosfamid deneysel hayvan modellerinde spontan ve fazik kasılmaları belirgin derecede arttırmaktadır. Oluşan sistitin tedavisi "hiperaktif mesane" ve gelişen inflamasyon nedeni ile önemlidir[8,9]. Deneysel hayvan sistit modellerinde çeşitli antioksidan maddeler kullanılarak yeni tedavi şekilleri ortaya çıkarılmaya çalışılmaktadır [10].

Deve dikeni (Herba Cardui mariae) bitkisinin içerdiği silymarin adlı aktif madde, vucudu hasara neden olan radikallerden koruyan güçlü antioksidandır[11]. İnsan ve deneysel hayvan modellerinde bu maddenin antioksidan ve antiinflamatuar etkileri gösterilmiştir[12,13,14]. Farelerde yapılan bir çalışmada silimarinin mesane kanserlerinin tedavisinde faydalı olabileceği gösterilmişti [15].

Yapılan literatür araştırması sonucunda, siklofosfamid uygulanan deneysel hayvan modellerinde, oluşan hemorajik sistit ve birlikte gelişen mesane hiperaktivitesinde, silymarinin etkisinin araştırılmadığı saptanmıştır. Bu nedenle siklofosfamid uygulaması ile oluşan, spontan kasılmaların aşırı aktivite gösterdiği ve idrar yapma sıklığının artması ile karakterize hemorajik sistit modeli üzerinde silimarinin antioksidan özelliğinin tedaviye katkısı olup olmayacağını araştırmayı amaçladık. Silimarinin, deneysel hemorajik sistit modelinde, spontan kasılmalardaki artış ve idrar yapma sıklığındaki etkileri, *in vitro, in vivo ve in situ* yöntemler kullanılarak araştırılması planlandı. Bu amaçla *in-vitro* mesane stripleri, *in-vitro* tüm mesane ve *in-situ* uretan anestezisi altındaki sıçanlarda sistometogram ölçüm deneyleri silimarinin etkilerini araştırımak için kullanıldı.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Mesane'nin Anatomik ve Fizyolojik Yapısı

Mesane (Vesika urinaria); Temel işlevi idrarı biriktirmek olan mesanedeki düz kas yapısına ***detrusor*** adı verilir. Detrusorun birbirlerini serbestçe çaprazlayan düz kas demetleri, mesane boynunda dairesel özellik alarak fonksiyonel bir sfinkter özelliği kazanır[16]. Detrusor kası kasıldığı zaman içindeki basınç 40-60 mmHg'ya yükselebilir[17]. Bu kasın kasılması idrar yapma (miksiyon) esnasında mesanenin boşaltılmasından sorumludur[18].

İdrar torbasının arka çeperinde, boynun hemen üstündeki küçük üçgen şeklindeki alana ***trigon*** adı verilir[17]. Trigon, üreterlerin giriş deliklerinden mesane boynuna uzanır. Derin trigon detrusor düz kasının, yüzeyel trigon ise üreter kaslarının uzantısıdır[16].

Mesanenin boynu yani arka üretra 2-3 cm uzunluğunda olup buraya çoğu kez ***iç sfinkter de*** denilir. İç sfinkter sirkuler düz kas lifleri ile bağ dokusundan oluşur. Aslında bu yapı gerçek bir bir anatomik sfinkter olmayıp mesane boynu ile proksimal (arka) üretranın birleşim yeridir[16,17]. Düz kas lifleri, submukazol olarak üretra boyunca uzanır ve ***dış sfinkter*** yapısına katılır. Dış sfinkter (rabdosfinkter) adını alan bu kas tamamıyla düz kastan yapılı mesanenin gövdesiyle boynundakilerden farklı olarak çizgili kas liflerinden oluşur. Bu kas, sinir sisteminin istemli kontrolü altında olup, istemsiz kontrol mesaneyi boşaltmayı denese bile idrarın çıkmasını engeller[16,17].

2.2. Mesane'nin İnervasyonları

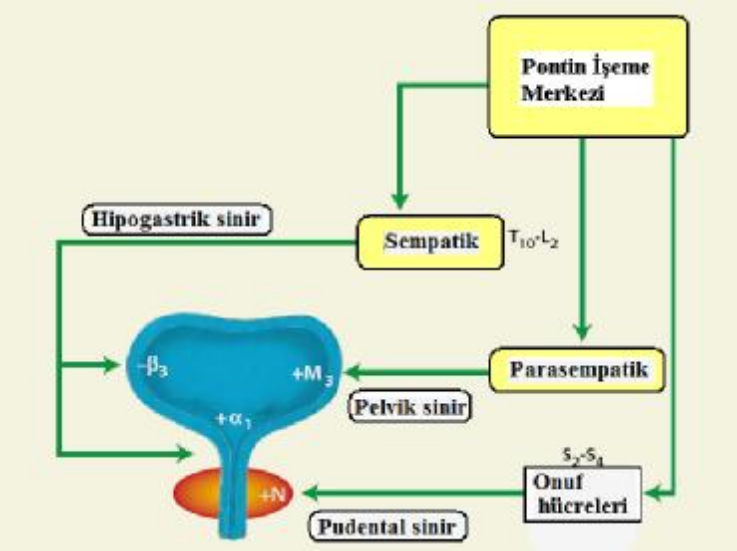
İdrarın depolanması ve belli aralıklarla atılması; rezervuar görevi üstlenen mesane ile mesane boynu, üretra ve üretranın çizgili kas yapısındaki sfinkterini de kapsayan idrarın atılmasında rol oynayan iki fonksiyonel yapının birlikte etkinlik göstermesi sonucu gerçekleşir[19,20,21].

İdrarın depolanması esnasında, mesane çıkışı kapanır ve mesane düz kası durgundur. Mesane çeperindeki gerim eşik değerin üstüne çıkıncaya kadar mesane dolar[17,19]. Mesanenin bu doluluk ve gerimi pelvik sinirler içerisinde aferent yolaklar ile

sakral spinal kordun dorsal boynuzuna taşınır[22]. İdrar yapma esnasında ise mesane çıkışındaki kaslar gevşer ve mesane düz kası kasılır, mesane içi basınç (intravesikal basınç) artar[19]. Bu değişimler 3 çeşit periferal sinirler (eferent yolaklar) tarafından kontrol edilir (şekil 1). Bunlar:

1- Sakral parasempatik sinirler (pelvik sinirler)
2- Torakolumbar sempatik sinirler (hipogastrik sinirler ve sempatik zincir)
3- Sakral somatik sinirler (pudental sinirler)[19,20]

Bu periferal sinirler, eferent motor aksonlarının yanı sıra aferent (duysal) yolakları da içerirler.

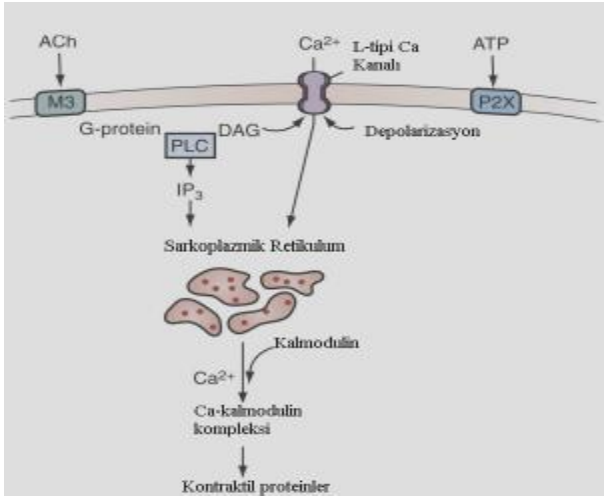


Şekil 1. Mesane inervasyonlarının şematik olarak gösterilmesi

2.2.1. Sakral Parasempatik Sinirler (PELVİK SİNİRLER)

Sakral parasempatik sinirler, mesanede başlıca en önemli eksitatör yolaklardandır. Kolinerjik pregangliyonik sinirler, sakral spinal kordun intermedyolateral bölgesinde lokalize olmuşlardır[23]. Bu sinirler pelvik sinirler yolu ile aksonlarını, pelvik pleksus ve mesane duvarının içindeki gangliyon hücrelerine gönderirler. Mesane gangliyonundaki iletim, nikotinik kolinerjik mekanizma aracılığı ile olur. Bu nikotinik kolinerjik mekanizma, muskarinik, adrenerjik, purinerjik ve peptiderjik türdeki çeşitli reseptörlerin aktivasyonu tarafından modüle edilebilir[24].

Parasempatik gangliyon hücrelerinden, kolinerjik (asetilkolin) ve non adrenerjik non kolinerjik transmiterlerin salınması ile mesane düz kası uyarılır. Kolinerjik eksitatör ileti, mesanede atropin ile bloke edilebilen muskarinik reseptörler aracılığı ile olur[25,26]. Postgangliyonik sinirlerden asetilkolin'in salınması sonucu oluşan parasempatik sistem aktivasyonu çeşitli muskarinik reseptörleri uyarır. Bu muskarinik reseptörlerin M_1, M_2, M_3, M_4 ve M_5 olmak üzere 5 alt tipi vardır[27]. Reseptör bağlama ve moleküler biyolojik tekniklerin kullanıldığı çalışmalarda, insan mesanesinde özellikle M_2 ve M_3 reseptörlerinin bulunduğu gösterilmiştir. Selektif alt tip muskarinik reseptör antagonistlerinin uygulandığı ve muskarinik reseptör knockout farelerde yapılan çalışmalarda M_3 reseptörlerinin eksitator iletimde esas reseptör olduğu gösterilmiştir[28.] Kedi detrusor kasında yapılan bir çalışmada, M_3 reseptörlerinin asetilkolin aracılığı ile uyarılması, G_i protein, fosfolipaz C ve inositoltrifosfat – bağımlı Ca^{2+} salınımına ve bunun sonucunda da mesanede kasılmaya sebep olduğu belirtilmiştir[29] (şekil 2).



Şekil 2. M_3 ve P2X reseptörlerin uyarılması sonucu detrusor kasının kasılma Mekanizması.

M_2 reseptörleri ise indirek olarak çalışırlar, ya M_3 aracılı kasılmaları potansiyelize ederler ya da β adrenerjik reseptör aracılı gevşemeleri etkisiz hale getirirler. Bu reseptörler, G_i (inhibitör G proteini) proteinini aktive ederek, adenozin trifosfatı, siklik adenozin monofosfata (sAMP) dönüştüren adenil siklaz enzimini inhibe ederler ve kasılmaya sebep olurlar[31].

Kolinerjik eksitatör ileti, muskarinik reseptörler aracılığı ile oluşurken non kolinerjik eksitatör ileti ise adenozin trifosfat (ATP) aracılığı ile P2X purinerjik reseptörleri uyarılması sonucu oluşur. Uretral düz kastaki inhibitör ileti ise parasempatik sinirlerden salınan nitrik oksid aracılığı ile olur[25,26].

2.2.2. Torakolumbar Sempatik Sinirler (HİPOGASTRİK SİNİRLER)

Pregangliyonik sempatik nöronlar, torakolumbar spinal kord ($T_{10} - L_2$) içinde intermedyolateral hücre sütunlarından yükselir. Bu lifler, farklı seviyelerde spinal kordu terk ederler. Sempatik yolağın gangliyonik sinir iletiminden asetilkolin sorumludur. Postgangliyonik terminallerde ise norepinefrin salınır ve bu madde mesane tabanının ve üretranın kasılmasını sağlar. Spinal ve gangliyonik seviyede parasempatik yolakların inhibisyonu, detrusor kasının gevşemesine sebep olur ve adrenerjik uyarı direkt olarak detrusorun kasılabilirliğini azaltır[32]. Sempatik eferent yolakların uyarılması sonucu;

1- β adrenoseptör yolu ile detrusor kasının inhibisyonu[26]

2- α_1 adrenoseptörler vasıtasıyla üretra ve mesane tabanının eksitasyonu[26]

3- α_2 ve α_1 adrenoseptörlerin aracılığı ile mesane parasempatik gangliyonlarında sırası ile inhibisyon ve fasilasyon meydana gelebilir[24].

Bu nedenle, bütün bu bulgular, mesanede idrar depolama sırasında parasempatik sinir etkinliği azaldığında adrenerjik inhibitör yolağın daha etkin olduğunu, fakat idrar yapma esnasında ise parasempatik sinir aktivitesinin artması sonucu, adrenerjik yolağın etkinliğinin azaldığını düşündürebilir[20].

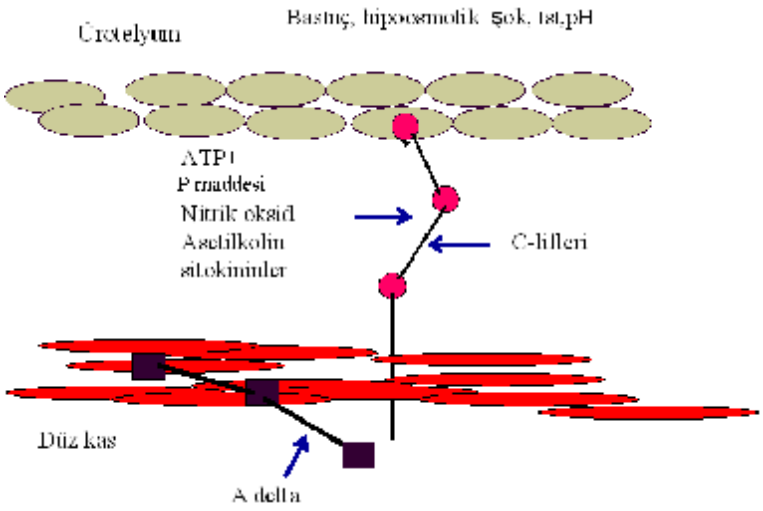
2.2.3. Somatik Eferent Yolaklar

Üretral çizgili kasların eferent inervasyonu, Onuf hücresi olarak adlandırılan lateral ventral boynuzun kısıtlı bir bölge içinde bulunmaktadır. Sifinkter motor nöronlar pudental sinirlere aksonlarını gönderirler ve kavşak sonrası nikotinik reseptörleri uyararak asetilkolin salınması sonucu sifinkter kaslarını kasarlar[33].

2.2.4. Aferent Yolaklar

En önemli aferent yolaklar, miyelinli Aδ-lifleri ve miyelinsiz C lifleridir (şekil 3). Kedi ve sıçanlarda yapılan elektrofizyolojik çalışmalar, normal idrar yapma refleksinin küçük miyelinli Aδ-lifleri aracılığı ile olduğunu göstermektedir. Aδ-lifleri

mesanenin pasif gerimine duyarlıdır ve mesane doluluğu hakkındaki bilgileri en yüksek merkezlere iletirler. Aδ-liflerinin etkin hale gelebilmesi için, insanda mesane doluluğundaki duyarlığın algılandığı intravezikal basınç olarak nitelendirilen eşik değer 5-15 cm H_2O dur[34,35]. C lifleri ise yüksek eşik değerine sahiptir ve mesane gerimine duyarlı değildir. Bu nedenle C liflerine "*sessiz C- lifleri*" adı da verilir. Bu lifler, kimyasallar, vücuda zarar veren maddeler veya soğuk uyaranlara yanıt verirler[36]. Ayrıca bu lifler, mesanede, enflamatuar hücreler, üretelyal hücreler ve aferent sinirler tarafından salınan taşikinin, nitrik oksid, ATP, prostaglandinler, endotelinler ve nörotropik faktörleri içeren birçok diğer maddelerin yanısıra, nörotoksinlere, kapsaisin ve resiniferatoksinlere de duyarlıdırlar[37]. Bu nedenle C lifleri, normal idrar yapma döngüsünde görev yapmazlar.



Şekil 3. A delta ve C lifleri[38]

2.3. İdrar Yapmanın Sinirsel Kontrolü

Alt üriner bölgenin santral sinir sistemi ile kontrolü, beyin omurilik arasında çeşitli seviyelerdeki nöral yolaklarla olur[19.] Doğum sonrası gelişim boyunca mesanenin nöral kontrolü ve kasılabilirliği değişim gösterir. Sağlıklı bebeklerde, mesane kapasitesi düşüktür, idrar yapma basıncı ise yüksektir[39]. Bebeklerde, idrar yapma spinal kord refleks yolu ile spontan olarak gerçekleşir. 1-2 yaş arasında, frontal ve parietal lobun nöral gelişimi ile mesanenin kapasitesi gittikçe artar[40]. 4 - 6 yaşından sonra idrar yapma serebral korteks tarafından istemli bir şekilde olur. Sempatik ve üretral çıkıştaki somatik

inputlar aracılığı ile meydana gelen idrar depolama mekanizmaları, mesane dolumu sırasında sakral aferent sinir etkinliği tarafından aktive olan spinal refleks döngüsüne bağlıdır[19].

2.3.1. Kolinerjik Mekanizmalar

Sağlıklı insanlardan elde edilen detrusor stripleri ile yapılan deneysel bir çalışmada, kolinerjik muskarinik reseptör agonistler ve intrinsik kolinerjik sinirlerin elektriksel olarak uyarılması ile detrusor kasının kasıldığı ve bu cevabın muskarinik reseptör antagonisti olan atropin tarafından tamamen ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir[41]. Klinikte mesane hiperaktivite tedavisinde muskarinik reseptör antagonistleri çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu ilaçlar detrusor kasında kavşak sonrası muskarinik reseptörleri bloke ederek kısmen bir etki oluştururlar. Daha öncede belirtildiği gibi muskarinik reseptörlerin 5 alt tipi vardır. Mesanede bulunan muskarinik reseptör tipleri M_1, M_2 ve M_3'dür. M_3 reseptörleri, kolinerjik kasılmalara aracılık eder. Kavşak öncesi M_1 reseptörlerinin aktivasyonu asetilkolin salınımını fasilite ederken, M_2/M_4 reseptörlerinin aktivasyonu ise asetilkolin salınımı inhibe eder[19].

2.3.2. Adrenerjik Mekanizmalar

2.3.2.1. α -Adrenerjik Reseptörler

Alfa adrenerjik uyarı, herhangi patolojik durumu olmayan sağlam bir mesanede önemli bir role sahip olmamasına rağmen, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, patolojik durumlarda, α adrenerjik reseptör yoğunluğunun arttığı ve deneysel olarak mesanede norepinefrin ile oluşan cevapların gevşemeden kasılmaya dönüştüğü gösterilmiştir[42].

2.3.2.2. β -Adrenerjik Reseptörler

Mesane düz kasında, β_1 ve β_2 olmak üzere 2 alt tip β adrenoseptör tespit edilmiştir. β_2 adrenoseptörlerinin, adenilat siklazı aktive etmesi sonucu düz kasın gevşemesinde önemli bir role sahip olduğu bilinmekle birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalarda, insan mesane dokusunda β_3 adrenoseptör mesenger RNA'nın ekspresyonu ile β_3 reseptör alt tipininde detrusor kasının gevşemesine aracılık edebileceğini

göstermektedir. β adrenerjik uyarı ile oluşan gevşeme, adenilat siklazın uyarılması ve sAMP miktarının artması sonucu meydana gelmektedir[43].

2.3.3. Purinerjik Mekanizmalar

Purinerjik ileti, idrarın depolanması ve boşaltılmasını kontrol eden hem aferent hem de eferent sinyal yolaklarının regulasyonunda önemli bir role sahiptir[44].

Daha önce yapılan çalışmalarda, parasempatik sinirlerin uyarılması sonucu, mesanede atropine dirençli kasılmalar meydana geldiği ve bu atropine direçli non adrenerjik non kolinerjik sinirlerden açığa çıkan medyatörün ATP olduğu gösterilmiştir. ATP, purinerjik reseptörlerin 2 alt familyasını etkiler. Bunlardan ilki iyon kanalı ailesinden olan P2X, ikincisi ise G-proteini ile kenetli reseptör ailesinden olan P2Y dir. P2X'in 7 alt tipi, P2Y'nin ise 8 alt tipi olduğu gösterilmiştir[19].

Normal insan mesanesinde, atropin, parasempatik sinir aracılı kasılmaların en az % 95 ini bloke eder. Bu durumda sağlıklı mesanede meydana gelen parasempatik aracılı kasılmalarda kolinerjik mekanizmaların daha baskın olduğunu görmekteyiz. Bununla birlikte yapılan bazı çalışmalar, bu atropine dirençli kasılmalardan purinerjik sinyalin sorumlu olduğunu göstermektedir[45]. Patolojik durumlarda, ko-transmisyonun purinerjik komponentinde artış meydana geldiğini gösteren çalışmalar da vardır[45,46]. Bu çalışmaların birinde, insan mesanesinde purinerjik sinir aracılı kasılmanın, intestinal sistit, mesane çıkışındaki tıkanıklık ve muhtemelen nörojenik mesane gibi patofizyolojik durumlarda % 40 oranında artığı gösterilmiştir[47]. Ayrıca intestinal sistitli hastaların mesanesinin epitelyal hücrelerinden salınan ATP'nin, sağlıklı hücrelerden salınan ATP ye oranla çok daha fazla olduğunu gösterilmiştir[48].

Purinerjik sinyal, mesanede aferent yolaklarda da rol oynar. ATP, mesane gerildiği zaman ürotelyal hücrelerden salınır. Mesane gerilmesi sonucu oluşan sinirsel cevaplara $P2X_3$ reseptörlerinin aracılık ettiği duysal sinir kayıtları ile gösterilmiştir[49]. $P2X_3$ reseptörlerini etkileyen purinerjik agonistler, mesane aferent sinirleri duyarlı hale getirirler ve bu etkileri ile siklofosfamid tarafından oluşturulan sistitin etkisini taklit ederler[50]. Bu nedenle $P2X_3$ reseptörleri, hem ağrı hem de detrusor kası hiperaktivite tedavisinde, farmakolojik çalışmalar için olası hedef olabilir[51].

Yaşlı sıçanlarda, ATP için mesane duyarlılığında bir artış gözlenmiştir fakat bu değişim asetilkolin veya potasyum klorür cevaplarında görülmemiştir[52]. Yaşlı insan

mesane düz kasındaki nörotransmisyonda purinerjik yanıtların arttığı fakat bununla birlikte kolinerjik yanıtların ise artmadığı görülmüştür[53].

2.4. Kalsiyum Kanalları

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda da gösterildiği gibi, detrusor kasında kasılmanın başlaması için hücre içindeki Ca^{2+} (Ca^{2+}_i) miktarının artması gerekmektedir. Bununla birlikte, hücre içinde artan kalsiyum miktarının, hücre dışı aralıktan hücre içerisine Ca^{2+} girmesinden dolayı mı yoksa hücre içi depolardan salınması sonucu mu olduğu hala tartışmalıdır. Düz kasda birçok tipte Ca^{2+} kanalları bulunmuştur fakat detrusorda esas olarak voltaja duyarlı Ca^{2+} kanallarının varlığı gösterilmiştir[54].

Kobay mesane düz kas hücresinde voltaj klamp tekniği ile yapılan bir çalışmada, depolarizasyona bağlı olarak hücre içi kalsiyum değişimlerinde, voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının önemli rol oynadığını gösterilmiştir[55].

Hayvan detrusor düz kas dokusunda yapılan bir çalışmada, ATP ve asetilkolin gibi ana transmiterlerin, detrusor kasını uyarması sonucu, dihidropiridine duyarlı Ca^{2+} kanalları ile hücre dışından hücre içerisine Ca^{2+} girişi ve bu transmiterler aracılığı ile intrasellüler Ca^{2+}'un mobilizasyonunun önemi belirtilmiştir[25].

İnsan detrusor kasında yapılan çalışmada ise, detrusorun uyarılabilirliği için ekstraselüler Ca^{2+}'un büyük bir rol oynadığı görülmüştür. Bununla birlikte muskarinik reseptörlerin uyarılması sonucu ektraselluler kalsiyum girişinin ve intrasellüler depolardan kalsiyum salınımının buna katkısı ile ilgili farklı çalışmalar da bulunmaktadır[56]. Ayrıca muskarinik ve/veya purinerjik uyarı sonucu oluşan kasılmalarda ektrasellüler Ca^{2+} girişinin önemini gösteren çalışmalar da vardır. Uchida ve arkadaşlarının, domuz düz kas striplerinde yaptığı bir çalışmada, karbakol ile oluşturulan tonik kasılma cevaplarının, esas olarak hücre membranındaki depolarizasyona ve ektrasellüler Ca^{2+} 'un hücre içerisine girişine bağlı olduğu gösterilmiş ve bu depolarizasyondan, ATP'ye duyarlı K^+ kanalının inaktivasyonun sorumlu olabileceği ifade edilmiştir[57].

2.5. Potasyum Kanalları

Mesane detrusor kasının fonksiyonunda önemli role sahip 2 çeşit K^+ kanalı vardır.

1- ATP'ye duyarlı K^+ kanalları

2- Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanalları: yüksek, orta ve düşük akımlı Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanalları olmak üzere 3 çeşittir[58].

2.6. Mesanenin Spontan Etkinliği

İnsan ve hayvan mesanelerinde yapılan in vivo sitometri çalışmalarından elde edilen kayıtlarda, mesanenin, küçük veya büyük boyutta spontan kasılma üretme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir[1,2]. Ayrıca overaktif mesane bulguları gösteren insanlardan ve mesane çıkışı tıkalı olan hayvanlardan elde edilen in vitro mesane şeritlerinde yapılan bir çalışmada, spontan kasılmaların normale kıyasla daha da artığı bulunmuştur[59]. İn vitro olarak ölçülen artan spontan kasılmalar, in vivo overaktif mesanede meydana gelen eksternal sifinkterleri açmaksızın, aferent yolağın aktivasyonu sonucu oluşan idrar yapmaksızın gerçekleşen kasılmalara benzer olduğu da gösterilmiştir[60].

2.7. Siklofosfamid

Siklofosfamid, onkolojide tümör tedavisinde kullanılan alkilleyici antineoplastik bir ilaç olmakla birlikte, özellikle vaskülitler, Behçet hastalığı, lupus, Sjögren, skleroderma, romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarda da kullanımı olan bir ilaçtır. Oral ve parenteral kullanımı mevcuttur. Piyasada "Endoxan" adlı ticari sunumları vardır. En spesifik yan etkisi steril hemorajik sistittir. Siklofosfamid ile oluşan hemorajik sistit mesane kapasitesini azaltma ve idrar yapma refleksinin önemli derecede artması ile karakterize olan ve tıbbi deyimi ile "Aşırı aktif mesane veya hiperaktif mesane" ile isimlendirilen ciddi bir patalojik bozukluğa yol açmaktadır[6,7]. Siklofosfamid bu özelliği ile deneysel hayvan modellerinde sık olarak kullanılmaktadır. Siklofosfamid deneysel hayvan modellerinde spontan ve fazik kasılmaları önemli derecede belirgin olarak arttırmaktadır[61]. Siklofosfamid ile oluşan sistitin tedavisi bahsedilen "hiperaktif mesane" durumu ve oluşan inflamasyon nedeni ile önem arzetmektedir[8,9]. Yüksek doz siklofosfamid uygulanan hastalarda hemorjik sistit

gelişiminden korunmak için “Mesna” profilaksisi önerilmektedir. Günümüzde bu amaçla hala bu önemli yan etkiden koruyucu ilaç araştırması devam etmektedir.

2.8. Silimarin

Silyburn marianum (Syn; CarduusMarianus L - Compositae) türünün çiçekli dallarıdır. Bu tür 30-100 cm yükseklikte yetişen, gövdesi köşeli, seyrek tüylü, 1-2 yıllık otsu bir bitkidir. Yapraklar soluk yeşil renkli, beyaz damarlı kenarları derin dişli ve dikenlidir. Çiçekler baş şeklinde bir arada mor (nadiren beyaz renkli) renktedir. Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde yaygın bir türdür. Yol ve tarla kenarlarında yetişir. Bitki tanen, rezin, uçucu yağ ve acı maddeler içerir. Meyvede sabit yağ %30, nişasta tanen ve flavolignan türevi bileşikler (Silibin, Silidianin, Silikristin) ve diğerleri bulunmaktadır. Diğer isimleri, Akız, Devedikeni, Deve kengeli, Kengel, Kıbbın, Meryemana Dikeni, Sütlükengel, Şevkülmeryem dir. En çok bilinen adı “Deve Dikeni”dir[62].



Şekil 4. Deve dikeni bitkisinin yaprak ve çiçeklerine ait resimler

Deve dikeni bitkisinin içeriğindeki aktif madde olan Silimarin vücudu hücre hasarına neden olan serbest radikallerden koruyan kuvvetli bir antioksidandır[11]. Gerek insan gerekse deneysel hayvan modellerinde bu maddenin antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri gösterilmeye başlanmıştır[12,13,14]. Farelerde yapılan bir çalışmada silimarinin mesane kanserlerinde de kullanılabileceği gösterilmiştir[15]. Silimarin klinikte en çok hepatoprotektif ajan olarak kullanılmaktadır[63,64]. Köpeklerde gentamisin ile oluşturulan nefrotoksisite silimarin ile düzeltilmiştir[65]. Ayrıca akut inflamasyon modellerinde silimarinin inflamasyonu azalttığı, ödemi çözdüğü ve nötrofil migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir[66].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneylerde Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen 250- 300 gram ağırlığında Wistar Albino türü erişkin dişi sıçanlar (Çukurova Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurul onayı alınan) kullanıldı.

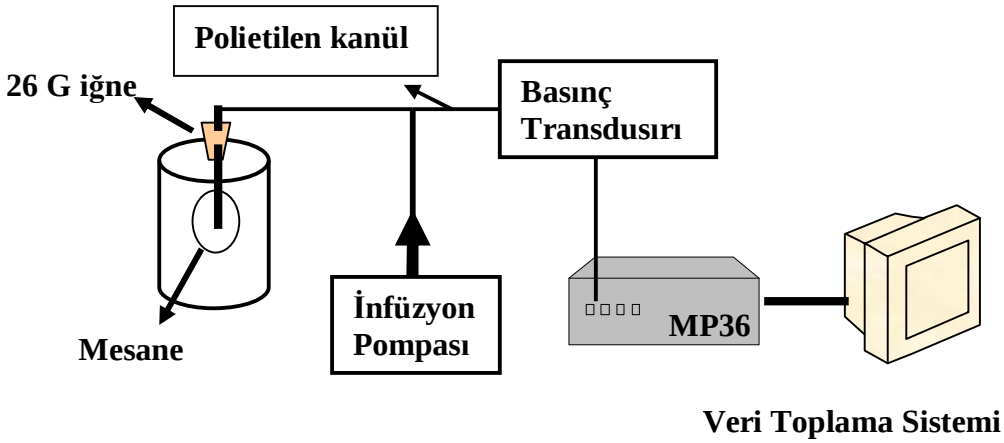
3.1. İn Vitro İzole Mesane Strip Çalışmaları

Sıçanlar izofluran ile anestezi altında servikal dislokasyon ile öldürülerek abdominal kısım açıldı ve mesane bütün olarak çıkarıldı. Daha sonra mesane, içinde Krebs solusyonu (119 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.5 mM CaCl2, 1.2 mM MgCl2, 15 mM NaHCO3, 1.2 mM NaHPO4, and 11 mM glukoz) bulunan bir petri kutusu içinde izole edilerek 4 ayrı strip haline getirildi. Mesane stripleri Krebs solusyonu içeren, 37^{o}C ile ısıtılan ve %5 O_2 ve % 95 CO_2 ile havalandırılan 5 ml'lik izole organ banyoları içine 1 gram tansiyon altında platin içeren elektrodlar arasına asıldı. Doku cevapları izometrik transduserler ile bir Veri Toplama Sistemi'ne (BIOPAC-MP36) aktarıldı. Cevaplar bilgisayar ortamına kaydedildi. Sonuçlar GraphPad programı kullanılarak istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi. Dokunun dengelenmesi için 60 dakika beklendi. Bu dinlenme periyodunun ardından kullanılacak farmakolojik ajanlar banyo ortamına eklendi. Daha sonra bazal spontan kasılma cevapları 60 dakika boyunca kaydedildi. Ardından banyo ortamına karbakol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) ortama kimülatif olarak ilave edildi ve oluşturulan tonik etkiye bakıldı. Tonik kasılmalar en az 10 dakika boyunca izlendi ve ardından banyo ortamı Krebs solusyonu ile yıkanarak karbakol ortamdan uzaklaştırıldı. Spontan kasılmaların boyutunun ilacın uygulanmasından önceki seviyesine gelmesi beklendi ve ardından dokulara bir stimülatör aracılığı (Grass S88) ile elektriksel saha stimulasyonu (ESS) (1, 2, 4, 8,16 ve 32 Hz; 50 V; 0.5 ms; 15-30 saniye) uygulandı. ESS frekansa bağlı olarak giderek artan kasılma cevapları oluşturdu. Dokular tekrar taze Krebs solusyonu ile yıkanarak spontan kasılmaların ESS uygulamadan önceki haline gelmesi beklendi. Daha sonra dokular 100 mM KCl içeren Krebs solusyonu ile kastırılarak deneyler tamamlandı.

3.2. İn Vitro İzole Tüm Mesane Basınç Çalışmaları:

İzofluran ile anestezi edilen sıçanlar servikal dislokasyon ile öldürülerek abdominal kısım açıldı ve mesane uretra ile 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 solusyonu (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 dakika'lık inkübasyon periyodunun ardından dokular dakikada 50 µl olacak şekilde infüzyon pompası yardımıyla Krebs solusyonu ile yavaşça dolduruldu. Her bir 50 µl infüzyonun sonunda elektriksel saha stimulasyonu (Grass S88; ESS, 50 volt, 1.5 milisaniye durasyon, 10 Hz ve 15-30 saniye) uygulandı. ESS kasılması maksimum olana kadar mesaneye aralıklarla 50 µl Krebs solusyonu infüze edildi. Her bir mesaneye infüze edilen toplam Krebs solusyonu 250 ± 10.5 µl idi. Mesanede doluluk sağlandıktan sonra infüzyon durdurularak Krebs solusyonu ile banyo ortamı yıkandı, 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.

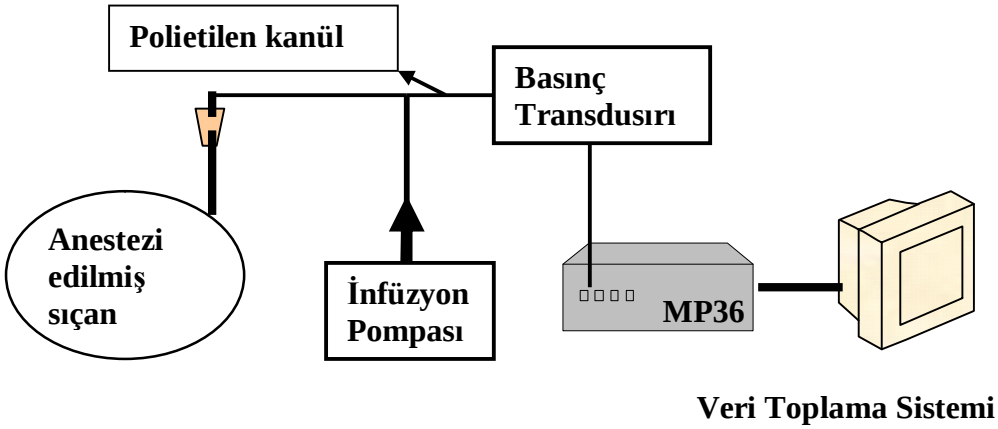
Mesane içinde yeterli doluluk ve basınç sağlandıktan sonra, dokular 15-20 dakikalık bir dengelenme periyoduna bırakıldı. Daha sonra bazal spontan kasılma cevapları 60 dakika boyunca kaydedildi. Ardından banyo ortamına karbokol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) ortama kimülatif olarak ilave edildi ve oluşturulan tonik etkiye bakıldı. Tonik kasılmalar en az 10 dakika boyunca izlendi ve ardından banyo ortamı Krebs solusyonu ile yıkanarak karbokol ortamdan uzaklaştırıldı. Spontan kasılmaların boyutunun ilacın uygulanmasından önceki seviyesine gelmesi beklendi ve ardından dokular 100 mM KCl içeren Krebs solusyonu ile kastırılarak deneyler tamamlandı.



Şekil 5. Deney düzeneğinin şematik olarak gösterilmesi

3.3. İn Vivo Sistometrogram (Mesane Basıncı) Çalışmaları

Bu gruptaki çalışmalar üretan anestezisi altındaki sıçanların mesane fonksiyonlarını ölçmeye yönelik planlandı. Üretan anestezi yapılmış her iki cinsten sıçanlar 1 saatlik beklemeden sonra tekrardan sevofluran anestezisi altında opere edilerek abdominal kısım açıldı. Mesane tepesine bir iğne ile delik açılarak mesane içine bir polietilen kanül (PE-50) yerleştirildi. Bu kanül mesane sıkıca tespit edilip diğer ucu üçlü musluk ile bir infüzyon pompasına ve bir basınç transduserine bağlandı. İnfüzyon pompası ile mesaneye dakikada 0.04 ml serum fizyolojik verilerek mesane dolumu sağlandı. Basınç transduserleri ile alınan mesane basıncı ile ilgili değişiklikler bir Veri Toplama Sistemi'ne (BIOPAC-MP36) aktarıldı. Cevaplar bilgisayar ortamına kaydedildi. Sonuçlar GraphPad programı kullanılarak istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi. Anestezi edilen sıçanlar da sistometrogram ölçümleri 4 saat boyunca izlenerek hayvanın idrar yapma sırasında mesanesinde gelişen basınç artışının maksimum değerleri (amplitüd) ve iki idrar yapma arasında geçen süreler (**inter contraction interval-ICI**) değerlendirildi.



Şekil 6. Deney düzeneğinin şematik olarak gösterilmesi

3.4. Deney grupları:

Bu çalışmada her iki cinsten toplam 92 adet sıçan kullanıldı. Tüm deneyler 4 ayrı grup hayvanlar üzerinde yapıldı.

3.4.1. Deney Grubu

Kontrol grubu olarak değerlendirilecek. Bu deney grubuna sadece intraperitoneal (i.p) serum fizyolojik enjekte edilecektir. Bu grupta toplam 28 adet sıçan kullanıldı.

3.4.2. Deney Grubu

Bu gruba i.p olarak Siklofosfamid (150 mg/kg) enjeksiyonu yapılacaktır. Uygulamadan 72 saat sonra hayvanlar yukarıda bahsedilen 3 ayrı deney yöntemi ile çalışmaya alınacaktır. Bu grupta toplam 28 adet sıçan kullanıldı.

3.4.3. Deney Grubu

Bu gruba 7 gün süre ile silimarin oral olarak 200 mg/kg/gün dozunda intragastrik gavaj kanülü ile verildi. 8. günde hayvanlar 3 ayrı deney yöntemi ile çalışmaya alınacaktır. Bu grupta toplam 8 sıçan kullanıldı.

3.4.4. Deney Grubu

Bu gruba 7 gün süre ile silimarin oral olarak 200 mg/kg/gün dozunda intragastrik gavaj kanülü ile verildi 5. günde oral silimarin uygulanan hayvanlara ayrıca i.p olarak Siklofosfamid (150 mg/kg) enjeksiyonu yapıldı. Siklofosfamid enjeksiyonunu

takiben 72 saat sonra yani 8. günde hayvanlar yine yukarıda bahsedilen 3 ayrı deney yöntemi ile çalışmaya alındı. Siklofosfamid yapılan hayvanlara 6. ve 7. günlerde de silimarin uygulamasına devam edildi.. Bu grupta toplam 28 adet sıçan kullanıldı.

3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Şıçan mesane dokusunda yapılan deneyler de spontan ve tonik kasılmaların **amplitüdü** in vitro izole strip çalışmalarında mg olarak; in vitro izole tüm mesane çalışmalarında ise cm-su olarak ölçüldü. Elde edilen spontan fazik veya tonik kasılmalar, her deneyin sonunda uygulanan 100 mM KCl ile elde edilen kasılma cevaplarına oranlanarak kasılmanın yüzdesi olarak ifade edildi.

$$\text{Yüzde (\%) Kasılma} = \frac{\text{Spontan veya tonik kasılma}}{\text{KCl kasılması}} \times 100$$

Ayrıca sıçan mesanesinde sırası ile oluşan spontan veya tonik 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.

İn vivo anestezi edilmiş sıçanlarda yapılan deneylerde sistometrogram ölçümlerinde ise hayvanın idrar yapma sırasında mesanesinde gelişen basınç artışının maksimum değerleri (amplitüd) cm-su olarak ölçüldü. Ayrıca iki idrar yapma arasında geçen süreler (**inter contraction interval-ICI**) dakika cinsinden ölçüldü.

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'den küçük *P* değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Bütün veriler, Ortalama ± Standart Hata olarak ifade edildi.

3.6. Kullanılan İlaçlar ve Solusyonların Hazırlanması

Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin tümü SIGMA firmasından temin edildi. Deneylerde kulanılan kimyasal ajanlar; Silimarin, siklofosfamid ve karbokoldür. Bu ajanlardan; silimarin ve karbakol distile suda çözülerek günlük taze hazırlandı. 100

mM KCl Krebs solusyonunda çözülerek hazırlandı. Bu stok solusyonlardan 5 ve/veya 10 µl organ banyosuna verilerek deney için istenilen konsantrasyona ulaşıldı. Deney boyunca bütün kimyasal maddeler günlük olarak hazırlandı. Siklofosfamid serum fizyolojik içinde eritilerek günlük olarak hazırlandı ve sıçanlara intraperitoneal uygulandı.

3.7. Histopatolojik Çalışmalar:

4 ayrı deney grubuna ait sıçanlardan bazıları çalışmaya alınmadan mesaneleri çıkarılıp formaldehit içine alınıp Patoloji Anabilim Dalı'na incelenmek üzere gönderildi. Patoloji Anabilim dalında; %10 luk formolde tespit edilmiş mesane dokusundan, 0.3 cm'lik kesitler alınarak kasetlere konuldu. Kasetler, formol-alkol-xylol-parafin setinden geçirildikten sonra bloklama işlemi yapıldı. Beş mikron kalınlığında kesilen parafin kesitler, lam üzerine konulup etüvde 60 – 70 ° C'de parafini eriyene kadar tutuldu. Daha sonra, önceden hazırlanmış olan xylol içerisinden yavaş bir şekilde geçirildi. Takiben farklı %'lerdeki alkol (% 99,9 – 70) solüsyonlarından geçirildi. Sonra distile suda iyice yıkanarak parafinden tamamen temizlendi (Deparafinizasyon). Lamlar, Mayer Hematoksilen içerisinde 45 saniye ile 90 saniye arasında bir süre bekletilerek boyandı. Çeşme suyu ile yıkandıktan sonra % 70'lik alkolde hazırlanan; % 0.5'lik HCL solüsyonuna batırıldı. Çeşme suyu ile yıkanan lam üzerindeki dokular , %1'lik NH_3'den geçirildi. Ardından % 50' lik alkol solüsyonundan geçirilen dokular, eozin içerisinde 5-15 saniye arasında bir zaman bekletilerek boyandı. Dokular boyanma gerçekleştirildikten sonra yeniden çeşme suyunda yıkandı. Ardından %70 - %99.9 arasında degişen alkol solüsyonlarından sırasıyla geçirildi (Dehidrasyon). Son olarak xylol'de en az 10 dakika bekletilip üzerine lamel kapatılan dokular, mikroskop altında incelenmeye hazır hale getirildi. Eksize edilen mesane dokularından hazırlanan histopatolojik kesitler ışık mikroskobunda değerlendirildi. Mesanede, stromada iltihabi hücre infiltrasyonu, fibrozis ve ödem gibi patolojik bulgular değerlendirildi.

4. BULGULAR

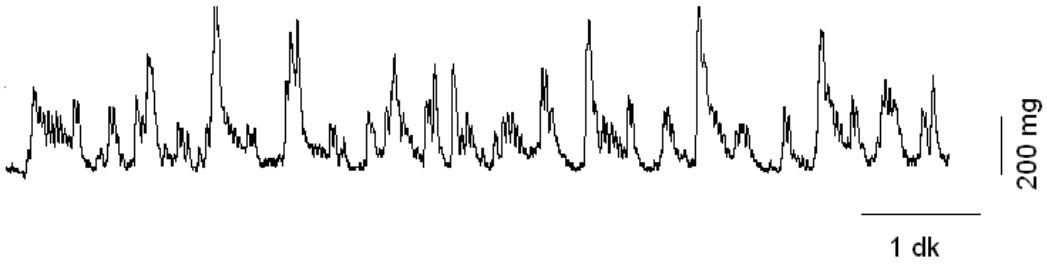
4.1. İzole Sıçan Mesane Striplerinde Yapılan Deneyler

Kontrol grubu sıçanların mesanesinden izole edilen stripler spontan kasılma aktivitesi gösterdi (Şekil 7). Bu spontan kasılma aktivitesi 3 saat boyunca izlendi, Spontan kasılmaların ortalama amplitüd değeri % kasılma olarak 13.42 ± 0.99 bulundu (Şekil 10). EAA ise 2.15 ± 0.33 cm.su/dakika bulundu (Şekil 11). Spontan kasılmaların frekansı ise dakikada 1.33 ± 0.15 olarak tespit edildi (Şekil 12).



Şekil 7. Kontrol grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri.

Siklofosfamid grubu sıçanların mesanesinden izole edilen striplerin spontan kasılma aktivitesi kontrole göre artış gösterdi (Şekil 8). Spontan kasılmaların amplitüd ve frekansı kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Bu spontan kasılma aktivitesi 3 saat boyunca izlendi, Spontan kasılmaların ortalama amplitüd değeri % kasılma olarak 25.43 ± 3.1 bulundu. EAA ise 5.2 ± 0.5 cm.su/dakika bulundu. Spontan kasılmaların frekansı ise dakikada 2.03 ± 0.14 olarak tespit edildi.



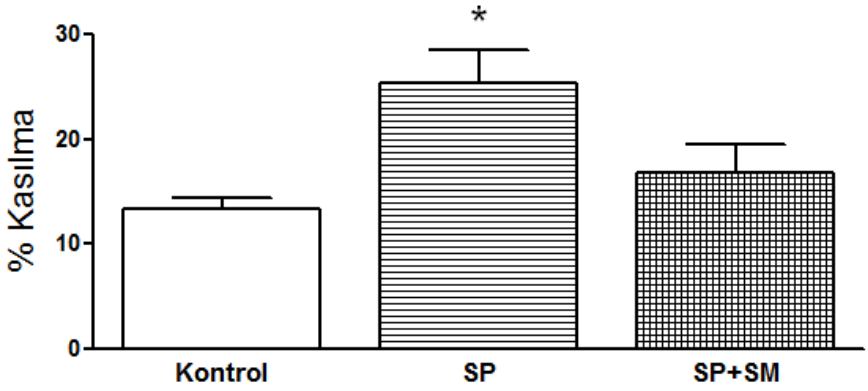
Şekil 8. Siklofosfamid grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri.

Siklofosfamid ve silimarin grubu sıçanların mesanesinden izole edilen striplerin spontan kasılma aktivitesi kontrole benzer bir seyir izledi (Şekil 9). Spontan kasılmaların amplitüd ve frekansı siklofosfamid grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Bu spontan kasılma aktivitesi 3 saat boyunca izlendi, Spontan kasılmaların ortalama amplitüd değeri % kasılma olarak 16.75 ± 2.7 bulundu. EAA ise 1.9 ± 0.4 cm.su/dakika bulundu. Spontan kasılmaların frekansı ise dakikada 1.6 ± 0.3 olarak tespit edildi. Tek başına silimarin uygulaması cevapları etkilemedi.

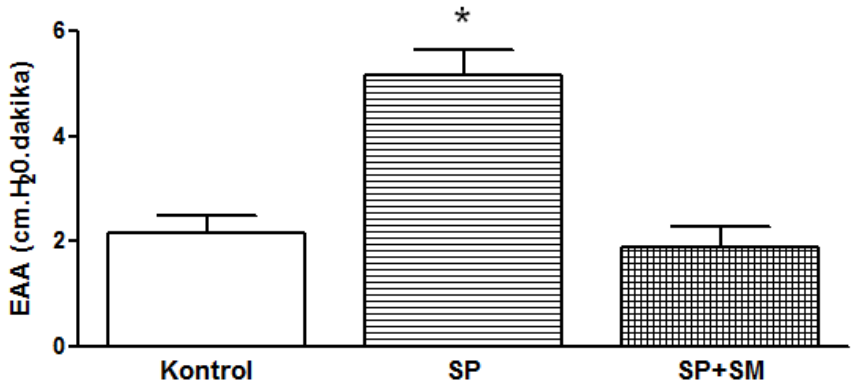


Şekil 9. Siklofosfamid + silimarin grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri.

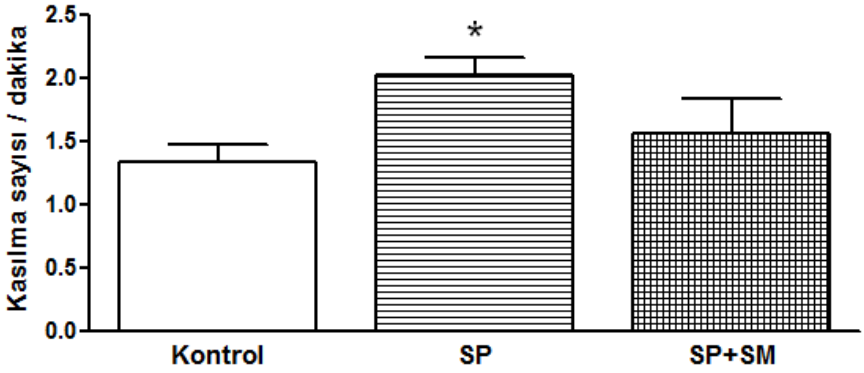
Kontrol, siklofosfamid ve siklofosfamid + silimarin grubu sıçanların izole mesane striplerinin spontan kasılma cevaplarının amplitüd, EAA ve frekans değerleri şekil 10, şekil 11 ve şekil 12 de grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 10. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarının % amplitud değerleri. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, n= 8).

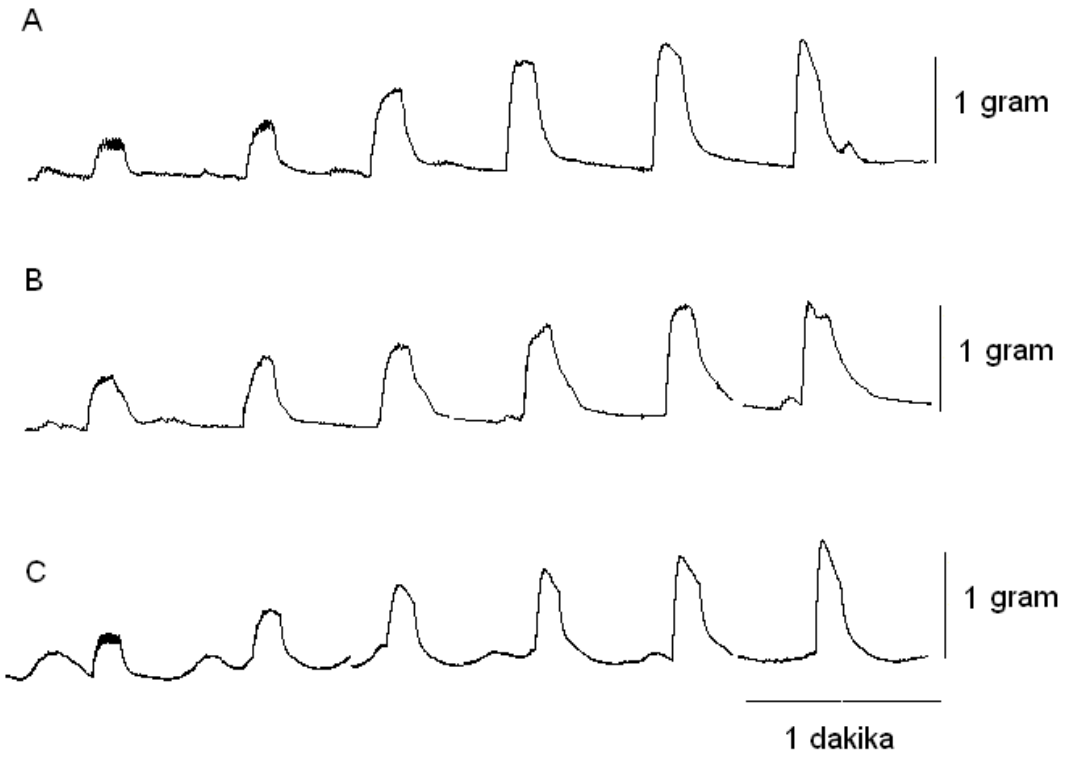


Şekil 11. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarının EAA değerleri. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, n= 8).



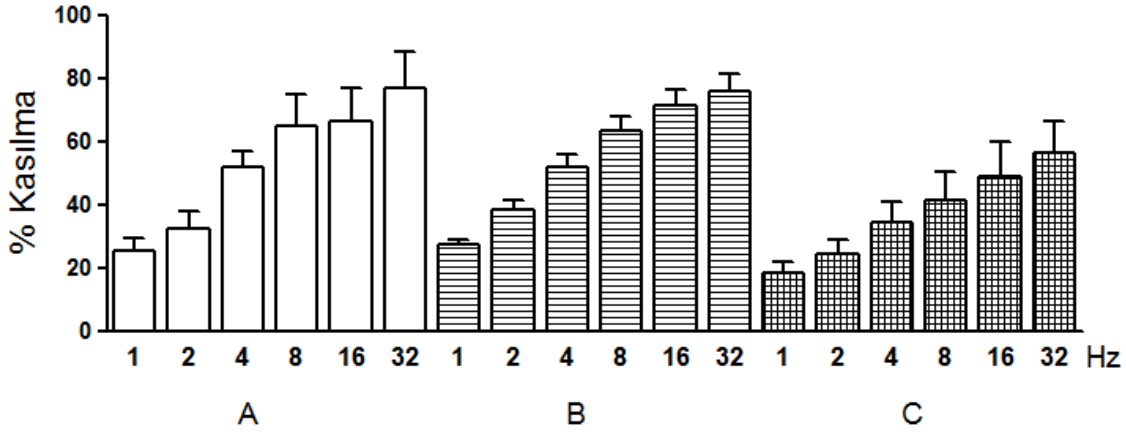
Şekil 12. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan mesane striplerinde, spontan kasılma cevaplarının frekans (kasılma sayısı/dakika) değerleri. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, n= 8).

Kontrol grubu sıçanlardan elde edilen izole mesane striplerinde ESS uyarıları frekansa bağımlı kasılma cevapları oluşturdu. Aynı şekilde diğer iki grup (siklofosfamid ve siklofosfamid + silimarin grupları) ta da ESS ile frekansa bağımlı kasılma cevapları elde edildi (Şekil 13).



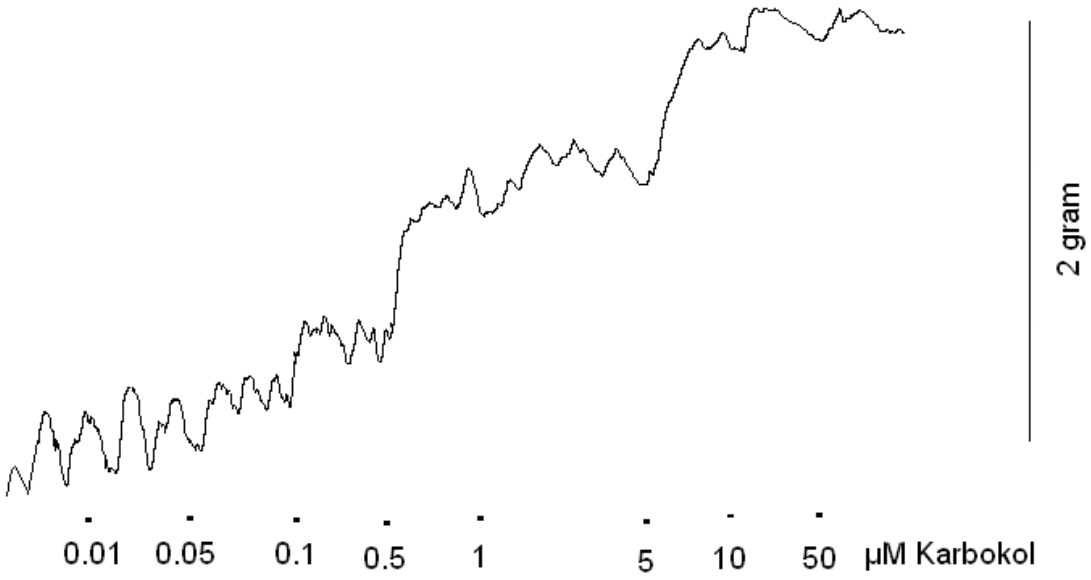
Şekil 13. Kontrol (A), siklofosfamid (B) ve siklofosfamid + silimarin (C) grubu izole sıçan mesane striplerinde, elektriksel saha stimülasyonu (1, 2, 4, 8,16 ve 32 Hz; 50 V; 0.5 ms; 15-30 saniye) ile oluşturulan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri.

Siklofosfamid enjeksiyonu dokuların ESS uyarılarına olan kasılma cevaplarının amplitüd değerlerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadı. Aynı şekilde siklofosfamid + silimarin grubunda da kontrole benzer kasılma değerleri elde edildi (Şekil 14). Tek başına silimarin uygulaması cevapları etkilemedi.



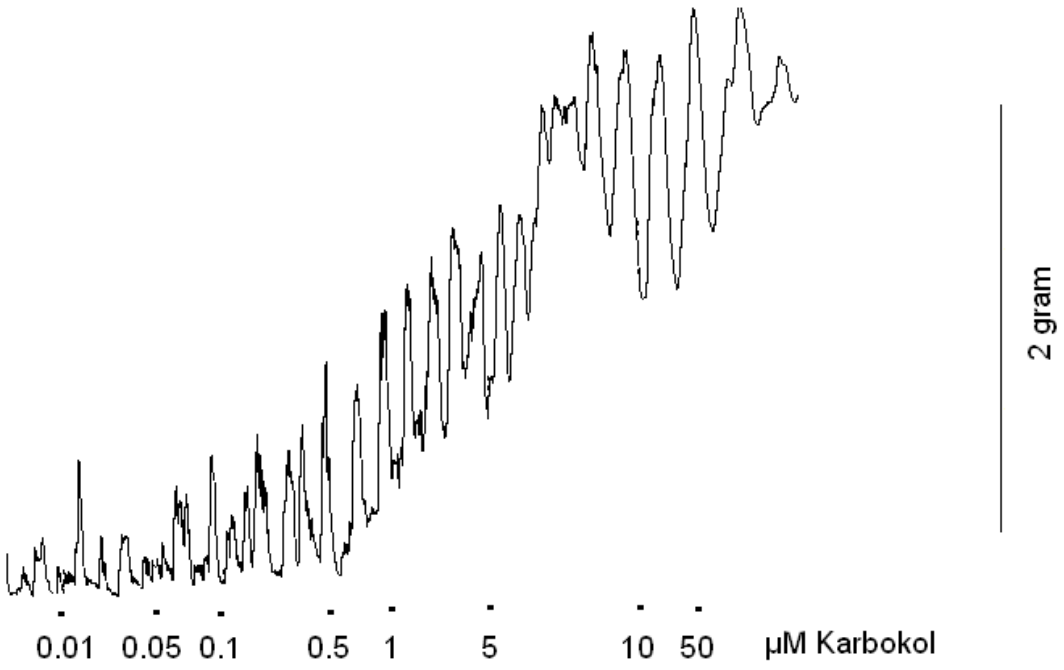
Şekil 14. Kontrol (A), siklofosfamid (B) ve siklofosfamid + silimarin (C) grubu izole sıçan mesane striplerinde, elektriksel saha stimülasyonu (1, 2, 4, 8,16 ve 32 Hz; 50 V; 0.5 ms; 15-30 saniye) ile oluşturulan kasılma cevaplarının % amplitud değerleri.

Kontrol grubu sıçanlardan elde edilen izole mesane striplerinde karbokol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) doza bağımlı kasılma cevapları oluşturdu (şekil 15).



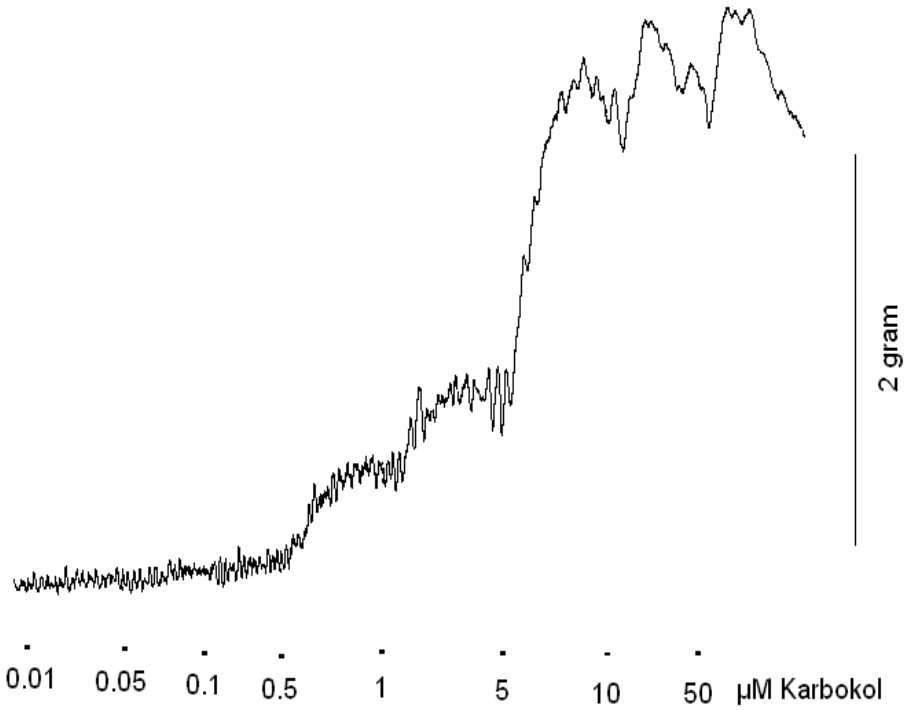
Şekil 15. Kontrol grubu izole sıçan mesane striplerinde, karbokol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) kasılmalarını gösteren trase örnekleri.

Aynı şekilde siklofosfamid enjeksiyonu yapılmış sıçanların izole mesane striplerinde de karbokol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) uygulaması doza bağımlı kasılma cevapları oluşturdu. Ancak bu kasılma cevapları üzerine binişik ve bazala göre daha yüksek amplitüde sahip spontan kasılma artışları gözlendi (Şekil 16).



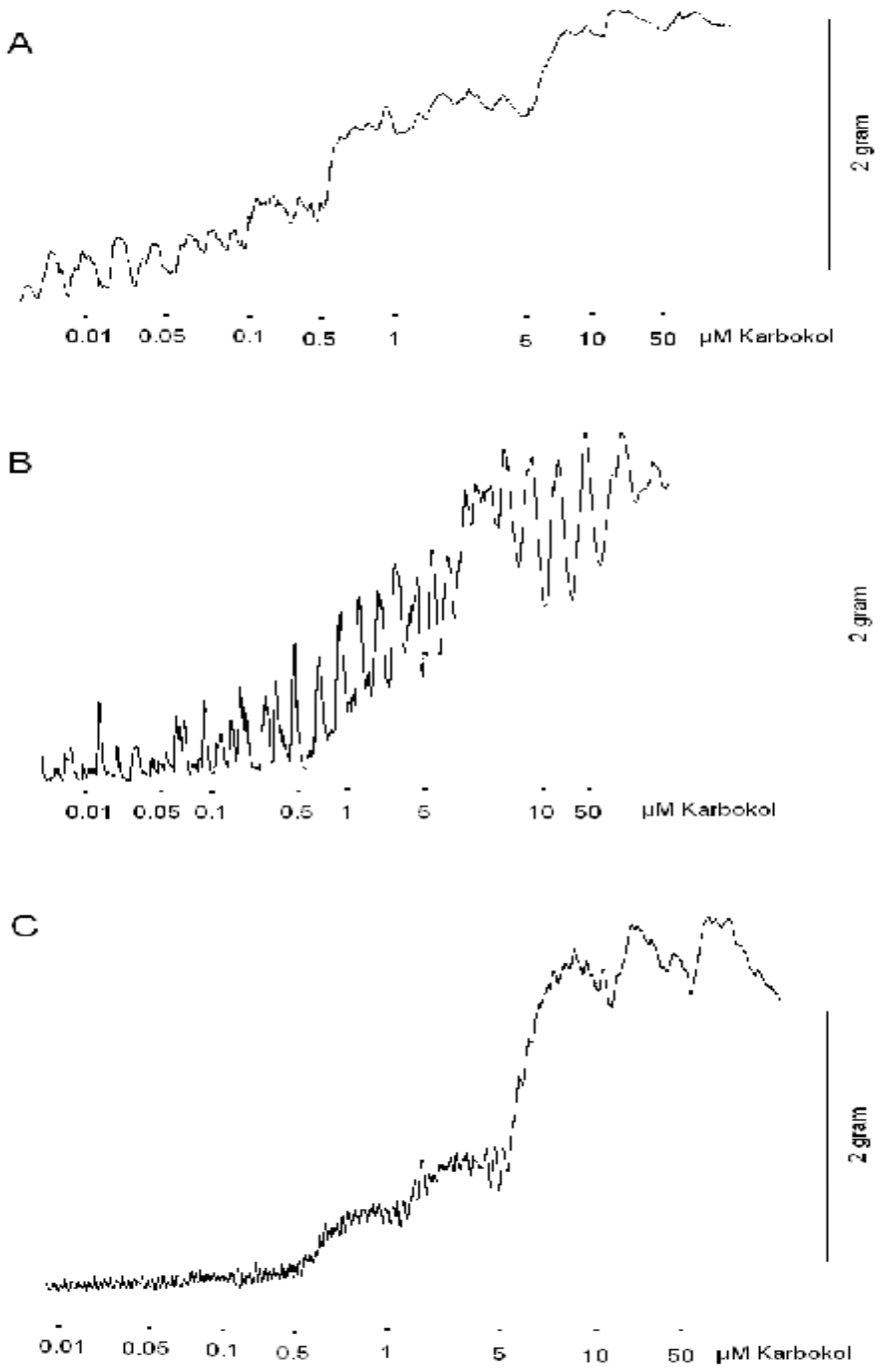
Şekil 16. Siklofosfamid grubu izole sıçan mesane striplerinde, karbokol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) kasılmalarını gösteren trase örnekleri.

Siklofosfamid + silimarin yapılmış sıçanların izole mesane striplerinde de karbokol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) uygulaması doza bağımlı kasılma cevapları oluşturdu. Ancak bu kasılma cevapları üzerine daha düşük amplitüdlü spontan kasılmaların eşlik ettiği gözlendi (Şekil 17). Tek başına silimarin uygulaması cevapları etkilemedi.

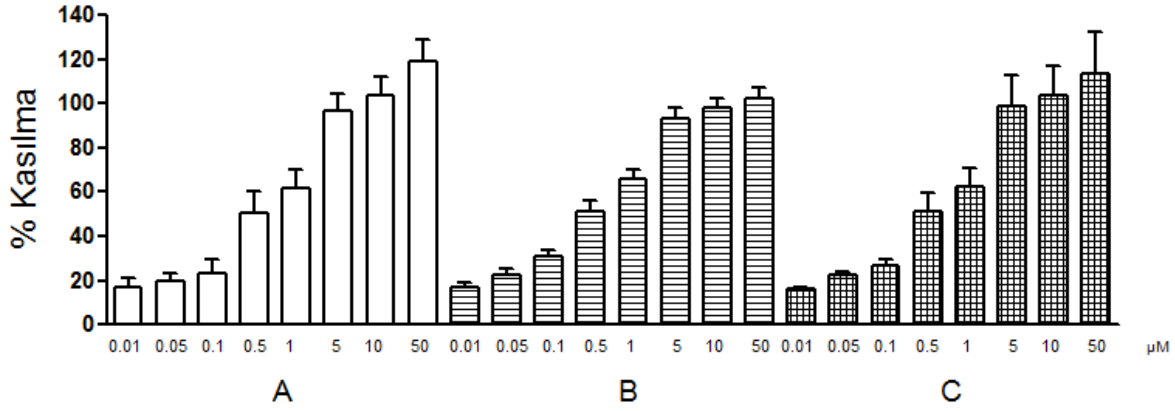


Şekil 17. Siklofosfamid + silimarin grubu izole sıçan mesane striplerinde, karbokol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) kasılmalarını gösteren trase örnekleri.

Siklofosfamid enjeksiyonu dokuların karbokol uyarılarına olan kasılma cevaplarının amplitüd değerlerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadı. Aynı şekilde siklofosfamid + silimarin grubunda da kontrole benzer kasılma değerleri elde edildi (Şekil 18 ve Şekil 19).



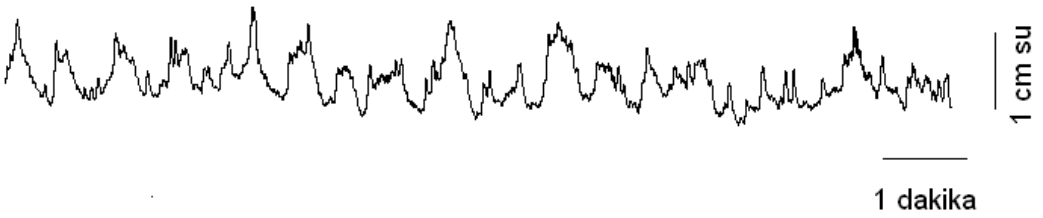
Şekil 18. Kontrol (A), siklofosfamid (B) ve siklofosfamid + silimarin (C) grubu izole sıçan mesane striplerinde, karbokol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) kasılmalarını gösteren trase örnekleri.



Şekil 19. Kontrol (A), siklofosfamid (B) ve siklofosfamid + silimarin (C) grubu izole sıçan mesane striplerinde, karbokol (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 50 µM) ile oluşturulan kasılma cevaplarının % amplitud değerleri.

4.2. İzole Sıçan Tüm Mesane Dokusunda Yapılan Deneyler

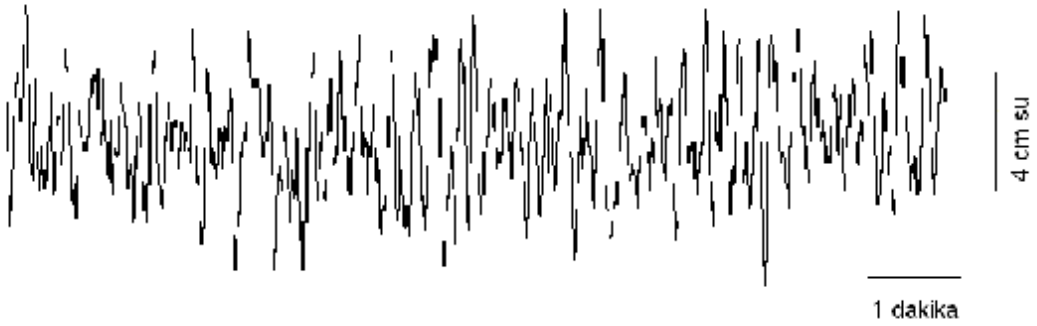
Kontrol grubu sıçanların mesanesinden izole edilen tüm mesane basıncı ölçümünde doku izole striplerindekine benzer spontan kasılma aktivitesi gösterdi (Şekil 20). Bu spontan kasılma aktivitesi 3 saat boyunca izlendi, Spontan kasılmaların ortalama amplitüd değeri % kasılma olarak 3.16 ± 0.28 bulundu. EAA ise 4.56 ± 0.44 cm.H_2O.dakika bulundu. Spontan kasılmaların frekansı ise dakika da 1.88 ± 0.27 olarak tespit edildi.



Şekil 20. Kontrol grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri.

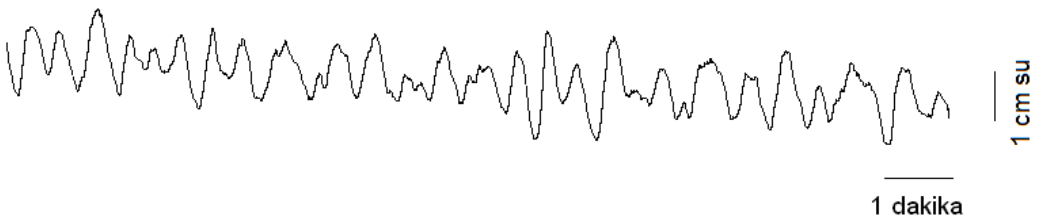
Siklofosfamid grubu sıçanların mesanesinden izole edilen tüm mesane dokusunun spontan kasılma aktivitesi kontrole göre belirgin artış gösterdi (Şekil 21). Spontan kasılmaların amplitüd ve frekansı kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. Bu spontan kasılma aktivitesi 3 saat boyunca izlendi, Spontan kasılmaların ortalama amplitüd değeri % kasılma olarak 17.6 ± 1.2 bulundu. EAA ise 34.03 ± 4.7

cm.su/dakika bulundu. Spontan kasılmaların frekansı ise dakika da 2.8 ± 0.26 olarak tespit edildi.



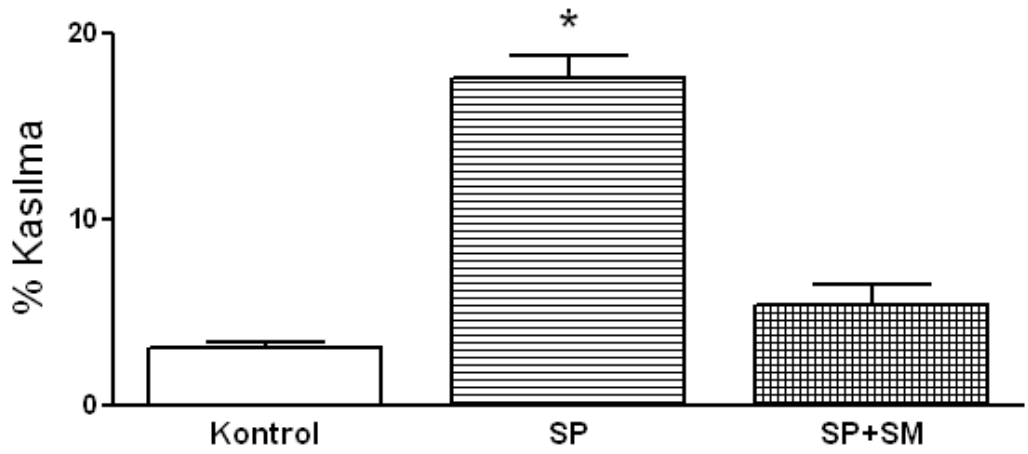
Şekil 21. Siklofosfamid grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri.

Siklofosfamid ve silimarin grubu sıçanların mesanesinden izole edilen tüm mesane dokusunun spontan kasılma aktivitesi kontrole benzer bir seyir izledi (Şekil 22). Spontan kasılmaların amplitüd ve frekansı siklofosfamid grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Bu spontan kasılma aktivitesi 3 saat boyunca izlendi, Spontan kasılmaların ortalama amplitüd değeri % kasılma olarak 5.43 ± 1.0 bulundu. EAA ise 20.0 ± 2.5 cm.H_2O.dakika bulundu. Spontan kasılmaların frekansı ise dakika da 1.97 ± 0.45 olarak tespit edildi. Tek başına silimarin uygulaması cevapları etkilemedi.

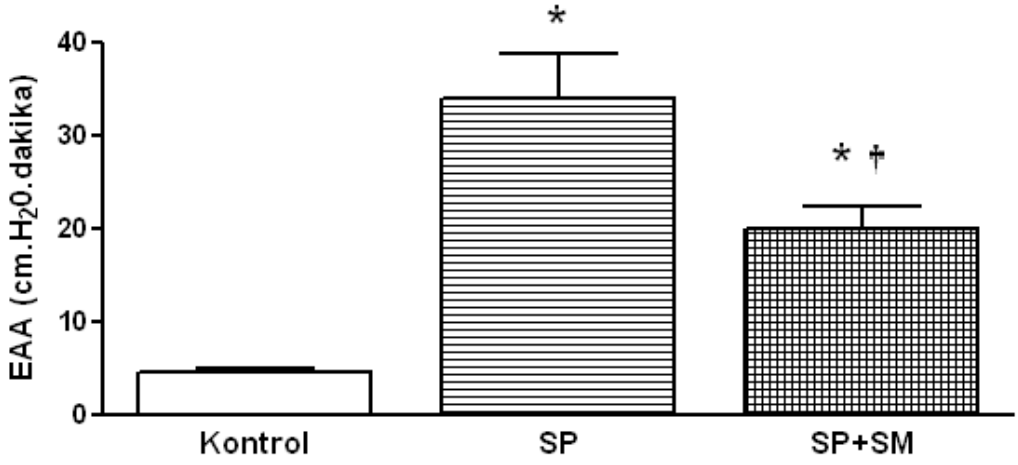


Şekil 22. Siklofosfamid + silimarin grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarını gösteren trase örnekleri.

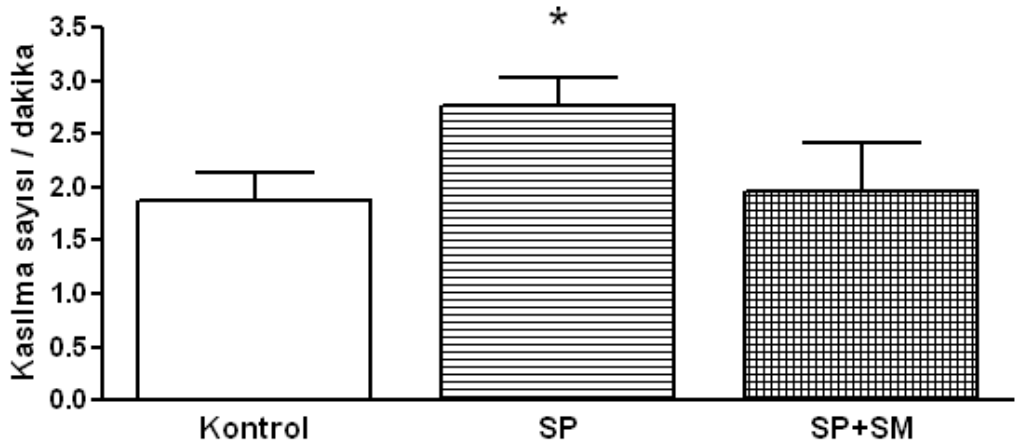
Kontrol, siklofosfamid ve siklofosfamid + silimarin grubu sıçanların izole tüm mesane dokularının spontan kasılma cevaplarının amplitüd, EAA ve frekans değerleri şekil 23, şekil 24 ve şekil 25 de grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 23. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarının % amplitud değerleri. * control cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, n= 8).



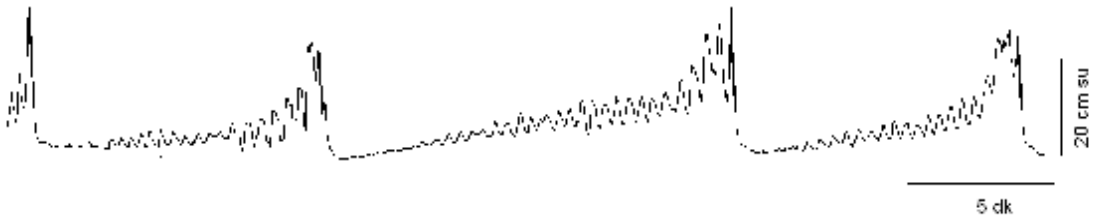
Şekil 24. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarının EAA değerleri. ***** Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, n= 8). † "SP" grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, n= 8).



Şekil 25. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu izole sıçan tüm mesane dokusunda, spontan kasılma cevaplarının frekans (kasılma sayısı/dakika) değerleri. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, $n= 8$).

4.3 İn vivo Sıçan Sistometrogram Ölçümleri

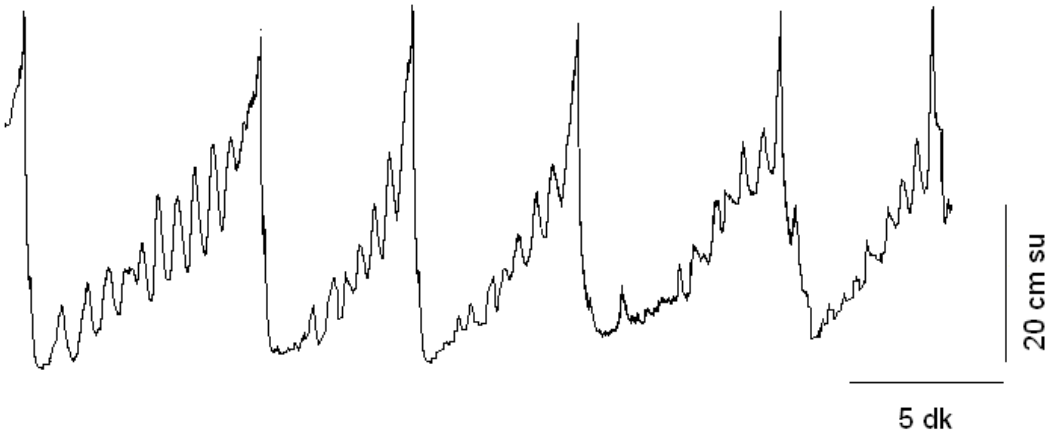
Üretan anestezisi altında yapılan sistometrogram ölçümlerinde kontrol grubu sıçanların mesane aktivitesi 3 saat boyunca izlendi (şekil 26). Sıçanların idrar yapma aralıkları ve idrar yaparken oluşan mesane basınçları tespit edildi. İdrar yapma sırasında oluşan mesane basınçları ortalaması 28.7 ± 1.2 cm.su bulundu. İdrar yapma aralıkları ortalama 9.9 ± 0.7 dakika olarak tespit edildi.



Şekil 26. Kontrol grubu sıçan sistometrogram cevaplarını gösteren trase örnekleri.

Siklofosfamid grubu sıçanların sistometrogram ölçümlerinde idrar yapma aralıklarının kontrol grubuna göre kısaldığı ve idrar yapma sıklığının arttığı görüldü. Ayrıca idrar yapma sırasında mesane basıncının kontrole göre daha da arttığı tespit

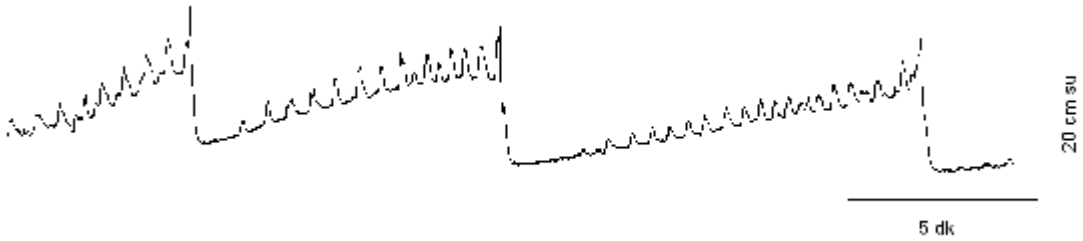
edildi (Şekil 27). İdrar yapma sırasında oluşan mesane basınçları ortalaması 41.63 ± 2.8 cm.su bulundu. İdrar yapma aralıkları ortalama 4.2 ± 0.5 dakika olarak tespit edildi.



Şekil 27. Siklofosfamid grubu sıçan sistometrogram cevaplarını gösteren trase örnekleri.

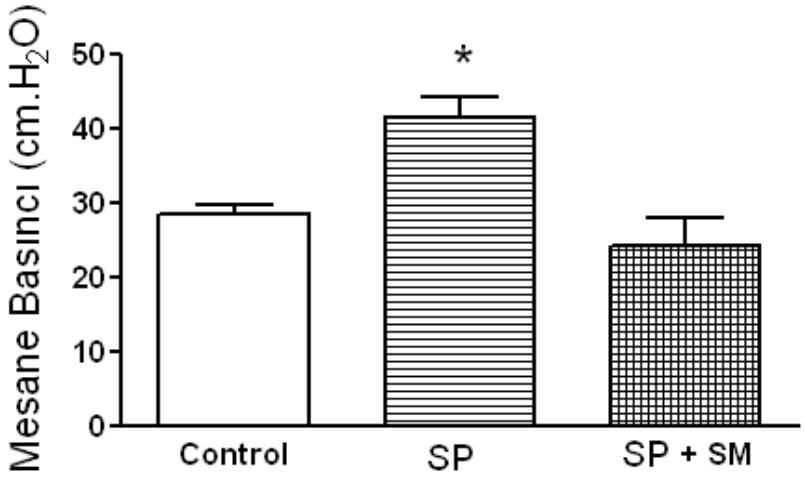
.

Siklofosfamid + silimarin grubu sıçanların sistometrogram ölçümlerinde idrar yapma aralıklarının tek başına siklofosfamid yapılan gruba göre uzadığı ve idrar yapma sıklığının kontrol grubuna benzer ölçüde azaldığı görüldü. Ayrıca idrar yapma sırasında mesane basıncının siklofosfamid grubuna göre azaldığı tespit edildi (Şekil 28). İdrar yapma sırasında oluşan mesane basınçları ortalaması 24.3 ± 3.8 cm.su bulundu. İdrar yapma aralıkları ortalama 8.0 ± 0.65 dakika olarak tespit edildi. Tek başına silimarin uygulaması cevapları etkilemedi.

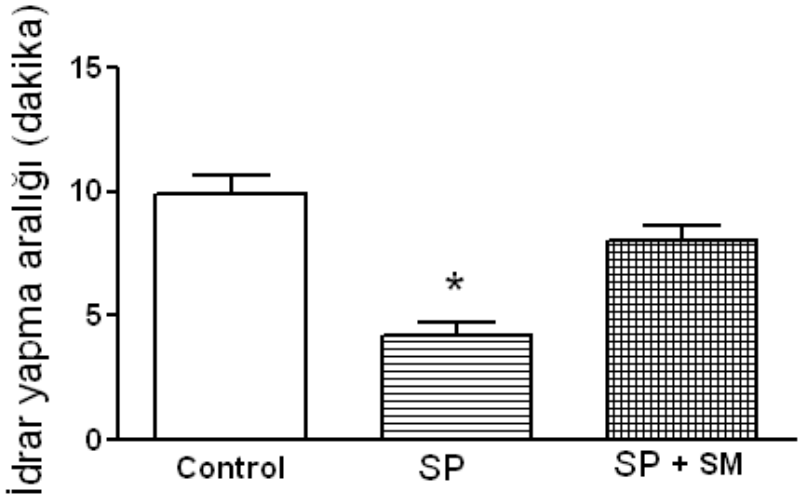


Şekil 28. Siklofosfamid + silimarin grubu sıçan sistometrogram cevaplarını gösteren trase örnekleri.

Kontrol, siklofosfamid ve siklofosfamid + silimarin grubu sıçanların sistometrogram ölçüm değerleri şekil 29 ve şekil 30 da grafik olarak gösterilmiştir.



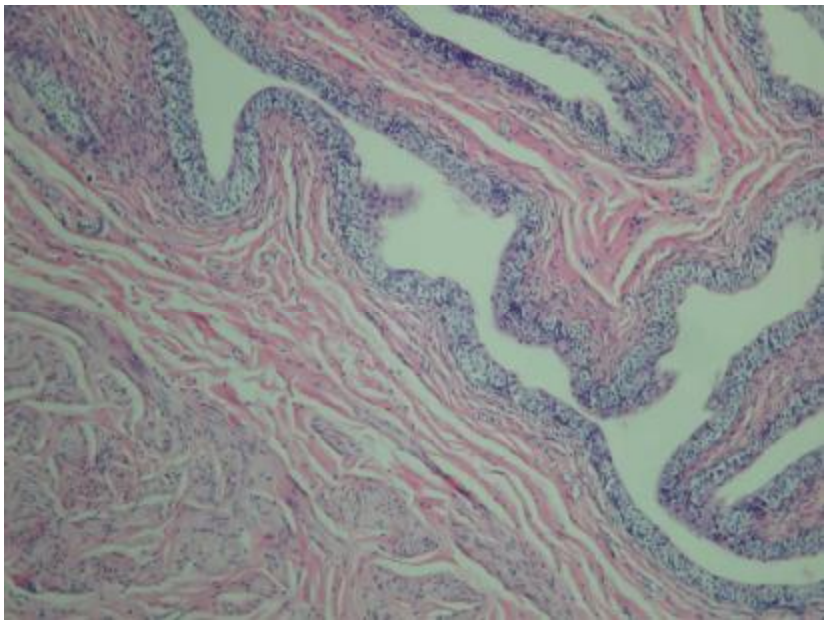
Şekil 29. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu sıçanların mesane basıncı değerleri. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, n= 8).



Şekil 30. Kontrol, siklofosfamid (SP) ve siklofosfamid + silimarin (SP+SM) grubu sıçanların idrar yapma aralıkları. * Kontrol cevaplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$, n= 8).

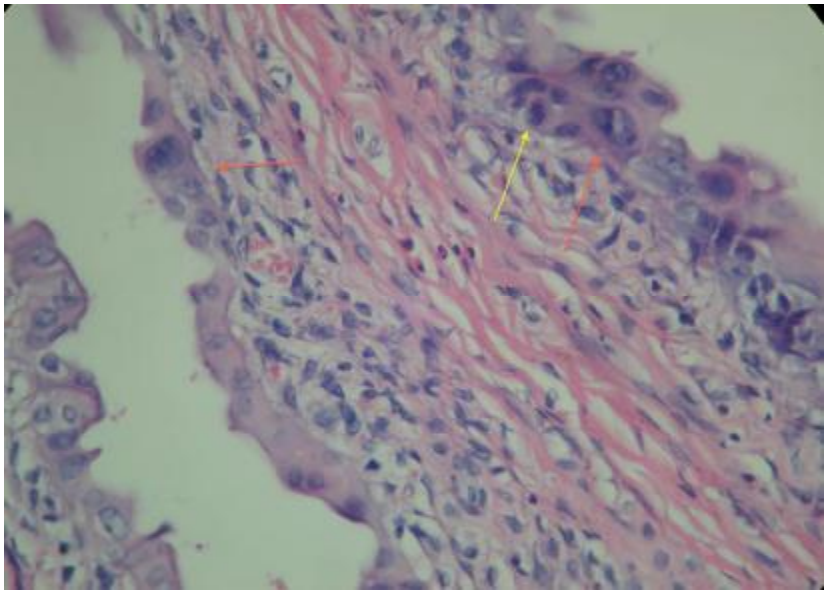
4.4. Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubundaki sıçan mesanesinden hazırlanan histolojik kesitlerde, normal ürotelyal epitel ile örtülü mukoza, submukoza ve kas tabakası izlendi (şekil 31).



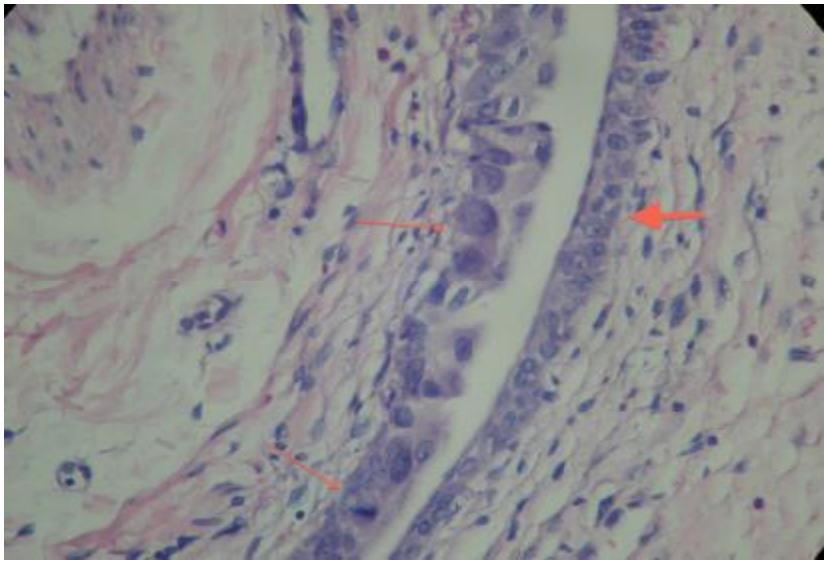
Şekil 31. Kontrol grubundaki sıçan mesanesinden hazırlanan histolojik kesitlerde normal ürotelyal epitel ile döşeli mesane mukozası, submukoza ve kas tabakası.izlendi (Hematoksilen Eozin (H&E), x100).

Siklofosfamid enjeksiyonu yapılan sıçanlardan 72 saat sonra alınan mesane dokusundan hazırlanan histolojik kesitlerde, mukozada epitelde tam kat stratifikasyon kaybı, nükleer atipi ile temsil edilen ağır displazi ve epitel tüm katlarında mitoz, belirgin pleomorfizm ile temsil edilen karsinoma in situ, submukozada hemoraji, ödem, kronik iltihabi hücre infiltrasyonu görüldü (şekil 32).



Şekil 32. Siklofosfamid enjeksiyonu yapılan sıçanlardan 72 saat sonra alınan mesane dokusundan hazırlanan histolojik kesitlerde epitel tüm katı boyunca nükleer atipi, pleomorfizm, stratifikasyon kaybı (kırmızı oklar) ve mitoz (sarı ok) içeren in situ karsinom görüldü (H&E, x400).

Siklofosfamid ve silimarin uygulanan sıçanlardan alınan mesane dokusundan hazırlanan histolojik kesitlerde epitelde geniş alanlarda hafif derecede displazi, fokal alanlarda orta/ağır displazi görüldü. Karsinoma in situ görülmedi. Submukozada hemorajide belirgin azalma saptandı. Ödem mevcuttu (şekil 33).



Şekil 33. Siklofosfamid ve silimarin uygulanan sıçanlardan alınan mesane dokusundan hazırlanan histolojik kesitlerde epitelde hafif displazi (kalın kırmızı ok) ve ağır displazi (ince kırmızı oklar) görüldü (H&E, x400).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, siklofosfamid enjeksiyonu sıçan mesane aktivitesini arttırdı. İn vitro deneylerde elde edilen bulgularda bazal spontan kasılmaların amplitüdü, EAA ve frekans değerleri anlamlı olarak arttı. Diğer yandan kolinerjik ve nörojenik uyarılar ile oluşturulan mesane kasılmaları kontrole göre anlamlılık göstermedi. İn vivo deneylerde yapılan sistometrogram ölçümlerinde ise idrar yapma sıklığı ve mesane basınçları anlamlı derecede arttı. Siklofosfamid uygulaması ile gelişen aşırı mesane hiperaktivitesi silimarin ile kısmen düzeltilebildi. Silimarin uygulaması idrar yapma sıklığı ile mesane basıncını anlamlı olarak azalttı. Ayrıca, bazal spontan kasılmaların amplitüdü ile frekansı da silimarin uygulaması ile anlamlı olarak azaldı.

Daha önce yayınlanmış makalelerde elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak bu çalışmada da siklofosfamid enjeksiyonu sıçanlarda hemorajik sistit ve buna eşlik eden overaktif mesane (hiperaktif mesane) patolojisi oluşturdu[8,67,61]. Siklofosfamid ile muamele edilmiş aneztezi altındaki sıçanlarda yapılan sistometrik ölçümlerde idrar yapma sıklığı ve idrar yapma sırasında oluşan mesane basınçları önemli derecede arttı. Ayrıca, siklofosfamid enjeksiyonu, izole tüm mesane dokusunda ve izole mesane striplerinde bazal spontan kasılmaları kontrole göre dramatik bir şekilde stimüle etti. Bazal spontan kasılmaların amplitüd, EAA ve frekansları kontrol grubuna göre anlamlı olarak artması bir mesane hiperaktivitesini teyit etmektedir. Bu sonuçlar diğer yayınlanmış çalışmalarla da uyumludur[8,67,61]. İn vitro deneylerde gözlemlenen bu artmış bazal spontan kasılmalar in vivo deneylerde ki "non-voiding" diye tanımlanan idrar yapma ile sonuçlanmayan kasılmaları temsil edebilir[68,60]. 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[69,70,4,5,71,72]. Ne yazık ki bu spontan kasılmaların gerçek mekazimları şu ana kadar tam olarak anlaşılamamıştır. Daha önce siklofosfamid enjeksiyonu yapılmış sıçanlarda yapmış olduğumuz bir çalışmada, tüm mesane preparatında bir adrenerjik nöron blokörü olan guanetidin'in, bir muskarinik reseptör blokörü olan atropin'in ve bir purinerjik reseptör antagonisti olan suramin'in bazal

spontan kasılmaları etkilememesi bu spontan kasılmalardan adrenerjik, kolinerjik ve purinerjik mekanizmların sorumlu olmayacağı ve siklofosfamid uygulaması ile stimüle edilen bu artmış spontan kasılmaların myojenik olabileceği ileri sürüldü[61].

Siklofosfamid enjeksiyonu yapılan sıçanlardan alınan mesanelerin histopatolojik incelemesinde mukoza epitelinde belirgin patolojik bozukluk, submukozal hemoraji, ödem ve kronik iltihabi hücre infiltrasyonunun görülmesi mesane hiperaktivitesinin nedenlerinden biri olabilir. Mesane aktivitesinden sorumlu afferent yolaklardan myelinsiz C lifleri, kimyasallar, vücuda zarar veren maddeler veya soğuk uyaranlara yanıt verirler[36]. Ayrıca bu lifler, mesanede, enflamatuar hücreler, üretelyal hücreler ve aferent sinirler tarafından salınan taşikinin, nitrik oksid, ATP, prostaglandinler, endotelinler ve nörotropik faktörleri içeren birçok diğer maddelerin yanısıra, nörotoksinlere, kapsaisin ve resiniferatoksinlere de duyarlıdırlar[37]. Bu nedenle C lifleri, normal idrar yapma döngüsünde görev yapmazlar. Çalışmamızda oluşturulan bu deneysel sistit modelinde bahsedilen bu myelinsiz C lifleri aktivasyonu mesane hiperaktivitesinden sorumlu olabilir.

Deve dikeni bitkisinin içeriğindeki aktif madde olan Silimarin vücudu hücre hasarına neden olan serbest radikallerden koruyan kuvvetli bir antioksidandır[11]. Gerek insan gerekse deneysel hayvan modellerinde bu maddenin antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri gösterilmeye başlanmıştır[12,13,14]. Silimarin klinikte en çok hepatoprotektif ajan olarak kullanılmaktadır[64]. Köpeklerde gentamisin ile oluşturulan nefrotoksisite silimarin ile düzeltilmiştir[65]. Ayrıca akut inflamasyon modellerinde silimarinin inlamasyonu azalttığı, ödemi çözdüğü ve nötrofil migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir[66]. Yeni bir çalışmada silimarin'in derinin ultraviyole ışınına karşı korunmasında belirgin antiinflamatuvar ve antioksidant etkinliği gösterilmiştir[73]. Ayrıca bir çalışmada periton diyalizi yapılan hastalarda silimarin'in nötrofil göçünü ve lökotrien sentezini imhibe ederek immün sistemi modüle ettiği ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir[74]. Son yıllarda yayınlan bir çalışmada da silimarin'in güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri ile diabetin komplikasyonlarını önleyebileceği gösterilmiştir[75].

Silimarin bir çok çalışmada akut ve kronik hastalık modellerinde antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri nedeni ile kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda siklofosfamid enjeksiyonu 72 saatlik kısa bir süre içinde hemorojik sistit patolojisini oluşturduğundan

silimarin'i sıçanlara 7 gün süre ile vermeyi uygun bulduk. Silimarin'in, siklofosfamid enjeksiyonundan 4 gün önce verilmeye başlanması ve siklofosfamid verildiği günden itibaren de 3 gün daha verilmesi silimarin'in hem koruyucu hem de önleyici etkilerinin bir arada görüldüğü gösterildi. Böylece daha güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan etkinin tespit edilmesi mümkün olabilirdi. Nitekim silimarin verilen siklofosfamidli gruplardan çıkarılan mesane örneklerinin histopatolojisi bunu kısmen de olsa doğrulamaktadır. Mukoza epitelinde displazinin hafiflemesi, karsinoma in situ görülmemesi, submukozada hemorajide belirgin azalma saptanması silimarin'in bu güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan etkilerine bağlı olabilir.

Çalışmamızda silimarin'in bu koruyucu ve onarıcı etkileri mesane üzerinde yapılan in vivo ve in vitro deneylerin sonuçları ile de desteklenmektedir. Anestezi altında yapılan in vivo sistometrogram ölçümlerinde silimarin uygulamasının idrar yapma aralıklarını tek başına siklofosfamid yapılan gruba göre daha uzattığı ve kontrole yakın seviyelere yaklaştırdığı görülmüştür. Aynı şekilde idrar yapma sırasında oluşan mesane basınçları da kontrole yakın bir seviyeye dönmüştür. Ancak "threshold eşiği" dediğimiz idrar yapmadan önceki mesane basınç değerlerinin kontrole göre hala yüksek seyrettiği görülmüştür. Sistometrogram ölçüm sırasında diğer önceki çalışmamıza "non-voiding" denilen spontan kasılmalar çok fazla görülmemesine rağmen şimdiki çalışmada bunun daha sık oluşması anesteziye bağlı olabilir[76]. Silimarin'in doku üzerindeki patolojiyi kısmen düzeltmesi afferent duyusal yolakların aşırı aktivasyonunu önlemiş olabilir ve bu nednele idrar yapma aralıkları uzamış olabilir. Diğer yandan in vitro deneylerde hem izole tüm mesane preparatında hem de izole mesane striplerinde spontan kasılmaların amplitüdünün, EAA'nın ve frekansının silimarin ile kontrole yakın seviyelere düşürülmesi yukarıdaki sitometrogram sonuçlarını desteklemektedir. İlginç olan ESS ile oluşturulan nörojenik kasılmalar ile karbokol ile oluşturulan kolinerjik kasılmaların her 3 grupta da farklılık göstermemesidir. Aslında bu sonuçlar siklofosfamid enjeksiyonu ile oluşturulan sistit modelinde mesane hiperaktivitesinin myelinsiz C liflerinden salınan afferent nöropeptidlere bağlı olabileceğini göstermektedir. Neurojenik uyarıların direkt efferent sinir uçlarını uyardığı ve karbokolünde kendine ait muskarinik reseptörler aracılığı ile direkt düz kası kontrakte ettiği düşünüldüğünde bu sinirsel ve kolinerjik uyarıların her 3 grupta neden farklılık göstermediği anlaşılabilir. Silimarin muhtemelen afferent C liflerinin aşırı uyarılmasını

doku üzerinde oluşan sistit patolojisini güçlü antiinflamatuvar ve antioksidant etkileri ile düzelterek engellemiş olabilir. İleriki çalışmalarda doku üzerinde antioksidan etkinliğininin her 3 grupta da gösterilmesi bu tezin sonuçlarının daha iyi yorumlanmasını sağlayabilirdi.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasındaki bulgular siklofosfamid uygulamasının diğer yayınlanmış çalışmalara uygun olarak belirgin hemrojik sistit patolojisi oluşturduğunu ve silimarin'in bu sistit patolojini kısmen düzeltilebileceğini göstermektedir. Silimarin'in düzeltici etkisini gösterme açısından farmakolojik deneysel bulgular histopatolojik bulgulara göre daha belirgin bulunmuştur. Bunun nedeni afferent duyusal yolak aktivitesinin doku patolojinin iyileşme sürecine göre daha çabuk etkilenmesi olabilir. Silimarin'in bu etkisi onun güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan etkilerine bağlı olabilir. Silimarin'in 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.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda, siklofosfamid enjeksiyonu sıçan mesane aktivitesini arttırdı.

2. Siklofosfamid enjeksiyonu, in vitro deneylerde bazal spontan kasılmaların amplitüdünü, EAA'ı ve frekans değerlerini anlamlı olarak arttırdı. Kolinerjik ve nörojenik uyarılar ile oluşturulan mesane kasılmaları her 3 grupta da birbirine göre anlamlılık göstermedi. Siklofosfamid enjeksiyoınu yapılan gruplarda, in vivo sistometrogram ölçümlerinde de idrar yapma sıklığı ve mesane basınçları anlamlı derecede arttı.

3. Siklofosfamid uygulaması ile gelişen aşırı mesane hiperaktivitesi silimarin ile kısmen düzeltilebildi. Silimarin uygulaması sistometrogram ölümlerinde idrar yapma sıklığı ile mesane basıncını anlamlı olarak azalttı. Ayrıca, bazal spontan kasılmaların amplitüdü ile frekansı da silimarin uygulaması ile anlamlı olarak azaltıldı.

4. Silimarin'in siklofosfamid ile oluşturlan mesane hiperkativitesini kısmen düzeltmesi onun güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan etkinliğine bağlı olabilir. Silimarin'in 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.

KAYNAKLAR

1. **Sibley G.** A comparison of spontaneous and nerve-mediated activity in bladder muscle from man, pig and rabbit. *J Physiol,* **1984;** 354: 431-443.

2. **Robertson AS.** Behaviour of the human bladder during natural filling: The Newcastle of ambulator monitoring and conventional artificial filling cystometry. *Scand J Urol Nephrol Suppl,* **1999;** 201: 19-24.

3. **Sherrington CS.** Notes on the arrangement of some motor fibers in the lumbo-sacral plexus. *J Physiol,* **1992;** 13: 621-772.

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

5. **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 Phys*iol, **2003;** 88: 343-357.

6. **Stillwell, T.J., Benson, R.C**., Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. A review of 100 patients. Cancer, **1988;** 61, 451–457.

7. **Ahluwalia, A., Maggi, C.A., Santicioli, P., Lecci, A., Giuliani, S**.,. Characterization of the capsaicin-sensitive component of cyclophosphamide-induced inflammation in the rat urinary bladder. Br. J. Pharmacol, **1994;** 111, 1017–1022.

8. **Ozawa, H., Chancellor, M.B., Jung, S.Y., Yokoyama, T., Fraser, M.O., Yu, Y., de Groat,W.C., Yoshimura, N**.,. Effect of intravesical nitric oxide therapy on cyclophosphamide-induced cystitis. J. Urol., **1999;** 162, 2211–2216.

9. **Yoshimura, N., Chancellor, M.B**.,. Current and future pharmacological treatment for overactive bladder. J. Urol., **2002;** 168, 1897–1913.

10. **Abd-Allah AR, Gado AM, Al-Majed AA, Al-Yahya AA, Al-Shabanah OA**.Protective effect of taurine against cyclophosphamide- induced urinary bladder toxicity in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia.arabdallah@hotmail.com, **2005 Mar**;32(3):167-72

11. **Wu CH, Huang SM, Yen GC** Antioxid Redox Signal..Silymarin: a novel antioxidant with antiglycation and anti-inflammatory properties in vitro and in vivo. National Chung Hsing University, Department of Food Science and Biotechnology, Taichung, Taiwan; wch@mail.nchu.edu.tw. **2010 Jun 25.**

12. **Javed S, Kohli K, Ali M.** Recent Pat Drug Deliv Formul. Patented bioavailability enhancement techniques of silymarin. Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Jamia Hamdard, New Delhi-110062, India. shamamajaved@gmail.com,**2010 Jun 1;** 4(2):145-52.

13. **Najafzadeh H, Jalali MR, Morovvati H, Taravati F**. J Med Toxicol. Comparison of the prophylactic effect of silymarin and deferoxamine on iron overload-induced hepatotoxicity in rat.Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran. najafzadeh@scu.ac.ir, **2010 Mar;6 ;** (1):22-6.

14. **Chtourou Y, Fetoui H, Sefi M, Trabelsi K, Barkallah M, Boudawara T, Kallel H, Zeghal N.** Biometals.. Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats. Animal Physiology Laboratory, Life Sciences Department, UR/08-73, Sfax Faculty of Sciences, BP1171, 3000, Sfax, Tunisia, **2010 May 26.**

15. **Tyagi A, Raina K, Singh RP, Gu M, Agarwal C, Harrison G, Glode LM, Agarwal R**. Mol Cancer Ther. Chemopreventive effects of silymarin and silibinin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Colorado Health Sciences Center, Box C238, Denver, CO 80262, USA. **2007 Dec;6**(12 Pt 1):3248-55.

16. **Sivrioğlu K**. Mesane Anatomisi ve İşeme Fizyolojisi. Turk Fiz Tıp Rehab Derg, **2005; 51**(Özel EkA): A16-A18.

17. **Guyton AC**. Tıbbi Fizyoloji. 3. Baskı, 1. cilt, İstanbul, **1989**.

18. **Ganong WF**. Tıbbi Fizyoloji. 2. cilt 17. baskı, İstanbul, **1996**.

19. **De Groat CW and Yoshimura N**. Pharmacology of the lower urinary tract. Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.,**2001**; 41: 691-721.

20. **De Groat WC.** Integrative control of the lower uriray tract: preclinical perspective. Br.J. Pharmacol, **2006**; 147: S25- S40.

21. **Pandita RK**. Modultion of the micturation reflex at spinal and peripheral levels in conscious rats. Lund, **1999**.

22. **Morrison JBF**. Sensation arising from the lower urinary tract. In. M. Torrens and J.F:B Morrison (Eds), the physiologyof the lower urinary tract., Berlin- Heidelberg: Springer Verlag, **1987**; 89-131.

23. **Morgan CW, De Groat WC, Felkins LA and Zhang SJ**. İntracelluler injection of neurobiotin or horseradish peroxidase reveals separate types of preganglionic neurons in the sacral parasymphathetic nucleus of the cat. J. Comp. Neurol.,**1993**; 331:161-182.

24. **De Groat WC, Booth AM**. Synaptic transmission in pelvic ganglia. In: The Autonomic Nervous System, Vol. 3 Nervous Control of the Urogenital System, ed. Maggi CA, 227- 347. London, Harwood Academic Publisher**, 1993**.

25. **Andersson KE**. Pharmacology of lower urinary tract smooth muscle and penile erection tissues. Pharmacol. Rev., **1993**; 45: 253-308.

26. **Andersson KE and Arner A**. Urinary Bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. Physiol. Rev.,**2004** ; 84: 935-986.

27. **Hedge SS and Eglen RM**. Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. Life Sci., **1999** ; 64: 419-428.

28. **Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T and Taketo MM**. Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but stil viable. J.Neurosci., **2002** ; 22: 10627-10632.

29. **An JY, Yun HS, Lee YP, Yang SJ, Shim JO, Jeong JH, Shin CY, Kim JH, Kim DS and Sohn UD**. The intracellular pathways of the acetylcholine-induced contraction in cat detrusor muscle cells. Br. J. Pharmacol., **2002**; 137: 1001-1010.

30. **Delancey J, Gosling J, Creed K, Dixon J, Delmas V, Landon D, Norton P**. Gross Anatomy and Cell Biology of the Lower Urinary Tract. 17-82.

31. **Hudec M, Jakubesová M, Urdzık J, Mokrý J, Švıhra J**. The influence of aminophylline on the contractility of urinary bladder smooth muscle in rabbits. Acta Med. Mart**, 2003**; 3: 9-15.

32. **Hoyle CHV, and Burnstock G**. Postganglionic efferent transmission in the bladder and uretra. In: The Autonomic Nervous System. Vol . 6, chapter10 nervous control of the urogenital systemi edited by Maggi CA, Harwood Academic Publisher, london, UK, **1993**.

33. **De Groat WC, Fraser MO, Yoshiyama M, Smerin S, Tai C, Chancellor MB, Yoshimura N and Roppolo JR**. Neurol control of urethra. Scand. J. Urol.Nephrol., **2001**; 35(supply 201): 35-43.

34. **Mallory B, Steers WD and De Groat WC**. Electrophysiological study of micturation reflexes in the rats. Am.J. Physiol., **1989;** 257: R410,R421.

35. **De Groat WC, Booth AM and Yoshimura N**. Neurophysiology of micturition and its modification in animal models of human disease. In Nervous Control of the Urogenital System ed. Magg, C.A. pp 227-290 London: Harwood Academic Publisher, **1993**.

36. **Fall M, Lindstrom S, Maziers L**. A bladder to bladder cooling reflex in the cat. J. Physiol., **1990**; 427: 281-300.

37. **Chuang Y, Fraser MO, Yu Y, Chancellor MB, De Groat WC**. The role of bladder afferent pathways in the bladder hyperactivity induced by intravesical administration of nevre growth factor. J. Urol. , **2001**; 165: 975-979.

38. **Andersson KE**. Bladder activation: afferent mechanisms. Urology, **2002**; 59: 43-50.

39. **Sillen U**. Bladder function in healthy neonates and its development during infacy. J.Urol., **2001**; 166: 2376-2381.

40. **Kanitkar M, Joshi DP, Chander V, Puri B**. Functional Voiding disorders in children. MJAFI Review article **, 2004**; 60: 367-371.

41. **Yoshimura N, Chancellor MB**. Current and future pharmacological treatment for overactive bladder. J.Urol**., 2002;** 168: 1897-1913.

42. **Yoshimura N, Chancellor MB**. Neurophysiology of lower urinary tract function and dysfunction. Reviews in Urology**, 2003**; 5(8): S3-S10.

43. **Yamaguchi O**. β_3- adrenoceptors in human detrusor muscle. Urology, **2002**; 59 (5): 25-29.

44. **Ford APDW, Gever JR, Nunn PA, Zhong Y, Joseph SC, Dillon MP, Cockayne DA**. Purinoceptors as therapeutic targets for lower urinary tract dysfunction. Br.J. Pharmacol**, 2006**; 147: S132- S143.

45. **Burnstock G**. Purinergic signalling in lower urinary tract. Handbook of Experimental Pharmacology, Purinergic and Pyrimidergic Signallingı1- Moleculer, Nervous and Urigenitory System Function, ed Abbracchio MP and Williams M, **2001**; 151: 423-515.

46. **Abbracchio MP, Burnstock G**. Purinergic signalling: Pathophysiological roles. Jpn J Pharmacol, **1998** ; 78: 113-145.

47. **Andersson KE**. Emptying against outflow obstruction pharmacological aspects. Scand J Urol Suppl, **1997**; 184: 77-84.

48. **Sun Y and Chai TC**. Effects of dimethyl sulphoxide and heparin on stretch-activated ATP release by bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. BJU Int., **2002**; 90: 381-385.

49. **Vlaskovska M, Kasakoc L, Rong W, Bodin P, Cockayne DA**, Ford APDW and Burnstock G. P_{2x3} knockout mice reveal a major sensory role for urothelially released ATP. J Neurosci., **2001**; 21: 5670-5677.

50. **Yu Y and De Groat WC**. Sensitization of pelvic afferent nerves in the in vitro urinary bladder-pelvicnerve preparation of the rat by purinergic agonists or by cyclophosphamide (CYP)pre-treatment. Abstract Viewer / Itınerary Planner; Program no: 541.3, Society for Neuroscience, Washington DC, ,**2004**.

51. **Burnstock G**. Pathophysiology and Therapeutic Potential of purinergic signaling. Pharmacol Rev, **2006**; 58: 58-86.

52. **Fergusan DR and Christopher N**. Urinary bladder function and drug development. Trends Pharmacol. **1996**; 17: 161-165.

53. **Yoshida M, Homma Y, Inadome A, Yono M, Seshita H, Miyamoto Y, Murakami S, Kawabe K and Ueda S**. Aged – related changes in cholinergic and purinergic neurotrasmission in human isolated bladder smooth muscles. Exp Gerontol, **2001**; 36: 99-109.

54. **Berridge MJ, Bootman MD and roderick HL**. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol,**2003**; 4: 517-529.

55. **İmaizumi Y, Torii Y, Ohi Y, Nagano N, Atsuki K, Yamamuri H, Muraki K, Watanabe M and Bolton TB**. Ca^{2+} images and K^{+} curent during depolarization in smooth muscle cells of the guinea- pig vas deferens and urinary bladder. J Physiol,**1998**; 510: 705-719.

56. **Batra S, Sjogren C, Andersson KE and Fovaeus M**. Source of calcium for contractions induced by depolarization and muscarinic receptors stimulation in rabbit urinary bladder. Acta Physiol Scand, **1987**; 130: 545-551.

57. **Uchida W, Masuda N, Shirai Y, Shibasaki K, Satoh N and Takenada T**.
The role of extracelluler Ca^{2+} in carbacol induced tonic contraction of te pig detrusor smooth muscle. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol, **1994**; 350: 398-402.

58. **Wickenden A**. K^{+} channels as therapeutic drug targets. Pharmacol Ther., **2002**; 94: 157-182.

59. **Fry CH, Hussain M, McCarty C, Ikeda Y, Sui GP and Wu C**. Recent advences in detrusor muscle function. Scand J Urol Nephrol Suppl, **2004**; 215: 20-25.

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

61. **Hacer Sinem Büyüknacar, Eda Karabal Kumcu, Cemil Göçmen , Serpil Önder** Effect of phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram on cyclophosphamide-induced cystitis in rats. Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Çukurova, Adana, 01330 Turkey. Received 23 August 2007; received in revised form 19 December 2007; accepted 12 February 2008. Available online **16 February 2008.**

62. **Turhan Baytop**, Türkiye'de Bitkiler ile tedavi.İstanbul Üniversitesi yayınları No: 3255 Eczacılık Fakültesi No: 40. **1984.**

63. **Sengupta P**, **Bagchi C**, **Sharma A**, **Majumdar G**, **Dutta C**, **Tripathi S**. Indian J Pharmacol. Olanzapine-induced hepatopathy in albino rats: A newer model for screening putative Hepatoprotective agents, namely silymarin. Department of Pharmacology, Burdwan Medical College & Hospital, Burdwan, West Bengal, India. **2010 Dec**;42(6):376-9.

64. **Lahon K, Das S.** Pharmacognosy Res. Hepatoprotective activity of Ocimum sanctum alcoholic leaf extract against paracetamol-induced liver damage in Albino rats. Department of Pharmacology, Mahatma Gandhi Medical College and Research Institute, Pondicherry, India. **2011 Jan**;3(1):13-8.

65. **Varzi HN, Esmailzadeh S, Morovvati H, Avizeh R, Shahriari A, Givi ME** J Vet Pharmacol Ther.; Effect of silymarin and vitamin E on gentamicin-induced nephrotoxicity in dogs. Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran. najafzadeh@scu.ac.ir. **2007 Oct;** 30(5):477-81.

66. **De La Puerta R, Martinez E, Bravo L, Ahumada MC.** J Pharm Pharmacol.. Effect of silymarin on different acute inflammation models and on leukocyte migration. Departamento de Farmacia y Tecnologia Farmaceutica, Facultad de Farmacia, Sevilla, Spain. **1996 Sep**;48(9):968-70.

67**. Jang, J., Park, E.Y., Seo, S.I., Hwang, T.K., Kim, J.C.,.** Effects of intravesical instillation of cyclooxygenase-2 inhibitor on the expression of inducible nitric oxide synthase and nerve growth factor in cyclophosphamide- induced overactive bladder. BJU Int. **2006;** 98, 435–439.

68. **Mills, I.W., Greenland, J.E., McMurray, G., McCoy, R., Ho, K.M., Noble, J.G., Brading, A.F**.,. 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.

69. **Levin, R.M., Ruggieri, M.R., Velagapudi, S., Gordon, D., Altman, B.,Wein, A.**J., Relevance of spontaneous activity to urinary bladder function: an in vitro and in vivo study. J. Urol. **1986** 136, 517–521.

70. **Sugaya, K., de Groat,W.C.,**. Inhibitory control of the urinary bladder in the neonatal rat in vitro spinal cord-bladder preparation. Brain Res. Dev. Brain Res. **2002;** 138, 87–95.

71. **Szell, E.A., Somogyi, G.T., de Groat, W.C., Szigeti, G.P.,**. Developmental changes in Spontaneous smooth muscle activity in the neonatal rat urinary bladder. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **2003;** 285, R809–R816.

72**. Ng, Y.K., de Groat,W.C.,Wu, H.Y.,.** Muscarinic regulation of neonatal rat bladder spontaneous contractions. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **2006** 291, R1049–R1059.

73**. Nichols JA, Katiyar SK**., Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. Arch Dermatol Res.;302(2):71-83. Epub 2009 Nov 7. Department of Dermatology, University of Alabama at Birmingham, 1670 University Boulevard, Volker Hall 557,PO Box 202, Birmingham, AL 35294, USA. **2010 Mar.**

74. **Nazemian F**, **Karimi G**, **Moatamedi M**, **Charkazi S**, **Shamsara J**, **Mohammadpour AH**. Effect of silymarin administration on TNF-α serum concentration in peritoneal dialysis patients. .Nephrology Ward, Department of Internal Medicine, Imam Reza Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Phytother Res. **2010 Nov**;24(11):1654-7. doi: 10.1002/ptr.3175

75. **Wu CH, Huang SM, Yen GC**. Silymarin: a novel antioxidant with antiglycation and antiinflammatory properties in vitro and in vivo. Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. Antioxid Redox Signal. **2011 Feb 1**;14(3):353-66. Epub 2010 Sep 29.

76. **Streng, T., Hedlund, P., Talo, A., Andersson, K.E., Gillespie, J.I**.,. Phasic non-micturition contractions in the bladder of the anaesthetized and awake rat. BJU Int. **2006;** 97, 1094–1101.

ÖZGEÇMİŞ

Nadire Eser 09.07.1985 yılında Ceyhan/Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ceyhan'da tamamladı. 2009 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalında 'Yüksek Lisans' eğitimine başladı. 2011 yılında A.B.D Pittsburgh Üniversitesi Farmakoloji Bölümünde Moleküler Farmakoloji alanında araştırmacı olarak çalıştı.