

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYABETİK SIÇANLARDA MESANE
FONKSİYONLARINDA KÜÇÜK
GTPAZ'LARIN ROLÜ**

DR. ATİYE SİNEM EVCİM

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI:

DOÇ. DR. MUKADDES GÜMÜŞTEKİN GÜNELİ

İZMİR-2012

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYABETİK SIÇANLARDA MESANE
FONKSİYONLARINDA KÜÇÜK
GTPAZ'LARIN ROLÜ**

DR. ATİYE SİNEM EVCİM

UZMANLIK TEZİ
TEZ DANIŞMANI:
DOÇ. DR. MUKADDES GÜMÜŞTEKİN GÜNELİ

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
RESİM LİSTESİ	xii
KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖNSÖZ	xv
1. TÜRKÇE ÖZET	1
2. İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	4
3. GİRİŞ VE AMAÇ	7
4. GENEL BİLGİLER.....	11
4.1. Mesane	11
4.1.a. Mesane Anatomisi.....	11
4.1.b. Mesane Histolojisi.....	11
4.1.c. İşeme Fizyolojisi	12
4.1.d. Detrusor Düz Kas Kasılması	15
4.1.e. Ürotelyumun Yapısı ve Ürotelyumun Düz Kas Kasılmasındaki Rolü	18
4.2. Diyabetes Mellitus	20
4.2.1. Epidemiyoloji	20
4.2.2. Komplikasyonları.....	20
4.3. Hayvan Modelleri	21
4.3.1. Tip I Diyabetes Mellitus Hayvan Modelleri.....	21
4.3.2. Tip II Diyabetes Mellitus Hayvan Modelleri	21
4.3.3. Mesane Disfonksiyonu Modeli.....	22
4.4. Diyabetes Mellitus'ta Mesane Disfonksiyonu.....	22
4.4.1. Patogenez.....	23
4.4.1.a. Detrusor Düz Kas Disfonksiyonu	24
4.4.1.b. Detrusor Kasta Oksidatif Stres	26
4.4.1.c. Nöronal Disfonksiyon.....	29
4.4.1.d. Ürotelyal Disfonksiyon	30
4.5. Mesane Disfonksiyonunda Tedavi.....	30
4.6. Küçük GTPaz Ailesi	33
4.7. Rho Ailesi.....	34

4.7.1. Rho/Rho Kinaz Yolağı	35
4.7.2. Rac1.....	37
4.7.2.a. Rac1 Aracılığıyla Gerçekleşen Hücresel Olaylar	38
4.7.2.b. Hücresel Olaylarda RhoA/Rac1 Arasındaki Denge	40
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	42
5.1. ORGAN BANYOSU	42
5.2. KONSANTRASYON-YANIT EĞRİLERİ	44
5.3. ARAŞTIRMA YÖNTEMİ	45
6. BULGULAR	49
6.1. Hayvanların Vücut ve Mesane Ağırlıkları, Kan Şekeri Değerleri.....	49
6.2. Mesane Detrusor Kas Kasılmasındaki Değişikliklerin İncelenmesi.....	49
6.2.1. KCl İle Elde Edilen Kontraktil Yanıtlar.....	49
6.2.2. Kümülatif Karbakol İle Elde Edilen Kontraktil Yanıtlar	50
6.2.3. İndometazin Varlığında CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler.....	52
6.2.4. Kontrol Grubunda Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler	54
6.2.5. Kontrol Grubunda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD ₂ Değerlerinin Karşılaştırılması	60
6.2.6. Diyabet Grubunda Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler	62
6.2.7. Diyabet Grubunda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD ₂ Değerlerinin Karşılaştırılması	69
6.2.8. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler.....	71
6.2.9. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD ₂ Değerlerinin Karşılaştırılması	78
6.2.10. Tüm Gruplarda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD ₂ Değerlerinin Karşılaştırılması	80
6.2.11. Kontrol Grubunda İndometazin İle Birlikte Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler.....	86
6.2.12. Kontrol Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD ₂ Değerlerinin Karşılaştırılması	94
6.2.13. Diyabet Grubunda İndometazin İle Birlikte Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler.....	96

6.2.14. Diyabet Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD ₂ Değerlerinin Karşılaştırılması.....	103
6.2.15. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda İndometazin İle Birlikte Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler.....	105
6.2.16. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD ₂ Değerlerinin Karşılaştırılması	111
6.2.17. Tüm Gruplarda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD ₂ Değerlerinin Karşılaştırılması.....	113
6.2.18. Tüm Gruplarda İndometazin'in, Y-27632 Varlığında Elde Edilen CCh Emax ve pD ₂ Değerlerine Etkisi	119
6.2.19. Tüm Gruplarda İndometazin'in, NSC 23766 Varlığında Elde Edilen CCh Emax ve pD ₂ Değerlerine Etkisi	125
6.2.20. Tüm Gruplarda İndometazin'in, Y-27632 + NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında Elde Edilen CCh Emax ve pD ₂ Değerlerine Etkisi.....	131
6.3. Histopatolojik ve İmmunhistokimyasal İncelemeler	137
6.3.1. Işık Mikroskopik Bulgular	137
6.3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	141
6.3.2.1 RhoA İmmunreaktivitesinin Değerlendirilmesi.....	141
(H&E; x40 ve H&E; x100)	143
6.3.2.2 Rac1 İmmunreaktivitesinin Değerlendirilmesi.....	144
7. TARTIŞMA.....	146
8. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	160
9. KAYNAKLAR.....	162

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Tüm gruplarda hayvanların vücut ağırlığı, mesane ağırlığı ve kan şekeri değerleri. 49

Tablo 2. Gruplararası RhoA immunreaktivitesinin semikantitatif olarak değerlendirmesi .. 141

Tablo 3. Gruplararası Rac1 immunreaktivitesinin semikantitatif olarak değerlendirmesi ... 144

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Mesane anatomisi	11
Şekil 2. İşeme fizyolojisi	12
Şekil 3. Muskarinik reseptörlerin detrusor kas kasılmasındaki rolleri	14
Şekil 4. Düz kas kasılması ve gevşemesinin düzenlenmesi.....	17
Şekil 5. Agonistle uyarılan düz kas kasılmasının Rho/Rho kinaz yoluyla aracılı düzenlenmesi	18
Şekil 6. DM progresyonunun mesane disfonksiyonunun seyrine etkisi (Temporal hipotez)..	24
Şekil 7. Küçük GTPaz aktivitesinin düzenlenmesi	33
Şekil 8. Rac1 aracılı sinyal ileti yollarının şematik görünümü	38
Şekil 9. İzole organ preparatlarının incelenmesinde kullanılan sisteme ait diyagram	42
Şekil 10. Tüm gruplarda KCl uygulaması sonrası mesanede oluşan kasılma yanıtları.....	49
Şekil 11. Tüm gruplarda kümülatif dozlarda uygulanan CCh (10^{-9} - 10^{-4} M) kasılma yanıtları	50
Şekil 12. Tüm gruplarda CCh Emax değerleri.....	51
Şekil 13. Tüm gruplarda CCh pD ₂ değerleri.....	51
Şekil 14. Tüm gruplarda indometazin yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları ...	52
Şekil 15. Tüm gruplarda indometazin yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	53
Şekil 16. Tüm gruplarda indometazin yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	53
Şekil 17. Kontrol grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	54
Şekil 18. Kontrol grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	55
Şekil 19. Kontrol grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	55
Şekil 20. Kontrol grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	56
Şekil 21. Kontrol grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	57
Şekil 22. Kontrol grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri.....	57
Şekil 23. Kontrol grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	58
Şekil 24. Kontrol grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	59
Şekil 25. Kontrol grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	59
Şekil 26. Kontrol grubunda küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri	60

Şekil 27. Kontrol grubunda küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	61
Şekil 28. Diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları....	62
Şekil 29. Diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	63
Şekil 30. Diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	63
Şekil 31. Diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	64
Şekil 32. Diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri.....	65
Şekil 33. Diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	65
Şekil 34. Diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	66
Şekil 35. Diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	67
Şekil 36. Diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	68
Şekil 37. Diyabet grubunda küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri	69
Şekil 38. Diyabet grubunda küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	70
Şekil 39. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	71
Şekil 40. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	72
Şekil 41. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	72
Şekil 42. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	73
Şekil 43. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	74
Şekil 44. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	74
Şekil 45. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları.....	75

Şekil 46. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	76
Şekil 47. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	77
Şekil 48. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri.....	78
Şekil 49. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında pD ₂ değerleri.....	79
Şekil 50. Tüm gruplarda Y-27632 yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri.....	80
Şekil 51. Tüm gruplarda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri.....	81
Şekil 52. Tüm gruplarda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri	82
Şekil 53. Tüm gruplarda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	83
Şekil 54. Tüm gruplarda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri	84
Şekil 55. Tüm gruplarda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	85
Şekil 56. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	86
Şekil 57. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	87
Şekil 58. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	87
Şekil 59. Kontrol grubunda, indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları.....	88
Şekil 60. Kontrol grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında Emax değerleri.....	89
Şekil 61. Kontrol grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında pD ₂ değerleri.....	90
Şekil 62. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	91
Şekil 63. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında Emax değerleri	92

Şekil 64. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	93
Şekil 65. Kontrol grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri.....	94
Şekil 66. Kontrol grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri.....	95
Şekil 67. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	96
Şekil 68. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	97
Şekil 69. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	98
Şekil 70. Diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları.....	99
Şekil 71. Diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri.....	100
Şekil 72. Diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri.....	100
Şekil 73. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	101
Şekil 74. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	102
Şekil 75. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	102
Şekil 76. Diyabet grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri.....	103
Şekil 77. Diyabet grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri.....	104
Şekil 78. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları.....	105
Şekil 79. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	106

Şekil 80. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	106
Şekil 81. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları.....	107
Şekil 82. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri	108
Şekil 83. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	108
Şekil 84. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları	109
Şekil 85. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri.....	110
Şekil 86. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri.....	110
Şekil 87. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri	111
Şekil 88. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında CCh pD ₂ değerleri	112
Şekil 89. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri	113
Şekil 90. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 kombinasyonu varlığında CCh pD ₂ değerleri	114
Şekil 91. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri	115
Şekil 92. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu varlığında CCh pD ₂ değerleri	116
Şekil 93. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri	117
Şekil 94. Tüm gruplarda indometazin+ Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında CCh pD ₂ değerleri	118
Şekil 95. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (0.1 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri	119

Şekil 96. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (0.1 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD ₂ değerleri	120
Şekil 97. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (1 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri	121
Şekil 98. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (1 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD ₂ değerleri	122
Şekil 99. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (10 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri	123
Şekil 100. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (10 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD ₂ değerleri	124
Şekil 101. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (0.1 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri	125
Şekil 102. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (0.1 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD ₂ değerleri	126
Şekil 103. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (1 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri	127
Şekil 104. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (1 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD ₂ değerleri	128
Şekil 105. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri	129
Şekil 106. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD ₂ değerleri	130
Şekil 107. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri.....	131
Şekil 108. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD ₂ değerleri.....	132
Şekil 109. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (1 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri.....	133
Şekil 110. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (1 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD ₂ değerleri.....	134
Şekil 111. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri.....	135

Şekil 112. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD₂ değerleri..... 136

RESİM LİSTESİ

Resim 1. İzole organ preparatlarının incelenmesinde kullanılan sistem.....	43
Resim 2. Kontrol grubunda mesane duvarının tam kat histolojik görünümü.....	137
Resim 3. Diyabet grubunda mesane duvarının tam kat histolojik görünümü.....	139
Resim 4. Diyabet grubunda mesane duvarının histolojik görünümü.....	139
Resim 5. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda mesane duvarının tam kat histolojik görünümü	140
Resim 6. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda mesane duvarının histolojik görünümü	140
Resim 7. Kontrol grubunda immunohistokimyasal incelemede RhoA ekspresyonu.....	142
Resim 8. Diyabet grubunda immunohistokimyasal incelemede RhoA ekspresyonu	142
Resim 9. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda immunohistokimyasal incelemede RhoA ekspresyonu	143
Resim 10. Kontrol grubunda immunohistokimyasal incelemede Rac1 ekspresyonu	144
Resim 11. Diyabet grubunda immunohistokimyasal incelemede Rac1 ekspresyonu.....	145
Resim 12. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda immunohistokimyasal incelemede Rac1 ekspresyonu.....	145

KISALTMA LİSTESİ

ACh	Asetilkolin
BK _{Ca}	Yüksek Kondüktanslı Kalsiyum İle Aktive Edilen Potasyum Kanalı
CaM	Kalmodulin
CCh	Karbakol
CICR	Kalsiyum Aracılı Kalsiyum Salınımı (calcium-induced calcium release) Kanalları
COX	Siklooksijenaz
DM	Diyabetes Mellitus
EDIC	Diyabet Komplikasyonları Epidemiyolojisi Çalışması (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications)
EFS	Elektriksel Alan Stimülasyonu
ENaC	Amilorid- ve Mekanosensitif-Epitelial Na ⁺ Kanalları
GAP	GTPaz Aktive Eden Protein
GDI	Guanin Nükleotid Ayırıcı İnhibitörü
GEF	Guanin Nükleotid Değişim Faktörü
GS	Guanilat Siklaz
IP3	İnositoltrifosfat
JNK	Janus kinaz, c-Jun N-terminal kinaz
KO	knock out (geni silinmiş)
KŞ	Kan Şekeri
L-NOARG	L-NG-nitroarginin
LPA	Lisofosfatidik asit
MAPK	Mitojen İle Aktive Edilen Protein Kinaz
mDia	Memeli Diaphanous Protein
MLC	Myozin Hafif Zincir
MLCK	Myozin Hafif Zincir Kinaz
MLCP	Myozin Hafif Zincir Fosfataz
MLK2/3	‘Mixed Lineage’ Kinaz 2/3
MYPT1	Myozin Fosfataz Hedef Alt Ünitesi 1
NFκB	Nükleer Faktör kappaB
NGF	Sinir Büyüme Faktörü

NO	Nitrik Oksid
NSAİİ	Non-Steroid Anti-İnflamatuvar İlaç
PAK	p21-ile Aktive Edilen Kinaz
PARP	Poli(ADP-riboz) Polimeraz
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PG	Prostaglandin
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfoinositid-3-Kinaz
PIP5-kinaz	Fosfatidilinositol 4-fosfat 5-kinaz
PKB	Protein Kinaz B
PKC	Protein Kinaz C
PKN	Protein Kinaz N
ROCK	Rho İle İlişkili Protein Kinaz
ROS	Reaktif Oksijen Ürünleri
SR	Sarkoplazmik Retikulum
STZ	Streptozotosin
TRP	‘Transient receptor potential’ kanalları
UCC	Ürotelyal Hücreli Karsinom
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim süresince bana her konuda destek olan danışmanım Prof. Dr. Sedef Gidener'e,

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimleri ile eğitimime büyük katkı sağlayan, öğrencisi olmaktan mutluluk ve gurur duyduğum Doç. Dr. Nergiz Murat'a,

Tezimin planlama, yapım ve değerlendirme aşamalarında katkılarından dolayı tez danışmanım Doç. Dr. Mukaddes Gümüştekin Güneli'ye,

Eğitimimdeki katkılarından dolayı bölümümüz öğretim üyelerine,

Asistanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarıma ve bölüm çalışanlarına,

Hayatım boyunca hep yanımda olan aileme

TEŞEKKÜR EDERİM.

1. TÜRKÇE ÖZET

Diyabetik Sıçanlarda Mesane Fonksiyonlarında Küçük GTPaz'ların Rolü

Dr. Atiye Sinem Evcim

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

35340 Balçova/İzmir

snmevc@gmail.com

Amaç: Diyabetik hayvan modellerinde diyabete bağlı değişikliklerde, endotel disfonksiyonunun yanısıra düz kas kasılması ya da düzenleyici birtakım proteinlerde anormallikler olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada düz kas kasılması ve ürotel fonksiyonlarındaki rolleri nedeniyle, küçük GTPaz'lar RhoA ve Rac1'in diyabetik mesane disfonksiyonundaki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde kontrol, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet grupları olmak üzere 3 grup oluşturuldu. STZ enjeksiyonundan 8-10 hafta sonra mesane detrusor kası stripleri organ banyosuna asıldı. Rho kinaz inhibitörü Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) ve/veya Rac1 inhibitörü NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) yokluğunda ve varlığında karbakol (CCh) (10^{-9} - 10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri elde edildi. Ürotelyumdan salınan prostaglandinlerin etkilerini değerlendirmek için indometazin (5×10^{-7} M) varlığında deneyler tekrarlandı. Parafine gömülü mesane boyun kısmı kesitlerinde diyabete bağlı histopatolojik değişikliklerin olup olmadığı hematoksilen eozin boyama ile, RhoA ve Rac1 ekspresyonlarındaki değişiklikler immunhistokimyasal boyama ile değerlendirildi.

Bulgular: CCh bütün deney gruplarında doza bağımlı kasılma yanıtları oluşturdu. Diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarındaki CCh yanıtları, kontrol grubundan daha fazlaydı. Rho kinaz inhibitörü Y-27632 varlığında, CCh kasılma yanıtları doza bağımlı olarak anlamlı derecede azaldı. Diyabet grubundaki azalma kontrol grubundakine göre daha fazla idi, ancak anlamlılık sadece 0.1 μ M Y-27632 varlığında gözlemlendi. İnsülin tedavisi, diyabetik grupta Y-27632'nin yaptığı inhibisyonu düzeltmedi. Yüksek doz Y-27632 (10 μ M) varlığında insülin

tedavisi verilen diyabet grubundaki CCh kasılma yanıtları, kontrol ve diyabet gruplarından daha fazla idi, ancak sadece kontrol grubu ile anlamlı fark bulundu.

Rac1 inhibitörü NSC 23766 varlığında tüm gruplarda CCh kasılma yanıtları anlamlı derecede azaldı, ancak etki doza bağımlı değildi. Diyabetik ve insülin tedavisi verilen diyabetik gruplardaki inhibisyon, kontrol grubundan daha fazla idi. Diyabet grubunda 0.1 μ M NSC 23766 varlığında ve insülin tedavisi verilen diyabet grubunda 0.1 ve 10 μ M NSC 23766 varlığında görülen inhibitör etkinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu bulundu.

Ekimolar konsantrasyonlarda kombine edilen Y-27632 ve NSC 23766 varlığında, CCh kasılma yanıtları doza bağımlı olarak anlamlı derecede azaldı, diyabet grubundaki azalma kontrol grubundakine göre daha fazla idi. Ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun CCh kasılma yanıtlarında oluşturduğu inhibitör etki değerlendirildiğinde, diyabet grubunda 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda, insülin tedavisi verilen diyabet grubunda ise tüm konsantrasyonlarda gruplar arasında anlamlılık görüldü. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında, CCh kasılma yanıtlarında anlamlı bir düzelme görülmedi.

İndometazin, tüm gruplarda CCh kasılma yanıtlarını inhibe etti, ancak gruplar arasında inhibisyonlar arasında anlamlı fark bulunmadı. İndometazin, küçük GTPaz'ların inhibisyonu ile oluşan etkileri potansiyalize etmedi.

Hematoksilen eozin ile boyanan mesane dokularının ışık mikroskobu ile incelenmesinde, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında mesane duvar kalınlıklarının kontrole göre artmış olduğu gözlemlendi. İmmunhistokimyasal boyamada, RhoA ekspresyonlarında gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. Ancak Rac1 ekspresyonlarının, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında, kontrol grubuna göre tüm tabakalarda arttığı gözlemlendi. Diyabet grubunda lamina propria ve tunika muskularis tabakalarındaki Rac1 ekspresyonları, insülin tedavisi verilen diyabet grubuna göre anlamlı olarak arttı.

Sonuç: Diyabet grubundaki CCh yanıtlarının, Y-27632 ve/veya NSC 23766 varlığında, kontrol grubuna göre daha fazla inhibe olması, diyabete bağlı mesane disfonksiyonunda küçük GTPaz'ların rolü olabileceğini düşündürmektedir. İmmunhistokimyasal değerlendirmede diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında Rac1 ekspresyonları artarken, RhoA ekspresyonlarında değişiklik görülmemesi; Rac1'e bağlı etkilerin ekspresyon artışı nedeni ile olabileceğini düşündürürken, RhoA'ya bağlı etkilerin ekspresyondan ziyade aktivite artışına bağlı olabileceğini düşündürdü. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda, küçük GTPazların inhibisyonuna bağlı etkilerin düzelmediği gözlemlendi. Bu sonuçlar diyabetik mesane komplikasyonlarının düzeltilebilmesi için insuline ek olarak yeni tedavilere ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Bu noktada küçük GTPaz'ları hedef alan tedavilerin umut verici olduğu ve daha ileri çalışmalara gerek olduğu düşünölmektedir.

Anahtar Kelimeler: diyabetes mellitus, mesane, sıçan, küçük GTPaz, RhoA, Rac1, insülin

2. İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

The Roles of Small GTPases on Urinary Bladder of Diabetic Rats

Dr. Atiye Sinem Evcim

Dokuz Eylul University Faculty of Medicine, Department of Pharmacology

35340 Balçova/Izmir

snmevc@gmail.com

Objective: In addition to endothelial dysfunction, smooth muscle contraction or regulatory protein abnormalities have been shown to induce diabetes-related changes in diabetic animal models. The aim of this study was to investigate the roles of small GTPases RhoA and Rac1 on diabetic bladder dysfunction because of their role in the contraction of smooth muscle and urothelial function.

Materials and Methods: In streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat model, control, diabetic, and insulin-treated diabetic groups were performed. Urinary bladder detrusor muscle strips were suspended in organ baths at the end of 8-10 weeks after STZ injection. In either the absence or presence of Rho kinase inhibitor Y-27632 (0.1, 1 and 10 μ M) and/or Rac1 inhibitor NSC 23766 (0.1, 1 and 10 μ M), carbachol (CCh) (10^{-9} - 10^{-4} M) dose-response curves were obtained. Experiments were repeated in the presence of indomethacin (5×10^{-7} M) for evaluation effects of prostaglandins which are released from urothelium. Paraffin-embedded sections of the urinary bladder neck whether diabetes-related histological changes and RhoA and Rac1 expressions were evaluated by hematoxylin eosin staining and immunohistochemical staining respectively.

Results: CCh produced dose-dependent contractile responses in all experimental groups. In diabetic and insulin-treated diabetic groups, contractile responses to CCh were higher than those of the control group. Y-27632 dose-dependently inhibited the contractions induced by CCh. Inhibition in diabetic group was significantly greater than those of the control group. Insulin therapy didn't improve the inhibitory effects of Y-27632. In the presence of high dose Y-27632 (10 μ M), CCh-induced bladder contractions were higher in insulin-treated diabetic group compared to control and diabetic groups, but the significant difference was observed only compared to control group.

In the presence of Rac1 inhibitor NSC 23766, CCh-induced contractions were decreased significantly in all groups, but the effects of NSC 23766 were dose-independently. The inhibitory effects of NSC 23766 in diabetic and insulin-treated diabetic group were higher than those of the control group. When compared to control group the significantly differences were observed in the presence of 0.1 μ M NSC 23766 in diabetic group and in the presence of 0.1 ve 10 μ M NSC 23766 in insulin-treated diabetic group.

Combined with equimolar concentrations of Y-27632 and NSC 23766, CCh-induced contractions significantly were decreased, reduction in diabetic group was significantly greater than those of the control group. The difference among groups in terms of significance was observed in diabetic group at concentrations of 1 ve 10 μ M and in insulin group at all concentrations. In presence of the combination of Y-27632 + NSC 23766, there wasn't significant improvement in responses to CCh in insulin-treated diabetic group.

Indomethacin significantly inhibited CCh-induced contractions in all groups, but there were not any significant differences among groups. Indomethacin didn't potentiate the inhibitory effects of the small GTPases.

In hematoxylin eosin staining, bladder wall thickness was increased in diabetic and insulin-treated diabetic groups compared to control group. Also there were no differences in RhoA immunoreactivity among groups. The immunohistochemical expressions of Rac1 were increased in all strata of urinary bladder in diabetic and insulin-treated diabetic groups compared to control group and there was statistically significant increase in lamina propria and tunica muscularis in diabetic group compared to insulin-treated diabetic group.

Conclusion: In the presence of Y-27632 and/or NSC 23766, the inhibition of CCh-induced contractions in diabetic and insulin-treated diabetic group were higher than those of the control group. Therefore small GTPases may play a role on bladder dysfunction in diabetes. RhoA mediated effects may be due to increased activity, rather than expression. Increased Rac1 expressions were found in diabetic and insulin-treated diabetic groups, Rac1 mediated effects may be due to its increased expression. Insulin therapy didn't improve sufficiently the inhibitory effects of small GTPases in diabetic rats. These results suggest that need an

additional treatment to insulin in the diabetic complications of urinary bladder. At this point further studies are needed for promising therapies that target the small GTPases RhoA and Rac1 on diabetic bladder dysfunction in diabetes.

Keywords: diabetes mellitus, urinary bladder, rat, small GTPase, RhoA, Rac1, insulin

3. GİRİŞ VE AMAC

Diyabetes mellitus (DM) tüm dünyada en sık rastlanan endokrin hastalıktır. Diyabetik hastaların %80'inde, hayatı tehdit etmeyen ancak yaşam kalitesini bozan diyabetik işeme disfonksiyonu görülmektedir (1). Buna rağmen bu hastalığın gelişim süreci ve ürolojik komplikasyonların başlangıcı ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Bu bilgi yetersizliği, diyabetik işeme disfonksiyonlu hastalarda yeni ve etkili korunma ve/veya tedavi seçeneklerinin gelişimini kısıtlamaktadır (2).

Diyabetik hastalarda, mesane disfonksiyonu patofizyolojisi multifaktöriyeldir. Hastalarda nöronal disfonksiyon, düz kas disfonksiyonu ve ürotelyumdan kaynaklanan geniş spektrumda belirti ve bulgular görülür (3). Hayvan ve insan çalışmalarına dayanarak, 'diyabete bağlı mesane disfonksiyonu temporal (zamana bağımlı) teorisi' öne sürülmüştür (3). Diyabetin erken dönemlerinde hiperglisemi, myojenik ve nörojenik değişikliklere ayrıca indüklediği poliüri aracılığıyla da kompensatuvar mesane hipertrofisine neden olur. Erken dönemde hastalar, depolama problemlerinden (sıkışma veya sıkışma tipi idrar kaçırma) yakınırlar; ürodinamik değerlendirme hiperaktif mesane bulguları ile uyumludur. Geç dönemde ise uzamış hiperglisemi sırasında oksidatif stres ürünlerinin birikimi, mesane dokusu ve fonksiyonunda dekompanzasyona yol açar. Bu dönemde hastalar işeme problemleri ile birlikte diyabetik sistopatinin (hipokontraktil detrusor veya atonik mesane) klasik klinik belirti ve bulgularını gösterir (3).

Mesane kasılması, fizyolojik olarak işemede rol oynar ve başlıca muskarinik reseptörler tarafından kontrol edilir (4). Mesanede M_2 reseptörleri, M_3 reseptörlerinden daha fazla eksprese olmakla birlikte; muskarinik reseptör agonistlerine verilen kasılma yanıtı, bütünüyle olmasa da başlıca M_3 reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirilir. İnsan mesanesinde M_3 aracılı kasılma yanıtlarının, L-tipi kalsiyum kanallarından kalsiyumun hücre içine girişi ve Rho kinaz (ROCK) aktivasyonu yoluyla olduğu bildirilmektedir (5). Düz kas hücrelerinin, hücre içi submaksimal Ca^{2+} varlığında kasılma yanıtlarını devam ettirebilme yeteneği 'kalsiyum sensitizasyonu' olarak bilinir (6-9). Kalsiyum sensitizasyonunda anahtar rolü, myozin hafif zincir (MLC) fosforilasyonunun oynadığı (10) bilinmekle birlikte; son yıllarda G protein aracılı mekanizma ile myozin hafif zincir fosfataz (MLCP) inhibisyonu yapan Rho kinaz enziminin majör rol oynadığı kanıtlanmıştır (11). Diyabette detrusor kasın muskarinik

agonistlere yanıtının artması; muskarinik reseptör dansitesindeki artışa (12) ya da düz kasın kalsiyuma duyarlılığının artmış (13) olmasına bağlanmaktadır.

RhoA ve Rac1, Rho familyasına ait olan küçük GTPaz'lardır. Aktin hücre iskeletinin organizasyonunda, hücre-hücre ilişkisi, hücre motilitesi, sitokinezis, santral sinir sisteminde nöronların gelişimi, düz kas kasılması, sekresyon, endositoz ve apoptoziste rol oynarlar (14, 15). Rho'ların ana efektör molekülü bir serin-treonin kinaz olan Rho kinaz'dır (11). Son yıllarda Rac1'in, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, hücre farklılaşması, DNA sentezinin indüksiyonu, süperoksit üretimi ve hücre göçü gibi çok çeşitli hücresele olaylarda temel rol üstlendiği gösterilmiştir. Rac1'in, NADPH oksidaz enziminin bir subüniti olarak reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumunu arttırdığı ve artmış hücre içi serbest radikallere bağlı olarak apoptozis gibi pek çok hücresele olayda rol oynadığı gösterilmiştir (16). Ayrıca küçük GTPaz'lar Rac1 ve RhoA'nın pek çok fizyolojik ve patolojik olayda bir denge içinde aktivite gösterdikleri ve birbirlerinin etkilerini modüle ettikleri bilinmektedir. Diyabetik hayvanların mesane dışı çeşitli dokularında Rho/Rho kinaz sinyalinin arttığı bilinmektedir (11). RhoA'nın efektör molekülü olan Rho kinazın (17) ve Rac1'in efektör molekülü olan p21-ile aktive edilen kinaz (Pak1) (18) ekspresyonlarının diyabetik hayvanların mesane dokusunda arttığını bildiren az sayıda çalışma olmakla birlikte, diyabetik sıçan mesanesinde küçük GTPaz'lar RhoA ve Rac1 ekspresyonunu inceleyen araştırmaya rastlanmamıştır.

Diyabetik hastalarda gösterilen yararlı etkilerine benzer şekilde insülin tedavisinin diyabetik hayvan modellerinde de diyabete bağlı komplikasyonları geciktirdiği ya da önlediği bildirilmektedir. İnsülin tedavisinin gerek diyabetik hastalarda gerekse diyabetik hayvan modellerinde, diyabete bağlı mesane disfonksiyonu üzerindeki etkilerine dair çok az çalışmaya rastlanmıştır. Diyabetik farelerde, uzun süreli insülin tedavisinin mesane fonksiyonlarındaki değişikliklerin çoğunu (mesane kapasitesi ve kompliyansında artma, idrar volümü ve rezidü volümde artma gibi) geriye döndürdüğü bildirilmiştir (19). İnsülin tedavisinin iskelet kaslarında ROCK1 aktivitesini arttırdığı ve ROCK1'i hedefleyen tedavi modalitelerinin obezite ve tip II diyabet tedavisinde yeni yaklaşımlar olabileceği bildirilmiştir (20). Düşük doz insülin infüzyonunun antiinflamatuar, antiaterosklerotik ve ROS'ni azaltıcı etkisi olduğu ve bunları da olasılıkla hipoglisemik etkileri aracılı oluşturduğu bildirilmektedir

(20). Ancak diyabete bağılı mesane disfonksiyonunda insülin tedavisinin Rho/Rho kinaz yolağını ve/veya Rac1 yolağını nasıl etkilediğine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ürotelyal ve subürotelyal interstisyel hücreler, muskarinik reseptörleri de içeren çeşitli reseptörleri eksprese ederler; distansiyon ve reseptör aktivasyonuna yanıt olarak nörotransmitter salınımında rol alırlar (21). Fizyolojik koşullarda ürotelyumdan salınan salınan prostaglandinlerin ($PGF_{2\alpha}$ ve PGE_2) hem düz kas üzerine direkt etkileri hem de duyuşal sinirler üzerindeki lokal etkileriyle mesane fonksiyonlarını etkiledikleri (22) ancak diyabet gibi patolojik koşullarda sentezlerinin artmasına bağılı olarak mesanede hiperaktiviteye ve düz kas kasılmasında spazma neden oldukları bildirilmektedir (23, 24). Ayrıca aşırı aktif mesane tedavisinde PG sentezini inhibe eden nonsteroid antiinflatuvar ilaçların (NSAİİ) bu kasılmaları inhibe edici etkisinden faydanılmaktadır (25). PG reseptörlerinden EP3'ün, Gi proteini ile kenetli olduğu ve aynı zamanda küçük G proteini RhoA aracılığıyla cAMP oluşumunu inhibe ettiğı bildirilmektedir (26). PGE_2 'nin indüklediğı aşırı aktif mesane ve mesane çıkım obstrüksiyonlarında, EP1 reseptörlerinin rolü olduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir (27, 28). Omurilik hasarında ibuprofen gibi NSAİİ'ların, Rho kinaz aktivitesini baskılayarak tedavi edici etki gösterdiği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (29, 30). Ayrıca Rho kinaz inhibitörü fasudilin sıçanlarda omurilik hasarının tedavisinde etkili olduğu da gösterilmiştir (31) Ayrıca PG'lerin, küçük GTPaz'larla ilişkisi başka patolojilerde araştırılmış olmasına rağmen, diyabetik mesanede çalışmadığı görülmüştür.

Diyabetik hastaların büyük bir çoğunluğunda görölmesine karşın, diyabetik işeme disfonksiyonunun gelişim süreci ve komplikasyonları ile ilgili bilgiler ve etkili korunma ve/veya tedavi seçenekleri sınırlıdır. Bu projenin amacı; 1) Diyabete bağılı mesane disfonksiyonunun gelişiminde küçük GTPaz'ların rolünü araştırmak, 2) Mesane kasılmasında PG'lerin rolü olması nedeniyle diyabete bağılı mesane disfonksiyonunda PG'ler ile küçük GTPaz'lar arasındaki ilişkiyi araştırmak, 3) Diyabete bağılı mesane disfonksiyonunda insülin tedavisinin etkisini ve küçük GTPaz inhibitörleri ile ilişkisini araştırmak, 4) Diyabetik mesanede RhoA ve Rac1 ekspresyonlarının derecelerini araştırmak, 5) Rho kinaz veya Rac1 inhibitörü varlığında organ banyosunda mesane düz kas kasılmasında görülen fonksiyonel değişikliklerin RhoA ve Rac1 ekspresyonları ile arasındaki korelasyonu araştırmak, 6) Bu verilerle diyabete bağılı histolojik değişiklikler arasında bir korelasyon olup olmadığını

saptamaktır. Buradan elde edilecek bilgiler ışığında, bu süreçleri etkileyebilecek tedavi veya korunma amaçlı yeni hedef moleküller belirlenebilecektir.

4. GENEL BİLGİLER

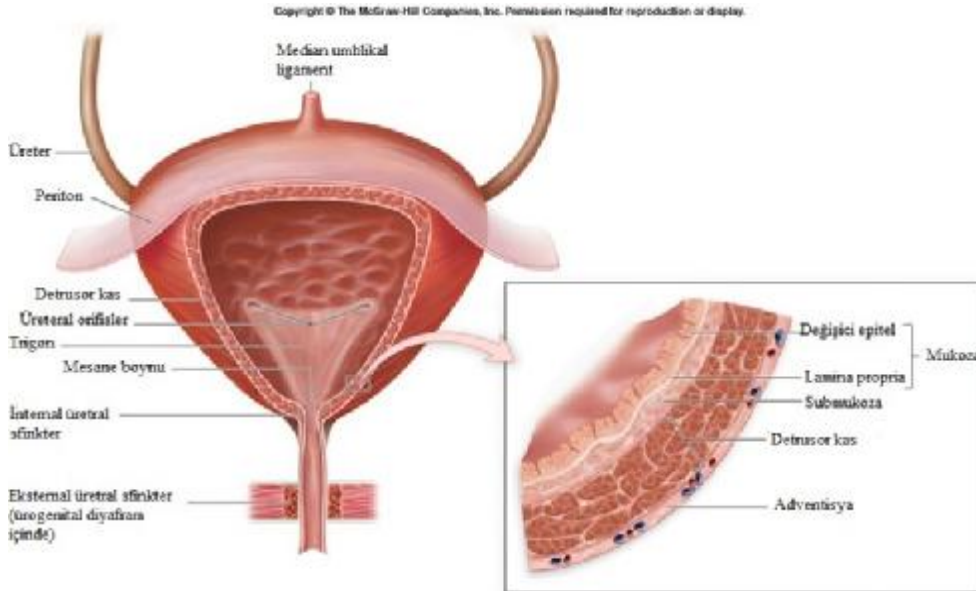
4.1. Mesane

4.1.a. Mesane Anatomisi

Mesane iç yüzü mukoza ile döşeli, dış yüzü kısmen seroza, kısmen de fasya ile örtülü düz kastan oluşan içi boş bir organdır. Mesane kapasitesi insanda yaklaşık 500 ml'dir. Mesane, gövde ve taban olmak üzere iki ana bölüme ayrılabilir. Mesane gövdesi üreteral orifislerin üzerinde yer alır ve idrarın toplandığı temel bölümdür. Mesane tabanı trigon, üreterovezikal bileşke, derin detrusor ve mesane ön duvarından oluşur. Trigon, mesanenin arka duvarında yer alan küçük üçgen şeklindeki bölgedir (Şekil 1). Mesanenin düz kas hücrelerinden oluşan müküler duvarı detrusor kas adını alır (4).

4.1.b. Mesane Histolojisi

Mesane içten dışa doğru mukoza, tunika muskularis ve adventisya tabakalarından oluşur. Mukoza değişici epitel (ürotel) ve lamina propriayı içerir (Şekil 1). Lamina propria, elastik fibrilden zengin gevşek bağ dokusudur. Tunika muskulariste dışta ve içte uzunlamasına, ortada dairesel olarak rastgele yerleşmiş düz kas fibrilleri bulunur. Adventisya, fibroelastik dokudur (32, 33).

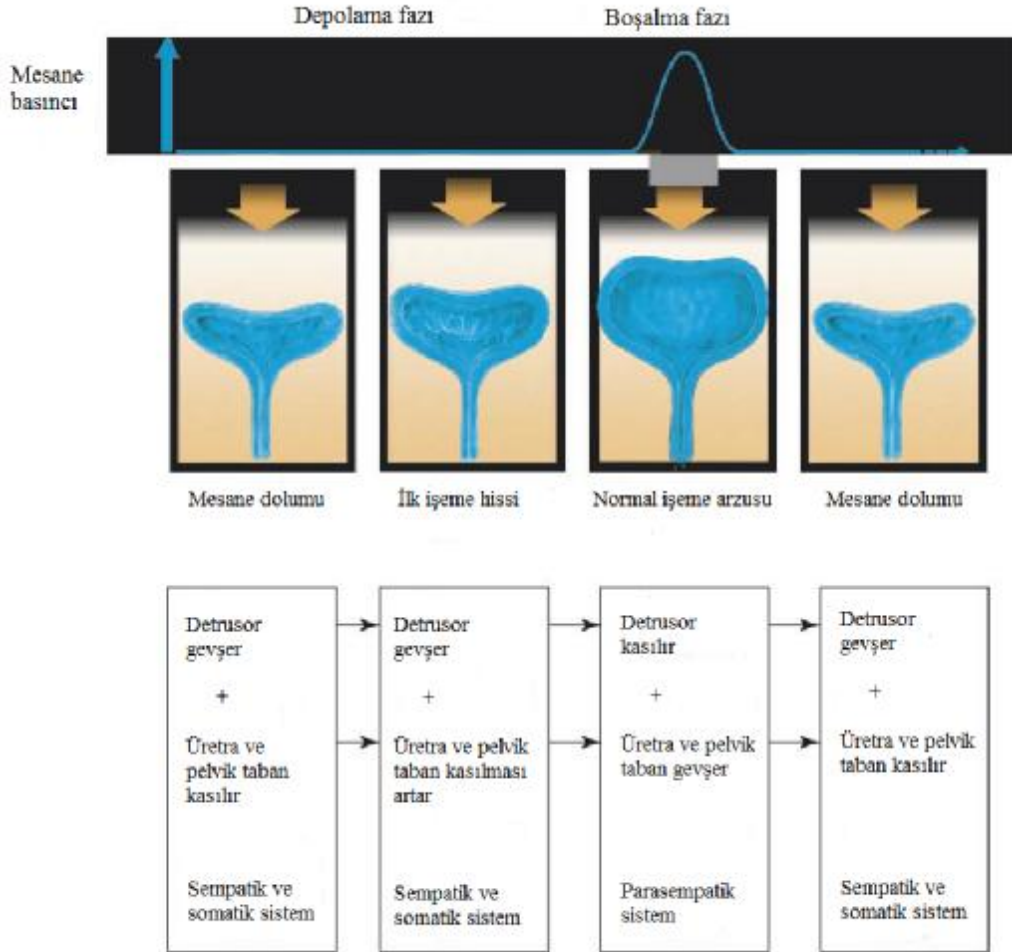


Şekil 1. Mesane anatomisi

(34 nolu kaynaktan alınmıştır.)

4.1.c. İşeme Fizyolojisi

Mesannenin idrar depolama ve boşaltma olmak üzere iki önemli görevi vardır. Mesane fonksiyonu, duyuşal mekanizmalar, santral sinir sistemi ve efferent yollardan oluşun kompleks bir ağı tarafından düzenlenir. Efferent yollardan parasempatik sinir sistemi (pelvik sinirler), mesane detrusor kasının kasılmasını uyararak işemeyi; sempatik sinir sistemi (hipogastrik sinir) ve somatik sinir sistemi (pudental ve sakral sinirler) ise detrusor kasının gevşemesini ve mesane boynu ve üretranın kasılmasını uyararak idrarın depolanmasını sağlar (Şekil 2). Parasempatik sinirlerin, detrusor kasın kasılması üzerine etkisi, büyük oranda M_3 muskarinik asetilkolin reseptörleri ile olurken, sempatik sinirlerin detrusor kastaki gevşemeyi uyarması başlıca β_3 adrenoreseptörleri ile olur (4, 35).



Şekil 2. İşeme fizyolojisi

(35 nolu kaynaktan alınmıştır)

Mesanenin kasılması, başlıca muskarinik reseptör aktivasyonu ile olur. Detrusor kasta çeşitli türlerde, beş muskarinik reseptör alt tipinin (M_1 - M_5) de eksprese olduğu bilinmektedir (36, 37). Mansfield ve ark. (2005), insan detrusor kasında bulunan muskarinik reseptörlerin %70 M_2 , %20 M_3 ve %10 M_1 alt tipinde olduğunu göstermişlerdir (38). Farmakolojik çalışmalar sonucunda mesanenin agonist aracılı kasılma yanıtlarının başlıca M_3 reseptörleri ile kontrol edildiği bulunmuştur (39-42). M_3 'knock out' (KO, geni silinmiş) farelerde karbakol (CCh) aracılı kasılma yanıtlarının %95 azalmış olduğu gösterilmiştir (43, 44). İlginç olarak M_3 KO farelerde yapılan sistometrik çalışmalarda, mesane boşalmasında büyük bir fonksiyonel anormallik gözlenmemiş (45); bu durum M_3 reseptörlerinin kronik yokluğunun diğer muskarinik reseptörler veya nonkolinerjik mekanizmalar ile kompanse edilebileceği şeklinde açıklanmıştır (46). M_3 KO farelerde korunan %5 kasılma yanıtının, M_2 ve M_3 KO farede tamamıyla kaybolması, M_2 reseptörlerinin %5'lik kasılmadan sorumlu olduğunu düşündürmüştür (43, 44).

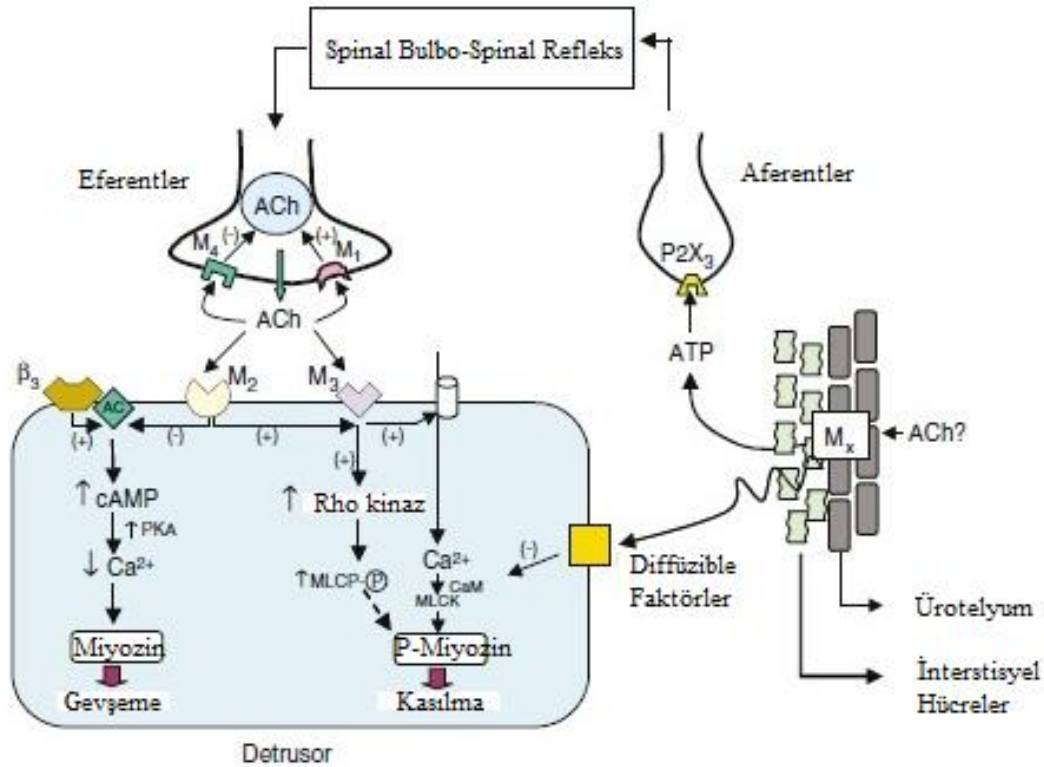
İnsan mesanesine M_3 aracılı kasılma yanıtlarının, L-tipi kalsiyum kanallarından kalsiyumun hücre içine girişi ve Rho kinaz aktivasyonu yoluyla olduğu bildirilmektedir (5). M_3 aracılı fosfolipaz C aktivasyonunun, mesanenin kasılma yanıtlarına katkısının çok az olduğu da ileri sürülmüştür (47). M_2 reseptörlerinin ise β -adrenerjik reseptörlerin cAMP aracılı mekanizma yoluyla yaptığı gevşemeyi inhibe ederek indirekt kasılma yanıtı oluşturduğu bildirilmektedir (40, 48). Ayrıca M_2 reseptörlerinin bilinmeyen bir mekanizma ile M_3 aracılı direkt kasılma yanıtlarını modüle ettiği de düşünülmektedir (44).

Muskarinik reseptörler ayrıca mesanede kolinerjik ve adrenerjik sinir terminallerinde presinaptik lokalizasyonda bulunurlar; Asetilkolin (ACh) ve noradrenalin salınımının modülasyonunda görev yaparlar (46). Mesanede presinaptik fasitilatör reseptörün M_1 , inhibitör reseptörün M_4 alt tipinde olduğu gösterilmiştir (49-51).

Ürotelyal ve subürotelyal interstisyel hücreler, muskarinik reseptörleri de içeren çeşitli reseptörleri eksprese ederler (20); distansiyon ve reseptör aktivasyonuna yanıt olarak nörotransmitter salınımında rol alırlar (21, 52). Ürotelyal muskarinik reseptörlerin, altındaki detrusor kasın kasılmasını inhibe eden 'diffüzible' mediyatörlerin salınımını uyardığı gösterilmiştir (53, 54). Nöronal/ekstranöronal kaynaklardan salıverilen ACh'in, ürotelyum ve subürotelyumdaki muskarinik reseptörleri (M_x , alt tipi bilinmemektedir) uyarması üzerine,

ürotelyal hücrelerden salıverilen ATP'nin afferent sinirleri P2X₃ reseptörleri aracılığıyla aktive ederek, uyarılabilirliklerini değiştirdiği gösterilmiştir (21, 46, 55). Muskarinik reseptörlerin detrusor kasılmasının modülasyonundaki rolleri şekil 3'te özetlenmiştir.

Mesanenin depolama fonksiyonunda mesanenin gevşemesini sağlayan β reseptörler rol alır (Şekil 3). Mesanede beta reseptörlerinin üç alt tipi de gösterilmiştir. İnsan mesanesinde %95'in üzerinde β_3 reseptörü bulunurken, sıçanda β_2 ve β_3 reseptörleri ağırlıklıdır (56). Beta reseptör stimülasyonu ile uyarılan mesane gevşemesinde, cAMP formasyonunun minör, yüksek kondüktanslı kalsiyum ile aktive edilen potasyum kanalı (BK_{Ca}, large conductance Ca-activated K⁺ channel) ve hatta L tipi Ca²⁺ kanallarının daha önemli rol oynadığı bildirilmektedir (57- 60).



Şekil 3. Muskarinik reseptörlerin detrusor kas kasılmasındaki rolleri
(46 nolu kaynaktan alınmıştır)

4.1.d. Detrusor Düz Kas Kasılması

Detrusor kası, yapı ve fonksiyonel olarak trigonal ve üretral düz kastan farklıdır. Mesanenin düz kas tabakası, iç ve dış katmanlarda longitudinal, ortada sirküler olarak seyreden üç katmandan oluşur. İnsan detrusor kasında farklı büyüklüklerde kas fibrilleri, kollajenden zengin bağ dokusu ile çevrilidir. Kas fibrilleri içinde düz kas hücreleri küçük fonksiyonel birim ya da fasiküller oluştururlar (61). Mesanede düz kas hücreleri, uzun, içi, merkezi yerleşimli tek çekirdekli hücrelerdir. Mesane gevşediği zaman bu hücrelerin uzunluğu birkaç yüz μm , çapı 5-6 μm olur (62).

Düz kaslar, kontraktıl davranışlarına göre tek üniteli ve çok üniteli düz kaslar olmak üzere iki sınıfa ayrılır (63). Tek üniteli düz kasta, hücreler yaprak veya fibriller şeklinde dizilirler; hücre membranları, geçit bölgeleri (gap junctions) denilen birçok özel noktada birleşir. Geçit bölgeleri, konneksin alt birimlerinden oluşan düşük dirençli yollardır; iyonlar bir hücreden diğerine geçebilir, dolayısıyla elektrik sinyali dokuda hızla yayılır (64). Bu sayede aksiyon potansiyeli, bir alandan diğerine doğrudan elektriksel iletim yoluyla geçer. Tek üniteli düz kas içindeki az sayıda fibril (pacemaker hücreler), spontan olarak aksiyon potansiyeli üretebilir. Karakteristik olarak tek üniteli düz kasta, kontraktıl yanıtı indükleyen kasın gerilmesidir. Çok üniteli düz kasta, kas fibrillerinin, ayrı ya da demet halinde, birbirlerinden bağımsız olarak kasılabildiği düşünülür. Otonom sinir sisteminden zengin inervasyona sahiptirler ve başlıca sinir uyarısıyla kontrol edilirler. Nadiren spontan kasılma görülür. Detrusor kası, temel olarak tek üniteli düz kas hücrelerinden oluşur, ayrıca çok üniteli düz kastaki gibi yoğun inervasyona sahiptir ve fonksiyonel olarak, işemeyi gerçekleştirebilmek için sinirsel koordinasyona ihtiyaç duyar (4).

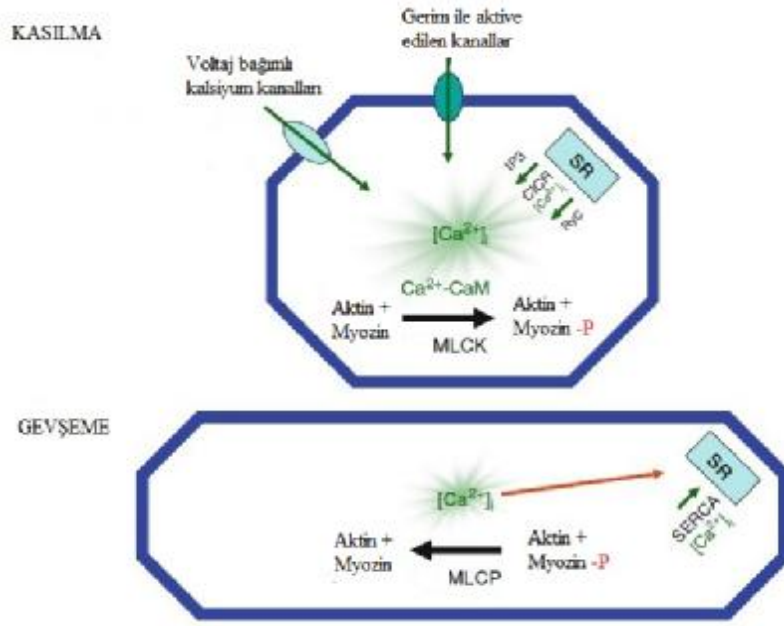
Düz kas için diğer bir sınıflama, membran özellikleri ve kontraktıl davranışlarına göre yapılan fazik ve tonik kas ayrımıdır (65). Tonik ve fazik kaslar, düzenleyici sistemler ve kontraktıl mekanizmalar açısından farklı kinetiğe sahiptir (66). Ancak kontraktıl kinetikleri farklı düz kasları, hızlı fazik tip, yavaş tonik tip olarak sınıflandırmak zordur. Mesane düz kası 'fazik' düz kas özellikleri nedeniyle nispeten hızlı bir düz kastır (4).

Düz kas kasılması, diğer kas tiplerinde olduğu gibi kontraktıl proteinler olan aktin ve myozinin etkileşimine dayanır. Düz kas lifleri, ince (aktin) ve kalın filamentleri (myozin)

içeren myofibriller olarak düzenlenir, lifler birbirine kafes benzeri düzende oblik olarak geçerler. Düz kasta Z çizgisi yoktur, mikroskop altında sitoplazmik çizgilenme görülmez. Ancak benzer görevi yapan yoğun cisimcikler, kontraktıl yapıların bağlanması için iskelet işlevi görür (67). Düz kasta bulunan myozin II (68); iki özdeş ağır zincir ve iki çift hafif zincirden oluşur. Hafif zincirler, esas (17 kDa) ve düzenleyici (20 kDa) hafif zincirler olarak tanımlanır (69). Kas kasılması sırasında myozin, aktin filamanlarına bağlanarak, filamanların kaymasını sağlayan motor görevi görür. Myozinin globuler baş kısmı, kalın ve ince filamanlar arasında köprü oluşturacak (cross-bridges) şekilde aktine bağlanır. Aktine bağlanmasına ek olarak myozin başları aynı zamanda ATP'ye bağlanır ve hidrolize eder, bu da filamanların kayması için gereken enerjiyi sağlar (70).

Düz kasın kasılma ve gevşemesi, fosforilasyon-defosforilasyon kaskadına dayanır; sırasıyla myozin hafif zincir kinaz (myosin light chain kinase, MLCK) ve MLCP enzimleri ile kontrol edilir. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları veya gerim ile aktive edilen (stretch-activated) kanallar ile hücre dışından, hücre içine kalsiyum girişi ve sarkoplazmik retikulum (SR) membranında bulunan 'kalsiyum aracılı kalsiyum salınımı (calcium-induced calcium release, CICR) kanalları' (71) ve inositol trifosfat (IP_3) reseptörü aracılığıyla, SR'dan sitoplazmaya kalsiyum salınımı (72, 73) ile sitozolik $[Ca^{2+}]$ artışı sağlanır ve düz kas kasılması uyarılır. Hücre içi serbest kalsiyumun üç ile on kat artışına yanıt olarak, Ca^{2+} kalmoduline (CaM) bağlanır; bu kompleks (Ca^{2+}/CaM), düzenleyici MLC'yi fosforilleyen MLCK'ı aktive eder (74). Bu konformasyonel değişiklik sonucunda aktin, myozin ATPaz aktivitesini uyarır, aktin myozin üzerinde kayar ve myosit kasılması gerçekleşir (75). MLC fosforilasyon düzeyi ile aktin ile aktive olan ATPaz aktivitesi arasında lineer bir ilişki bulunur (76).

Hücrel aktivasyonun gerçekleşmesinden birkaç dakika sonra, Ca^{2+} 'un SR tarafından geri alınması ve Ca^{2+} pompaları ile hücre dışına gönderilmesi gibi mekanizmalar ile Ca^{2+} düzeyi bazal düzeyine geri döner (77). $[Ca^{2+}]$ 'daki azalma, MLCK'ı inaktive eder ve MLC'in MLCP ile defosforilasyonuna izin verir, böylece gevşemeye neden olur. Düz kas kasılması ve gevşemesinin düzenlenmesi şekil 4'te özetlenmiştir.



Şekil 4. Düz kas kasılması ve gevşemesinin düzenlenmesi
(11 nolu kaynaktan alınmıştır)

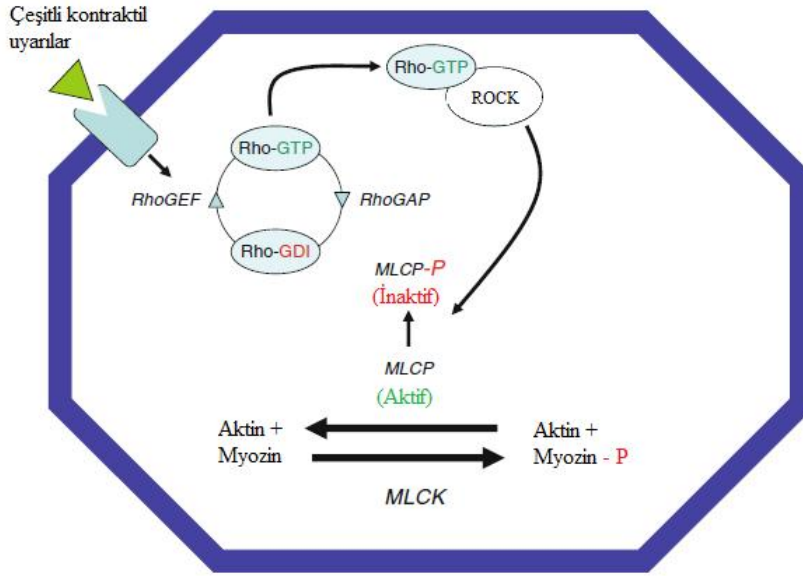
Kalsiyum Sensitizasyonu

Düz kas kasılması esas olarak sitozolik $[Ca^{2+}]$ artışı ile aktive olmakla birlikte son yıllarda $[Ca^{2+}]$ değişikliği olmadan da düz kas kasılmasının gerçekleştiği gösterilmiştir. Düz kas hücrelerinin hücre içi submaksimal Ca^{2+} varlığında kasılma yanıtlarını devam ettirebilme yeteneği 'kalsiyum sensitizasyonu' olarak bilinir (6-9). Kalsiyum sensitizasyonunun, $[Ca^{2+}]$ değişikliği olmadan düz kas kasılmasını gerçekleştirmesini sağlayabildiği (78) çeşitli dokularda gösterilmiştir (10, 79). Kalsiyum sensitizasyonunda, anahtar rolü, MLC fosforilasyonu aracılı mekanizmanın (10) oynadığı bilinmekle birlikte; son yıllarda G protein aracılı mekanizma ile MLCP inhibisyonu yapan Rho kinaz enziminin majör rol oynadığı kanıtlanmıştır (11).

Düz Kas Kasılmasında Rho/Rho kinaz Yolağı

Kalsiyum sensitizasyonunun major mekanizması, son yıllarda tanımlanan Rho kinaz enzimini kapsamaktadır. Rho kinaz aktivitesi, kompleks bir moleküler yolak tarafından düzenlenir. Bu yolağın majör bileşenleri ve işleyişi şekil 5'te gösterilmiştir. Rho kinaz aktivitesinin önemli düzenleyicilerinden biri, küçük GTP bağlayan protein olan RhoA'dır (80). Rho kinaz, GTP-RhoA'nın santralinde bulunan Rho bağlayan bölgesine bağlanır. Bu bağlanma Rho kinazın en aktif olduğu yer olan hücre membranına taşınmasını sağlar (81). Rho kinazın myozini

doğrudan fosforilleyerek MLC fosforilasyon düzeyini arttırabileceği in vitro koşullarda gösterilmiştir (82).



Şekil 5. Agonistle uyarılan düz kas kasılmasının Rho/Rho kinaz yolağı aracılı düzenlenmesi (11 nolu kaynaktan alınmıştır)

4.1.e. Ürotelyumun Yapısı ve Ürotelyumun Düz Kas Kasılmasındaki Rolü

Üroepitelyum (ürotelyum), üriner sistemde lümen ile mesane kas dokusu arasında bulunur. Ürotelyumun süperfisyal bölümü, üroplakinler ile çevrilmiş, birbirine sıkıca bağlı büyük hekzagonal şemsiye hücrelerinden oluşur. Altta intermediate hücre tabakası ve bazal membran ile bağlantılı bazal hücre tabakası bulunur. Ürotelyum ve kas tabakası arasında bulunan bölge subürotelyum olarak adlandırılır. Subürotelyum, kan damarları, sinir ve fibroblastlardan (myofibroblast veya interstisyel hücreleri içerir) zengindir ve kollajen matriks içindedir. Ürotelyum ve subürotelyum birlikte submukoza olarak da adlandırılır (83).

Ürotelyal ve subürotelyal interstisyel hücrelerde çeşitli reseptör/iyon kanalları tanımlanmıştır. Bunlar; pürin (iyonotropik P2X, metabotropik P2Y), adenosin, katekolamin (α , β), asetilkolin (muskarinik, nikotinik), nörotrofin (p75, trkA, EGF ailesi ErbB1-3), büyüme faktörleri (vasküler endotelial büyüme faktörü-VEGF) reseptörleri yanısıra, farklı TRP (Transient receptor potential) kanalları (örneğin lokal pH değişikliğine yanıt verebilirler), amilorid- ve mekanosensitif-epitelyal Na^+ kanalları (ENaC) ve aldosteron reseptörleridir (84-91). Bu

reseptör ve iyon kanallarının varlığı, ürotelyumun çeşitli kaynaklardan gelen strese yanıt verebilir olmasını sağlar. Luminal içeriği kas tabakalarından ayıran pasif bariyer fonksiyonunun yanısıra, ürotelyum ve subürotelyumun fonksiyonel bir iletim birimi olduğu düşünülmektedir (83).

İnsan ve çeşitli türlerde mesane mukozasından, düz kas kasılması üzerine inhibitör etkili nitrik oksit (NO) ve adenin nükleotidlerini içeren çeşitli maddeler salınır. Ancak bu maddelerin mesane kasılmasının kontrolünde oynadıkları fizyolojik veya patofizyolojik rolleri ile ilgili net bir bilgi bulunmamaktadır. Çeşitli türlerde yapılan detrusor kas organ banyosu çalışmalarında, mukoza tabakasının cerrahi olarak çıkarılması, çeşitli agonistlere kasılma cevabının artmasına neden olur. Bu da mukozanın yapısal olarak salıverdiği maddelerle kas kasılmasını inhibe ettiğini; uygulanan agonistleri metabolize veya inaktive ettiğini; agonistin kasa diffüzyonu ve penetrasyonuna karşı bariyer görevi gördüğünü; veya agoniste cevap olarak kas kasılmasını azaltan maddeler salıverdiğini düşündürmektedir (92). Sıçan detrusor kas preparatlarında mukozanın çıkarılması, kolinerjik agonist CCh'e kasılma yanıtlarının artmasına neden olmuş ancak elektriksel alan stimülasyonuna (EFS) yanıt değişmemiştir (93). Ürotelyumu sağlam olan sıçan detrusor kas striplerinin, ATP ile inkübasyonundan sonra CCh kasılma yanıtlarının arttığı, ürotelyumu hasarlanmış striplerde kasılma yanıtlarının daha da fazla arttığı gözlenmiştir. Bu da bu süreçte pürinerjik reseptörlerin rolü olduğunu göstermektedir (94).

Köpek mesane gövdesi preparatlarında mukoza çıkarıldığında, NK-1, NK-2 ve NK-3 reseptör agonistleri, P maddesi, nörokinin A ve nörokinin B tarafından uyarılan kasılmalarda artış gözlenmiştir (95). Mukozası çıkarılan domuz mesane striplerinde gözlenen CCh kasılma yanıtlarındaki artış, bu stripler mukozası sağlam striple birlikte inkübe edildiğinde inhibe olmuş ancak hasarlanmış striple inkübe edildiğinde bu inhibisyon görülmemiştir. Bu da diffüze olan faktörün inhibitör etkiye neden olduğunu düşündürür. Domuz mukozasının inhibitör etkisini; NO sentazın, L-NOARG (L-NG-nitroarginine) veya metilen mavisiyle ile, siklooksijenaz (COX)'ın indometazin ile, pürinerjik reseptörlerin suramin ile, beta adrenerjik reseptörlerin propranolol ile, potasyum kanallarının tetraetilamonyum veya apamin ile inhibe edilmesi geriye döndürmemiştir (54). Kanser sistektomi örneklerinden alınan insan mesane striplerinde, mukozanın çıkarılması CCh ve EFS kasılma yanıtlarında artışa neden olurken

nörokinin A veya KCl ile membran depolarizasyonunda artış görülmemiştir. Benzer şekilde mukozanın inhibitör etkisini, L-NOARG ile NO sentaz inhibisyonu, ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one) ile solubl guanilat siklaz (GS) inhibisyonu, propranolol ile beta adrenerjik reseptör inhibisyonu veya indometazin ile COX inhibisyonu geriye döndürmemiştir (96). Sonuç olarak ürotelyumdan kaynaklanan inhibisyon, bilinen inhibitör yollardan etkilenmemiştir. Mukozal muskarinik reseptörlerin detrusor kasılmasının modülasyonundaki rolü araştırılmış ve mukozası sağlam insan mesane striplerinde, mukozal M₃ reseptör dansitesi ve CCh maksimal kasılma yanıtları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bu sonuçlar mukozal M₃ reseptörlerinin, kontraktıl agonist salıverilmesini indüklediğini veya inhibitör ajan salıverilmesini baskıladığını düşündürmüştür (97).

4.2. Diyabetes Mellitus

4.2.1. Epidemiyoloji

Dünya popülasyonunun yaşlandığı günümüzde diyabet, hipertansiyon, kanser gibi kronik hastalıkların sıklığının giderek arttığı bilinmektedir. DM tüm dünyada en sık rastlanan endokrin hastalıktır. Günümüzde Amerikan Diyabet Birliğine göre Amerika’da DM hastası 25.8 milyon yetişkin ve çocuk bulunmaktadır. Bu popülasyonun henüz 7 milyonu tanı almamıştır. Buna ek olarak 79 milyon prediyabetik hasta vardır (98). Bu sayılar DM’un epidemik hale geldiğini göstermektedir. Diyabetik işeme disfonksiyonu, diyabetik hastaların %80’inde görülürken (1); nöropati ve nefropati, sırasıyla %60 ve %50 hastada görülmektedir. Buna rağmen bu hastalığın gelişim süreci ve ürolojik komplikasyonların başlangıcı ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Bu bilgi yetersizliği bu popülasyondaki yeni ve etkili korunma ve/veya tedavi seçeneklerinin gelişimini kısıtlamaktadır (2).

4.2.2. Komplikasyonları

DM, insülin sekresyonunda, insülin etkisinde veya her ikisinde bozukluk sonucu karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluğa bağlı olarak gelişen kronik hiperglisemi ile karakterize bir metabolik hastalıktır. Diyabet kronik bir hastalık olduğu için akut ya da kronik dönemde gelişebilecek komplikasyonlar hastalığın seyri, tedavisi ve prognozu açısından önem taşımaktadır. Diyabetik ketoasidoz, hiperosmolar nonketotik koma, hipoglisemi ve laktik asidoz gibi akut komplikasyonlarının yanı sıra nöropati, nefropati,

retinopati gibi mikrovasküler komplikasyonlar ve koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık, periferik arter hastalığı gibi makrovasküler komplikasyonları ve kardiyomyopati gibi kalp yetmezliğine giden kronik komplikasyonları olduğu bilinmektedir (99). Diyabetin kronik komplikasyonlarının gelişmesinde genetik, hiperglisemi, obezite, dislipidemi, hiperinsülinemi ve insülin direnci gibi faktörler rol oynamaktadır (100).

4.3. Hayvan Modelleri

4.3.1. Tip I Diyabetes Mellitus Hayvan Modelleri

Hiperglisemiye neden olan pankreatik β hücrelerinin kimyasal destrüksiyonu, tip I DM hayvan modeli oluşturmak için kabul görmüş bir tekniktir (101). Kemirgen modellerinde tip I DM oluşturmak için streptozotosin (STZ) ve alloxan sıklıkla kullanılmaktadır. STZ, glukoz transportunu engelleyen alkilliyici bir ajandır. STZ'nin tek doz enjeksiyonu, pankreatik β hücrelerinde kalıcı hasara neden olarak hipoinsülinemi, hiperglisemi ve diyabetik komplikasyonların gelişmesine neden olur (101, 102). Genetik olarak indüklenen tip I DM fare modelleri de yaygın olarak kullanılmaktadır; Akita fare ve BioBreeding sıçan bu modellere örnektir (103).

4.3.2. Tip II Diyabetes Mellitus Hayvan Modelleri

Tip II DM'un multifaktöriyel orjini göz önünde bulundurulduğunda, çeşitli monogenik ve poligenik fare modelleri başarıyla geliştirilmiştir. Leptin eksikliği veya reseptör mutasyonundan kaynaklanan monogenik modeller, kontrolsüz iştah ve obezitenin yol açtığı tip II diyabet gelişimi ile sonuçlanır (2). Genel olarak poligenik modeller, insandaki patojenik yolları ve klinik yansımalarını daha iyi temsil eder. Yeni Zelanda obez fare poligenik modele örnektir (101).

Spontan diyabetik Torii sıçanı, Sprague–Dawley sıçanının çiftleştirilmesiyle elde edilmiş; erkek sıçanlarda, 20 haftada obezite olmadan tip II DM geliştiği bulunmuştur (104). Benzer olarak Wistar sıçanların selektif çiftleştirilmesiyle Goto-Kakizaki sıçanlar elde edilmiştir; bu sıçanlarda dört haftada DM gelişmektedir. Bu model insanlardaki tip II DM'a çok benzemektedir (105).

4.3.3. Mesane Disfonksiyonu Modeli

İnsanlarda diyabetik işeme disfonksiyonunun doğası ve progresyonu, deneysel çalışmalar için etkilenen doku ve organlara erişilmesi henüz mümkün olmadığı için çalışılmamaktadır. Ek olarak DM'un ve ürolojik komplikasyonlarının doğal gelişimi yıllar almaktadır ve sıklıkla bu kadar uzun süre çalışma yürütmek zordur. Bu nedenle güvenilir hayvan modellerine ihtiyaç vardır. Ayrıca hastalığın doğal gelişim süreci, hayvan ömrünün daha kısa olması, daha hızlı veri toplanması ve maliyetinin düşük olması nedeniyle büyük oranda çalışma süresini kısaltmaktadır (2).

Hem küçük (kemirgen vb) ve hem de büyük (domuz, tavşan, maymun vb) hayvan modellerinde çalışılmaktadır. Büyük hayvanlar, insana fenotipik olarak daha fazla benzemekle birlikte, DM'un başlama ve komplikasyonların gelişim süreci daha uzun sürede olmakta ve bu hayvanların yetiştirilme maliyetleri daha pahalı olmaktadır. Dolayısıyla kemirgen modelleri daha büyük önem kazanmaktadır (2).

4.4. Diyabetes Mellitus'ta Mesane Disfonksiyonu

Diyabetik hastaların hem işeme hem de boşalma semptomlarından yakındığı bilinmektedir. Kaplan ve ark. (1995) yaptıkları kohort çalışmada, diyabetik hastalarda en sık semptomların gece idrara çıkma (%87) ve sık idrara çıkma (%78) olduğunu; idrara başlarken zorlanma (%62), idrar akımının azalması (%52) ve tam olmayan mesane boşalması (%45) gibi klasik semptomların da yaygın olarak görüldüğünü bildirmişlerdir (106). Aynı çalışmada en sık görülen ürodinamik bulgunun, detrusor aşırı aktivitesi (%48) olduğunu; bunu bozulmuş detrusor kontraktilitesi (%30) ve bozulmuş kompliyansın (%15) izlediğini bildirmişlerdir (106). Aşırı aktif mesane, işeme siklusunun dolum fazında istemsiz detrusor kontraksiyonlarından kaynaklanır; inkontinansla birlikte olan ya da inkontinans olmadan, çoğunlukla idrara çıkma sıklığında artış ve gece idrara çıkma ile klinik verir (107). Klinik kohort çalışmalarda, diyabet ve periferik nöropati gelişiminin süresi ile, boşalma verimliliğinde azalma ve idrar inkontinansının görülme insidansı arasında zamana bağımlı korelasyon gösterilmiş olmasına rağmen; aşırı aktif mesaneden, boşalma yetersizliğine ilerleme süresi ile diyabetin süresi arasında korelasyon gösterilememiştir (108, 109).

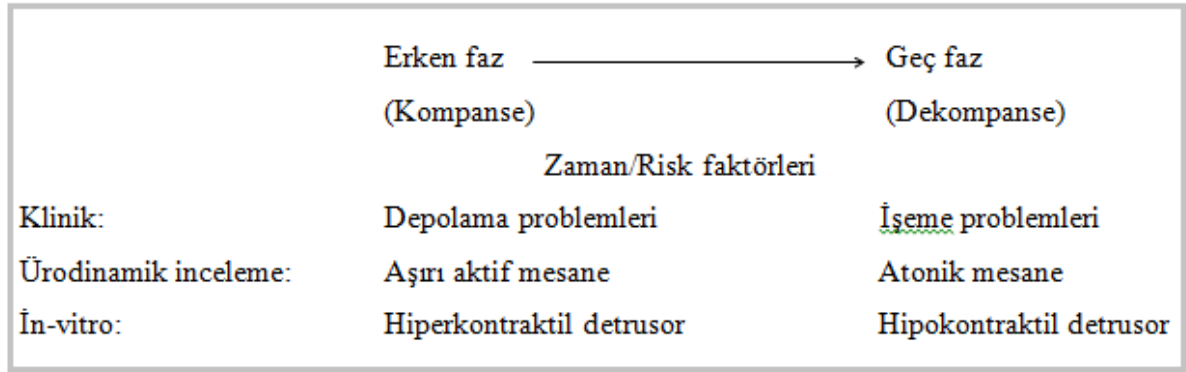
4.4.1. Patogenez

Diyabetin en sık görülen komplikasyonlarından biri olan mesane disfonksiyonu, yıllardır mesane duyumunun erken kaybı (110) ile diyabetik nöropatinin (111, 112) yansıması olarak kabul edilmiştir. Mesanenin dolu olduğunda ve fazla genişlediğinde bu duyumu algılayamadığı, bunun da detrusor kasılmasının bozulmasına ve mesane atonisine neden olduğu düşünülmekte idi (113). Ancak bugünlerde çoğu araştırmacı, diyabetik sistopatinin olasılıkla son dönem mesane yetmezliğini temsil ettiğini düşünmektedir. İlginç olarak diyabete bağlı gelişen mesane disfonksiyonu erken dönemde detrusor aşırı aktivitesi şeklinde ortaya çıkabilir. Bu patolojinin periferik nöropatili hastalarda en sık bildirilen ürodinamik bulgu olduğu, hastaların %70'inde detrusor aşırı aktivitesi görüldüğü bilinmektedir (106).

Diyabete bağlı mesane disfonksiyonunun patogenezi multifaktöriyeldir. Detrusor kas fizyolojisinde değişiklikler, nöronal hasar ve ürotelyal disfonksiyon patogeneze katkıda bulunan faktörlerdir (2, 114).

Temporal hipotez

Diyabete bağlı mesane disfonksiyonunun patogenezinde ileri sürülen hipotez 'diyabete bağlı mesane disfonksiyonunun zamana bağımlı (temporal) teorisi'dir. STZ ile indüklenen diyabetik hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, diyabete bağlı mesane disfonksiyonunun doğal seyri izlendiğinde, morfolojik ve fonksiyonel yansımalarının, zamana bağımlı olarak geliştiği gözlenmiştir (3). DM'un mesanede yol açtığı zamana bağımlı değişiklikler, iki ana mekanizma yoluyla iki fazda değerlendirilmiştir (Şekil 6). Diyabetin erken dönemlerinde hiperglisemi, myojenik ve nörojenik değişikliklere ayrıca indüklediği poliüri aracılığıyla da kompensatuvar mesane hipertrofisine neden olur (115-117). Bu dönemde hastalar, depolama problemlerinden (sıkışma veya sıkışma tipi idrar kaçırma) yakını, ürodinamik değerlendirme hiperaktif mesane bulguları ile uyumludur. Geç fazda, uzamış hiperglisemi sırasında oksidatif stres ürünlerinin birikimi, mesane dokusu ve fonksiyonunda dekompanzasyona yol açar (19, 118). Hastalar işeme problemleri ile birlikte, diyabetik sistopatinin (hipokontraktil detrusor veya atonik mesane) klasik klinik belirti ve bulgularını gösterir (3). Bu teori hayvan modellerinde gösterilmiştir. Ancak insanlarda yapılan klinik çalışmalarda bu teoriyi destekleyen kanıt yoktur (2).



Şekil 6. DM progresyonunun mesane disfonksiyonunun seyrine etkisi (Temporal hipotez)
(3 nolu kaynaktan alınmıştır)

4.4.1.a. Detrusor Düz Kas Disfonksiyonu

Detrusor kasın fizyolojisi, hücrelerarası bağlantılar, uyarılabilirlik, reseptör dansitesi ve dağılımı, hücre içi sinyal mekanizmaları ve genetik gibi farklı mekanizmalardan etkilenmektedir (114). Bununla birlikte bu değişikliklerin oluş zamanı ve etkideki rolleri hala tartışmalıdır.

Mesane striplerinde yapılan farmakolojik çalışmalarda, hayvan modellerinden farklı olarak kafa karışıklığı yaratan bulgular vardır (2). Bazı araştırmacılar tarafından diyabetik mesane striplerinde, dışarıdan uygulanan muskarinik agonistlere yanıtın arttığı ve muskarinik reseptör dansitesinde artış olduğu gösterilirken; muskarinik kolinerjik iletinin azaldığını veya değişmediğini gösteren yayınlar da bulunmaktadır (119). Diyabette detrusor kasın muskarinik agonistlere yanıtının artması; muskarinik reseptör dansitesindeki artışa (12) ya da düz kasın kalsiyuma duyarlılığının artmış (13) olmasına bağlı olabilir. Kalsiyum duyarlılığındaki artış, diyabetik mesanede CCh, K^+ ve EFS'na artmış cevabı açıklayabilir (13).

Mesane patolojilerinde, detrusor düz kas hücreleri ve ürotelyumdaki muskarinik reseptörler ve ayrıca aferent sinirlerdeki presinaptik yerleşimli muskarinik reseptör tipleri değişmektedir (46). Pontari ve ark. (2004), mesanede M_2 reseptörlerinin, kasılma yanıtına olan katkısının nörojenik mesane disfonksiyonu gibi hastalık durumlarında daha önemli hale geldiğini öne sürmüşlerdir (120). Stevens ve ark. (2007) ise araştırmalarında tersini bulmuşlardır; insanda idiyopatik ve nörojenik aşırı aktif mesanede, muskarinik reseptör aracılı kasılmanın kontrole

göre arttığını, ancak reseptör alt tipinin değişmediğini, CCh aracılı kasılma yanıtının normal ve aşırı aktif mesanede M_3 reseptörü ile olduğunu bildirmişlerdir (121).

STZ ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde muskarinik uyarıya mesane duyarlılığı ve maksimum kasılma yanıtları artmaktadır. Diyabetik sıçanlarda muskarinik reseptör dansitesinin (12, 122) ve IP_3 üretiminin arttığı (123); muskarinik reseptör upregülasyonunun insülin tedavisi ile kısmen geri döndüğü (12) gösterilmiştir. Diyabetik sıçanlarda STZ ile diyabet indüksiyonundan iki hafta sonra, hem detrusor kasta hem de ürotelyumda M_2 ve M_3 reseptör ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir (124-126). Pak ve ark. (2010), STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, erken (2-3 hafta) ve geç (20-24 hafta) dönemde M_2 reseptör fonksiyonunda artış olduğunu bulmuşlardır (127).

EFS'na artmış cevap, tekrarlayan çalışmalarda gösterilmiştir ve bunun membran kompozisyonundaki değişikliklere, artmış nörotransmitter salınımına ve artmış kalsiyum kanalı aktivitesine sekonder olduğu ileri sürülmüştür (114). Diyabetik tavşan modelinde, purinerjik reseptörlerde ve purinerjik transmitterlerde artış olduğu da gösterilmiştir. Ayrıca purinerjik reseptör ekspresyonunun, insülin ile inhibe edildiği bildirilmiştir (128). Başka bir çalışmada sıçanlarda STZ ile diyabet indüksiyonundan 8-10 hafta sonra, izole edilen detrusor düz kasta β_1 reseptör aracılı gevşeme yanıtlarının arttığı bildirilmiştir (129). Diyabetik sıçan düz kasında, nöronal nitrik oksid sentazın upregüle olduğu bulunmuştur. Diyabette en erken değişikliğin ve mesane disfonksiyonunun olası nedeninin de bu olduğu ileri sürülmüştür (130).

Diyabette görülen glukozüri ve ozmotik diürez, mesane geriliminin ve mesane içi basıncının artmasına, bu da mesane hipertrofisine yol açar (1). Ayrıca diyabette artan oksidatif stres, mesane hipertrofisini arttırabilir (131). Dekompanse mesanede, kasılmadaki özellikler, muskarinik reseptör subtiplerinin ekspresyonu ve myosin II izoformlarının kompozisyonu değişmektedir. Ek olarak hipertrofik mesanede, artmış RhoA ve Rho kinaz ekspresyonu, azalmış myozin fosfataz aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (35).

Nobe ve ark. (2009), tip II diyabet ob/ob fare modeli kullandıkları çalışmalarında, hem ob/ob hem de C57BL (kontrol) fare detrusor kas striplerinde, zamana ve doza bağımlı olarak CCh ile indüklenen kasılma yanıtlarının arttığını göstermişlerdir. ob/ob ve C57BL farelerinden elde

edilen striplere, 30 mM CCh uygulandığında maksimal etki (Emax) anlamlı olarak farklı bulunmuş; ob/ob farelerinde iki kat yüksek olan kan glukoz düzeyleri ile korele olarak daha fazla arttığı gösterilmiştir. Ek olarak düz kas stripleri yüksek glukoz koşulları altında inkübe edildiğinde, sadece diyabetik farede CCh kasılma yanıtlarındaki artışın, intrasellüler kalsiyum konsantrasyonu ile korele olduğu gözlenmiş ve kontraksiyon artışı ob/ob faresinde diyabet ile indüklenen “kalsiyum sensitizasyonu”nu akla getirmiştir. Kontraksiyon artışı, Rho kinaz inhibitörü fasudil ile inhibe edilmiş, fasudil ayrıca yüksek glukoz koşulları altında ob/ob ve C57BL farede görülen detrusor kontraksiyonları arasındaki farkı da düzeltmiştir (132).

Normalde soğuk, mesanede düz kas tonusunu arttırarak, miksiyon için güçlü bir uyarı oluşturur. Ismael ve ark. (2010), diyabetik sıçan mesane kası striplerinde, ısıyı 37°C’den 5°C’e kadar adım adım düşürdüklerinde, kontrol grubuna göre soğutma hızı ile orantılı olarak hızlı ve tekrar eden bazal tonus artışı olduğunu ve bu artışın diyabetik sıçanların striplerinde daha belirgin olduğunu göstermişlerdir. Rho kinaz inhibitörü Y-27632 (1 mM), 20°C ısıda indüklenen kontraksiyonları kontrol grubunda %52, diyabet grubunda %70 inhibe etmiştir (133).

Diyabetik hayvanların mesane dışı çeşitli dokularında Rho/Rho kinaz sinyalinin arttığı bilinmektedir (11, 134-136). Mesane ile ilgili olarak da Chang ve ark. (2006), iki boyutlu jel elektroforez kullanarak, bazal MLC fosforilasyon düzeyinin, alloxan ile indüklenen tip I diyabetik tavşanların detrusor kaslarında, normal ve diüretik kontrollerine göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu ve Rho kinaz inhibitörü Y-27632’nin MLC fosforilasyon düzeyini düşürdüğünü göstermişlerdir. Aynı çalışmada betanekol ile kastırılan detrusor düz kas striplerine Y-27632 eklenmesi kas gevşemesine neden olmuş ancak gevşeme yanıtı diyabetik hayvanlarda kontrol grubuna göre daha yavaş gerçekleşmiştir. Bu bulgular Rho kinase β (ROCK β) izoformunun mRNA ve protein ekspresyonu düzeylerinin sırası ile 10 ve 2 kat artışı ile korele bulunmuştur (17).

4.4.1.b. Detrusor Kasta Oksidatif Stres

Diyabetik komplikasyonların gelişiminde, oksidatif stresin önemi birçok organda gösterilmiştir (137-139). Fizyolojik koşullar altında, antioksidan enzimleri içeren antioksidan koruma mekanizmaları, ROS’ni kontrol altında tutar. Diyabette oksidatif stres, glukozun oto-oksidasyonu sonucu oksijen radikallerinin üretimi (137), glikozillenmiş proteinler (139),

sitokrom P450 benzeri aktivitenin uyarılması, aşırı glukozun polyol yoluna girmesiyle NADPH/NADP oranındaki değişimler (140), süperoksit dismutaz üretiminin artışı (141) ve lipid peroksidasyon üretiminin artışı (142) gibi çok çeşitli mekanizmalardan kaynaklanabilir. Göz, santral sinir sistemi, böbrek ve kardiyovasküler sistemde, diyabet komplikasyonlarının patogenezinde oksidatif stresin rolü ile ilgili pek çok çalışma olmasına rağmen mesane komplikasyonlarının gelişiminde oksidatif stresin direk etkisi hala detaylı araştırılmamıştır (143). Diyabetin ürolojik komplikasyonlarının patogenezinde oksidatif stresin öneminin araştırıldığı, erektil disfonksiyon (144-147) ve sistopati (148) alanında birkaç çalışma bulunmaktadır. Changolkar ve arkadaşlarının çalışmasında (2005), alloksan ile indüklenen diyabetik tavşan modelinde, detrusor kas kontraktilitesinin azalması ile lipid peroksidasyon ürünlerinin ve aldoz redüktaz ekspresyonunun artışı ilişkilendirilmiştir. Ayrıca aldoz redüktaz ekspresyonundaki artışın, artmış glukozun polyol yoluna girmesine ve sorbitol üretiminin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (149). İnsan detrusor kas hücrelerinin yüksek glukoz maruz bırakılması ile bu hücrelerde aldoz redüktaz ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (143). Yüksek glukoz koşullarında büyüyen bu hücreler, aldoz redüktaz inhibitörü zopolrestata maruz bırakıldığında, aldoz redüktaz ekspresyonundaki artış geriye dönmüştür (143).

Hipergliseminin ROS aracılı oksidatif strese neden olduğu ve bunun da diyabetik komplikasyonların patogenezinde rol oynadığı uzun yıllardır bilinmektedir (150). Tüm hücrelerde süperoksit, peroksinitrit ve hidroksil radikallerinin majör kaynağı mitokondridir (151). Mitokondriyal süperoksit üretiminin, diyabetik komplikasyonlar için tek birleştirici mekanizma olduğu düşünülmektedir (152). ROS, mitokondriden sitokrom c salınımına neden olmaktadır (153). Ek olarak lipid peroksidasyonu, mitokondriyal membran potansiyelini bozarak apoptozisi uyarmaktadır (154). İnsan mesane düz kas hücre kültüründe, ortama uygulanan yüksek glukozun, mitokondriyal membran potansiyelini ve ROS'ni arttırdığı ve bunun da daha önce bildirilen çalışmalar ile uyumlu olarak diyabetik komplikasyonlarda mitokondriyal disfonksiyonun anahtar rol oynadığını gösterdiği ileri sürülmüştür (143).

Li ve ark. (2010), oksidatif stres koşullarında aktive olan ve apoptoziste önemli rol oynayan poli(ADP-riboz) polimerazın (PARP), diyabetik sistopatideki rolünü araştırdıkları çalışmada, STZ ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde 3-aminobenzamide (PARP inhibitörü) tedavisi verilen ve verilmeyen gruplarda, PARP aktivasyonu, sonrasında c-Jun N-terminal kinase

(JNK) aktivasyonu ve mitokondriyal apoptotik yolağı değerlendirmişlerdir. Diyabetik sistopati gelişiminde, PARP/JNK/mitokondriyal apoptotik yolağın aktivasyonu ile oluşan apoptozisin rolü olduğu gösterilmiştir (155). Beshay ve ark. (2004), diyabetik sistopatide oksidatif stresin ve buna bağlı olarak apoptozisin rolünü araştırdıkları çalışmalarında; diyabetik grupta oksidatif stresin arttığını (katalaz aktivitesinde anlamlı azalma ve tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin düzeyinde anlamlı artma) ve diyabetik mesane düz kas hücrelerinde apoptotik hücrelerin sayılarında anlamlı bir artış gözlemlendiğini bildirmişlerdir (148). Bu çalışmada sükroz içirilerek diürezisin arttırıldığı hayvan grubunda ise farklılık bulunmadığı ve STZ ile indüklenen diyabetik sıçan mesanelerinde diyabetik sistopati gelişiminde, düz kas hücrelerinde görülen oksidatif hasarın ve apoptozisin katkısının olabileceğini ancak diürezin rolünün olmadığı bildirmişlerdir (148). Benzer olarak diyabetik sistopati gelişiminde oksidatif stresin rolünü araştıran başka bir çalışmada, diyabetik sistopati düz kas hücrelerinde oksidatif hasar ile ilişkilendirilmiş, bunun da protein hasarına ve apoptotik yolağın aktivasyonuna neden olarak mesane fonksiyonunda bozulmaya katkıda bulunduğu bildirilmiştir (156).

Diyabete bağlı komplikasyonlarda oksidatif stresin rolünün gösterilmesi, antioksidan ilaçlar ile tedaviyi düşündürmüştür. Bununla ilgili pek çok antioksidanın denendiği pek çok çalışma bulunmaktadır. Diyabetik sistopatiji önlemek için de birtakım antioksidanların denendiği çalışmalar görülmektedir. STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, E vitamini tedavisinin, diyabete bağlı mesane disfonksiyonu üzerine koruyucu etkisi olup olmadığı, oksidatif stres ve apoptozis ilişkisi üzerinden değerlendirilmiş ve E vitamininin apoptozisi azalttığı, diyabetik mesanede ürotelyal hücreler için koruyucu olabileceği bildirilmiştir (157). Diyabetik sıçanlarda alfa-lipoik asit tedavisinin, oksidatif stresi önleyerek ve mesanede sinir büyüme faktörü (NGF, nerve growth factor) düzeylerini normale getirerek diyabetik sistopati üzerine yararlı etkileri olabileceği ileri sürülmüştür (158).

4.4.1.c. Nöronal Disfonksiyon

Hiperglisemi, toksik etkisini nöronal hasar ile gösterebilir. Bu aktivasyon için olası mekanizma, sorbitol ve fruktoz birikimi ile sonuçlanan polyol yolağı olabilir. Böylece serbest radikal üretimi artar, protein kinaz C (PKC) aktive olur ve ileri glikozillenmiş son ürün formasyonu artar (159). Bu metabolik düzensizlikler, aksonal dejenerasyon, sinir iletiminin bozulması, sonunda da idrar hissinin azalması ile kendini gösterir. Diyabetik hastaların mesane biyopsi örneklerindeki, asetilkolinesteraz aktivitesindeki düşme aksonal dejenerasyona bağlı olabilir. Lee ve ark. (2009), diyabetik hastalarda mesane içi akım eşiğini ölçtüklerinde, A δ ve C liflerinde duyusal cevabın azaldığını bulmuşlardır. Aynı zamanda aksonal transporttaki özellikle de NGF'ndeki bozukluk da diyabetik nöropati ve sistopati mekanizmalarından biri olarak ileri sürülmüştür (160). Diyabetik sıçanlarda STZ enjeksiyonundan sonra, mesane, L6–S1 arka kök gangliyonu ve siyatik sinirdeki NGF düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır. NGF düzeylerindeki azalma ayrıca artmış mesane kapasitesi ve işeme sonrası kalan idrar ile de ilişkili bulunmuştur (161, 162). STZ ile indüklenen sıçanların mesane duvarına, NGF eksprese eden herpes simplex virüs vektörlerinin enjeksiyonu yoluyla yapılan gen tedavisi, kontrol grubuna göre diyabetik grupta NGF düzeylerinde artış ve bazı klinik bulgulara kısmen de olsa geriye dönüş sağlamıştır (163). Diyabetik sıçanlarda N-heksakosanol (nörotrofik) enjeksiyonunun, M₂ ve M₃ mRNA overekspresyonlarını azaltarak, detrusor hiperaktivitesi üzerine olumlu etkisinin olduğu gösterilmiştir (164).

Bu bulgular nöronal disfonksiyonu, diyabetik sistopatinin önemli bir mekanizması yaparken, aşırı aktif mesane ve sıkışma tipi idrar kaçırma gibi sık görülen klinik bulguları açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Yamaguchi ve arkadaşlarının (2008) çalışmasında, diyabetik hastalarda aşırı aktif mesaneye, çoklu serebral infarktlara sekonder gelişen diyabetik vaskülopatinin neden olduğu ileri sürülmüştür (165). Bu çalışmada diyabetik hastalarda, idrara çıkma sıklığında artma ve gece idrara çıkma sırasında, manyetik rezonans görüntüleme ile anormal görüntüler elde edilmiş ancak istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır. Diğer yandan hastada diyabete ek olarak başka klinik durumların varlığının (serebrovasküler olaylar veya benign prostat hiperplazi gibi), aşırı aktif mesane semptomlarına katkıda bulunmuş olabileceği tartışılmıştır (165).

4.4.1.d. Ürotelyal Disfonksiyon

Ürotelyumun mesanede sadece pasif bir bariyer olmadığı, mesanenin fonksiyon ve disfonksiyonunda aktif rolü olduğu giderek daha açık hale gelmiştir. Ürotelyum NO, ATP ve PG'lerin salınımı aracılığıyla subürotelyal afferentlerle doğrudan iletişim kurar (2). Ürotelyumda ayrıca vanilloid reseptör-1 reseptörleri vardır ve ATP tarafından potansiyalize edilir (114). Diyabetik sıçan modellerinde zamana bağlı olarak ürotelyum kalınlığının arttığı gösterilmiştir. Diyabetik sıçanlarda, doku ağırlığına düşen endojen prostaglandinler PGE₂ ve PGF_{2α} ekspresyonu artarken, PGF_{3α} ekspresyonu azalmıştır. Bu prostaglandinlerin salınımı, duysal sinirleri duyarlaştırır, ayrıca diyabetik hastalarda görülen aşırı aktif mesane semptomlarında da payı vardır (114, 166). Bu bulgular ürotelyumun aşırı aktif mesane semptomlarında rolünün olduğunu göstermektedir, ancak derecesi ve ilişkisi net değildir (2).

Ürotelyumda Rho kinazın da bulunduğu gösterilmiştir. Nakanishi ve ark. (2009), domuzda RhoA mRNA ve aktive olmuş RhoA enzimi düzeylerinin, mesane düz kası ile karşılaştırıldığında ürotelyumda daha yüksek olduğunu (sırası ile iki ve dört kat) bulmuşlardır. Ayrıca CCh ile kastırılan dokularda Rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin, ürotelyumu sağlam striplerde, ürotelyumu hasarlanmış striplerle karşılaştırıldığında daha fazla inhibisyon yaptığı görülmüş (167). Tatsumiya ve arkadaşlarının (2009) domuzda yaptıkları benzer bir çalışmada, ürotelyumu sağlam olan ve ürotelyumu olmayan striplerde, Rho kinaz inhibitörü fasudil, düşük konsantrasyonlarda (1 veya 10 mmol/L) CCh aracılı kasılmaları neredeyse aynı oranda inhibe ederken; yüksek konsantrasyonda (30 mmol/L), ürotelyumu sağlam olan dokularda, ürotelyumu olmayan dokularla karşılaştırıldığında kasılma yanıtlarının iki kat daha düşük olduğu bulunmuştur. Bunun sonucunda, ürotelyumun Rho/Rho kinaz yolağı aracılığıyla mesanede CCh aracılı kasılmasının düzenlenmesinde rolünün olabileceği ileri sürülmüştür (168).

4.5. Mesane Disfonksiyonunda Tedavi

Medikal tedavi

Diyabet komplikasyonları epidemiyolojisi çalışması (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications, EDIC) sonuçlarında (2005), yoğun insülin tedavisi ile kan şekerinin kontrolünün bu hastalarda kardiyovasküler hastalıkların riskini %42 ve kalp krizi, inme veya kardiyovasküler olaylara bağlı ölüm riskini %57 oranında düşürdüğü bulunmuştur. Diyabetik

mesane komplikasyonlarında da sistopati bulgularını düzelttiği bildirilmektedir. Ancak insülin tedavisi sırasında hipoglisemi atakları başta olmak üzere hipoglisemiye bağlı çeşitli aritmiler, kilo kaybı, hepatomegali gibi yan etkiler gözlenebilmektedir (169). Birçok inceleme yeterli dozda insülin ile tedavi edilen hastalarda ortalama iki haftada bir, minör semptomatik hipoglisemi epizodlarının meydana geldiğini, bilinç kaybı gösteren hipoglisemi komasının ise dört veya beş hastadan birinde yılda ortalama bir kez ortaya çıktığını göstermiştir. %10 hastanın yılda bir kez ve %3 hastada da tekrarlayan ataklarla karşılaştığı ciddi hipoglisemidir (170-172). İnsüline bağımlı diyabetlilerde bütün ölümlerin %3-5'inin hipoglisemi komasına bağlı olduğu bildirilmiştir. Tip I diyabetlilerde hipoglisemi, insülin dozu ile besin ve egzersiz arasındaki dengesizlikten ileri gelir. Ayrıca insülin absorpsiyonunun bir günden diğerine değişiklik göstermesi, kişinin alkol alışkanlığı ve karaciğer hastalığı da hipoglisemi gelişmesine katkıda bulunur. İnsan insülini kullanımı, alerjik reaksiyonların ortaya çıkışını azaltmış olmakla birlikte, bazı çalışmalarda hayvan insülininden insan insülinine geçilmesinin, ikaz edici belirtileri azaltması nedeniyle hipoglisemi insidensini arttırdığı bildirilmektedir (169).

Diyabetik hastalarda aşırı aktif mesane ve alt üriner sistem semptomlarının tedavisi, diyabetik olmayan hastalardakinden biraz farklı olmalıdır. İdrar sıkıştırması, idrara çıkma sıklığında artma, gece idrara çıkma semptomlarının olduğu hastalarda, antimuskarinik tedavi yararlı olabilir. Streptozotosinle indüklenen diyabetik sıçan modelinde, artmış muskarinik reseptör ekspresyonunun gösterilmiş olması, diyabetik hastalarda işeme semptomlarını antimuskarinik tedavi ile iyileştirmek için destekleyici bir kanıttır (119). Ancak bu ajanların kullanımını destekleyen klinik veriler yetersizdir.

Beta reseptör antagonistlerinin mesane disfonksiyonunun tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir. İnsanda detrusor gevşemesinin başlıca β_3 reseptör aracılı olması ve β_3 'ün kardiyovasküler sistemde sınırlı fonksiyonunun bulunması, selektif β_3 agonistlerin prelinik ve klinik araştırmalara girmesini sağlamıştır. Terbutalin (173) ve klenbuterol (174) ile umut verici yanıtlar alınmaktadır (56).

Konservatif Tedavi

İşeme programlarının, azalmış mesane duyusu ve artmış işeme sonrası rezidüsü olan hastalarda yararlı olduğu gösterilmiştir. Bu programa bağlı kalmak, yeterli mesane boşalması sağlayarak, idrara çıkma sıklığının ve gece idrara çıkmanın azalmasını sağlayabilir (175). Detrusor kasının kontraktilesinde ciddi yetersizlik ve işeme zorluğu olan hastalarda, her 4-6 saatte bir kateterizasyon yapılmasının, renal fonksiyonlarındaki bozulmaya karşı koruyucu olduğu da bildirilmiştir (175).

Cerrahi Tedavi

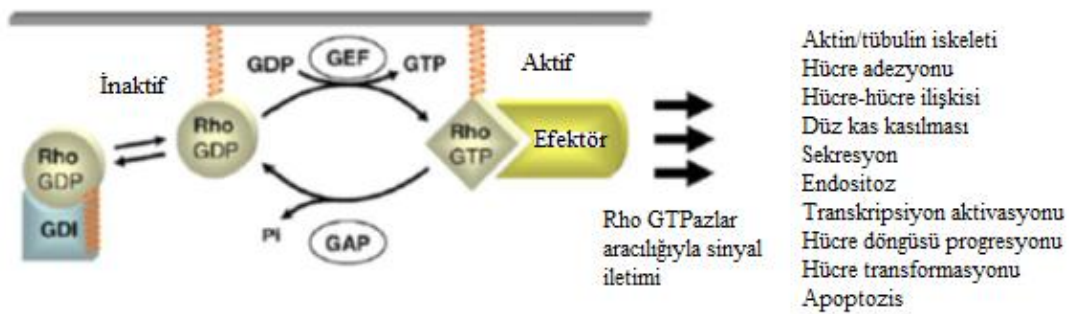
İşeme güçlüğü, refrakter aşırı aktif mesane semptomları ve obstruktif olmayan retansiyonu olan hastalarda sakral nöromodulasyon umut verici bir tedavidir. Daniels ve arkadaşlarının (2010) çalışmasında, diyabetik hastalarda ve aynı yaştaki kontrol hastalarında, sakral nöromodülasyonun etkinliği karşılaştırılmış ve iki grup arasında uzun dönem başarı oranları ve iyileşme memnuniyeti açısından anlamlı fark bulunmamıştır (176). Dünya çapındaki bir klinik çalışmada diyabetik hastalarda, beş yıllık izlemde sıkışma tipi idrar kaçırma, idrar sıkıştırması/idrara çıkma sıklığında artış ve üriner retansiyon semptomlarında, sırasıyla %68, %56 ve %71 iyileşme bildirilmiştir (177). Diyabetik hastaların, diyabetik olmayan kontrol hastalarına göre enfeksiyona sekonder cihaz ekplantasyonu açısından artmış riske sahip oldukları belirtilmiştir (176). Günümüzde diyabetik hastalarda, refrakter aşırı aktif mesane semptomlarının tedavisinde botulinum toksin A kullanımı ile ilgili ileriye yönelik klinik çalışma bulunmamaktadır. Bu popülasyonda enjeksiyondan sonra temiz aralıklı kateterizasyon riski halen değerlendirilmemiştir. Buna rağmen pratikte refrakter aşırı aktif mesaneli diyabetik hastalarda, botulinum toksin A'nın intradetrusor enjeksiyonundan sonra semptomlarda anlamlı düzelme görülmüştür (2).

4.6. Küçük GTPaz Ailesi

Küçük GTPaz'lar, 20-40 kDa'lık monomerik, G proteinlerinin α alt birimleri ile benzer işlevleri olan, guanin nükleotidi bağlayan proteinlerdir. Hem GDP/GTP bağlama, hem de GTPaz aktiviteleri olduğu için "küçük G proteini" olarak da adlandırılırlar. Küçük GTPaz'lar sentezlendikten sonra posttranslasyonel modifikasyona uğrarlar, C-terminal uçlarına farnezil, geranilgeranil, palmitoil gibi lipid yapılar eklenir (178).

GTP ile kompleks yaptıkları formda, sinyal iletiminde aktif, GDP ile kompleks yaptıkları formda inaktiftirler. Küçük GTPaz'ların aktivasyonu, küçük G proteinine bağlı GDP'nin ayrılması ve onun yerine GTP'nin bağlanmasını uyaran 'guanin nükleotid değişim faktörü' (guanine-nucleotide-exchange factor, GEF) tarafından düzenlenir. Aktive olan küçük GTPaz'ların efektör bağlayan bölgesi, konformasyonel değişikliğe uğrar ve hedeflerine bağlanmaya, onların aktivasyonunu sağlamaya uygun hale gelir. Alfa subünitindeki GTPaz enziminin, aktive GTP'yi hidrolize etmek için intrinsek kapasiteleri vardır ancak bu aktivitesi düşüktür, 'GTPaz aktive eden protein' (GTPase-activating protein, GAP)'lerin stimülasyonuna ihtiyaç duyar ve GAP tarafından uyarılan GTP hidrolizi ile küçük GTPaz'ların aktiviteleri sonlandırılmış olur (179, 180).

Guanin nükleotid ayırıcı inhibitörü (guanine nucleotide dissociation inhibitor, RhoGDI), inaktif RhoA-GDP ile kompleks oluşturarak sitoplazma içinde tutulmasına (sekestre) aracılık eder. Rho ve Rab ailesinde vardır. Bu sitozolik proteinler, GTPaz'ların aktivasyonunu GEF'ler ve efektör moleküller ile ilişkisini bloke ederek önler (Şekil 7).



Şekil 7. Küçük GTPaz aktivitesinin düzenlenmesi

(181 nolu kaynaktan alınmıştır).

Küçük GTPaz'lar yapısal benzerliklerine göre beş alt gruba ayrılan 100'den fazla üyeden oluşur:

1. Ras (Rat sarcoma virus) ailesi; plazma membranının sitoplazmik yüzünde yerleşir, sinyal iletimi ve gen ekspresyonunda rol alır.
2. Arf (ADP ribosylation factor) ailesi; vezikül trafiğinin kontrolü, özellikle hücre membranından vezikül formasyonunda görev alır.
3. Rab (Ras-like protein from rat brain) ailesi; vezikül hareketi ve füzyonunun kontrolünde görev alır.
4. Ran GTPaz ailesi; sitoplazma ya da nükleusta lokalizedir. Hücre siklusunun G1, S ve G2 fazında nükleositoplazmik protein transportu, M fazında mikrotübül organizasyonunda görev alır.
5. **Rho ailesi üyeleri:** Rho ailesi üyelerinin insan genomunda 20 gen tarafından kodlandığı bilinmektedir. Rho (Ras homologue gene), Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate), cdc42 (cell division cycle 42), RhoE, RhoD, TC10 bunlardan bazılarıdır. Rho (RhoA, RhoB ve RhoC olmak üzere üç izoformu vardır), Rac (Rac1, Rac2 ve Rac3 olmak üzere üç izoformu vardır) ve Cdc42 daha detaylı çalışılan üyelerdir (180).

Küçük GTPaz'lar aktive olduklarında sitozolden, plazma membranına transloke olurlar. Ran ailesi üyeleri, ayrıca sitozolden nükleusa transloke olur. Küçük GTPaz'lar hücre bölünmesi, apoptozis, hücre-matriks adezyonu ve migrasyonu ile ilgili sinyal yollarında anahtar düzenleyicilerdir. Hücrelerin normal gelişiminde ve fizyolojik olaylarda kritik rolleri bulunmaktadır ve bu düzenlemenin bozulması kanser gibi hayatı tehdit edici hastalıklara yol açabilmektedir (180).

4.7. Rho Ailesi

Rho ailesi üyeleri aktin hücre iskeletinin organizasyonunda anahtar rol oynarlar (14). Rho, Rac ve Cdc42'nin Swiss 3T3 fibroblastlarında yapılan deneylerde, ekstrasellüler sinyali sırasıyla stress fiberleri, lamellipod ve filopod formasyonuna dönüştürdükleri gösterilmiştir (15, 182). Rho ailesi üyeleri, hücre-hücre ilişkisi, hücre motilitesi, sitokinezis (mitoz sonrası hücrenin bölünmesi), santral sinir sisteminde nöronların gelişimi, düz kas kasılması, sekresyon, endositoz, apoptoziste rol oynarlar Ayrıca mitojen ile aktive edilen protein kinaz

(MAPK, mitogen-activated protein kinase) sinyal ileti yolağını aktive ederek, gen ekspresyonlarını da regüle edebilirler (15, 181, 183).

4.7.1. Rho/Rho Kinaz Yolağı

Rho geni, ilk olarak 1985 yılında bir tür deniz tavşanı olan *Aplysia*'dan Ras gen homologu olarak elde edilmiştir (184). RhoA proteini tüm dokularda eksprese olmaktadır. İnaktif ve aktif formuna göre sitoplazma ya da plazma membranında bulunur.

Rho'ların ana efektör molekülü bir serin-treonin kinaz olan Rho kinazdır. Günümüzde Rho kinazın ROK α (ROCK2) ve ROK β (ROCK1) olmak üzere iki izoformu tanımlanmıştır (185). Bu izoformlar, amino ucunda kinaz alanı, santral bölgesinde 'coiled-coil' (Rho bağlayan bölge) alanı ve karboksi ucunda plekstrin homoloji alanı içeren büyük proteinlerdir (150–160 kDa). Farede ROK α ve ROK β arasında kinaz alanları %90'dan fazla korunmuş olmakla birlikte, kalan bölgeler sadece %55-70 korunmuştur. Bu da iki enzimin farklı hücresel fonksiyonları olabileceğini düşündürür. Farede ROK α yüksek oranda beyin, kalp, akciğer, kas, plasenta ve fetusta eksprese olurken, karaciğer, mide, dalak, böbrek ve testiste görece daha az eksprese olur. ROK β izoformu, kalp, akciğer, karaciğer, mide, dalak, böbrek, testis, plasenta ve fetüs, daha az olarak da beyin ve iskelet kasında eksprese olur (185). ROK α ve ROK β izoformlarının ikisinin de sıçan (186), tavşan (187) ve insan (188) mesanesinde eksprese olduğu gösterilmiştir. Günümüzde ROK α ve ROK β izoformları arasında fonksiyonel farklılık hala tam olarak açıklanamamıştır.

RhoA'nın iyi bilinen diğer efektör proteinleri arasında protein kinaz N (PKN), sitron kinaz, memeli diaphanous protein (mDia), fosfatidilinositol 4-fosfat 5-kinaz (PIP5-kinaz) bulunur. PKN1 ve PKN2 endozomal regülasyonda rol oynar. Sitron kinaz bir ROCK-aracılı kinazdır ve sitokineziste kritik rolü vardır. mDia1, mDia2 ve mDia3, profilin aracılı mekanizma ile aktin polimerizasyonu ve hücre göçü sırasında mikrotübül stabilizasyonunda yer alır (189).

Rho kinazın aktivasyonu, birçok hücre iskeleti proteininin fosforilasyonuna neden olarak, stres fiberlerinin oluşumunu ve ekstrasellüler matrikse adezyonunu stimüle eder (15, 183). Küçük GTPaz RhoA, agonist stimülasyonuyla indüklenen Ca²⁺ sensitizasyonundan sorumludur ve onun efektör molekülü Rho kinaz, myozin fosfataz aktivitesini inhibe ederek düz kas hücrelerinde kasılmanın devamlılığını sağlar (190).

Rho/Rho kinaz sistemi, sistemik vasküler tonus düzenlenmesine ve anormal düz kas kontraksiyonunun düzenlenmesine katılarak hipertansiyona, koroner ve serebral arterlerde spazma neden olur. Rho kinaz inhibitörü Y-27632, hipertansif sıçanlarda kan basıncını belirgin olarak düşürür (191). Diğer Rho kinaz inhibitörü fasudil ise stabil efor anjinalı hastalarda maksimum egzersiz süresini ve ST segment depresyonunun başlama zamanını uzatmaktadır (192). Fasudil, çeşitli hipertansif modellerde ekstrasellüler matriks genlerinin ekspresyonu, oksidatif stres, hücre proliferasyonu ve makrofaj infiltrasyonunu baskılayarak hipertansiyona bağlı böbrek hasarını önlemektedir (193-195).

Rho/Rho kinaz Yolağını Aktive Eden Faktörler

Rho/Rho kinaz yolağı, çeşitli fizyolojik uyarı ve moleküller ile aktive edilir. Mesanede ilgili ana yollar; muskarinik asetilkolin reseptörleri, endotelin, anjiyotensin, PKC, NO, ROS, sfingosin-1-fosfat ve sfingosilfosforilkolin yolları, P2 purinoseptörler, lisofosfatidik asit (LPA) ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ 'dır (11).

Jezior ve ark. (2001), tavşan detrusor kasında betanekol aracılı kasılma yanıtlarının kısmen Rho kinaz aracılı kalsiyum sensitizasyonu artışına bağlı olduğunu bildirmiştir (196). Ardından Ratz ve ark. (2002) tarafından, tavşan mesane düz kasında CCh aracılı kasılma yanıtlarının, Rho kinaz inhibitörleri Y-27632 ve HA-1077 ile inhibe edildiği rapor edilmiştir (197). İnsan mesane kasında muskarinik agonist CCh'ün oluşturduğu kasılma yanıtlarını, selektif Rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin doza bağımlı olarak anlamlı biçimde inhibe ettiği bildirilmiştir (5, 188). Benzer şekilde Y-27632'nin sıçan ve farelerde de mesanedeki CCh aracılı kasılma yanıtlarını inhibe ettiği pek çok çalışmada gösterilmiştir (198-200). Ancak Rho kinazın kobay mesanesinde muskarinik agonist aracılı kasılma yanıtında majör rol oynadığı gösterilememiştir (201-203).

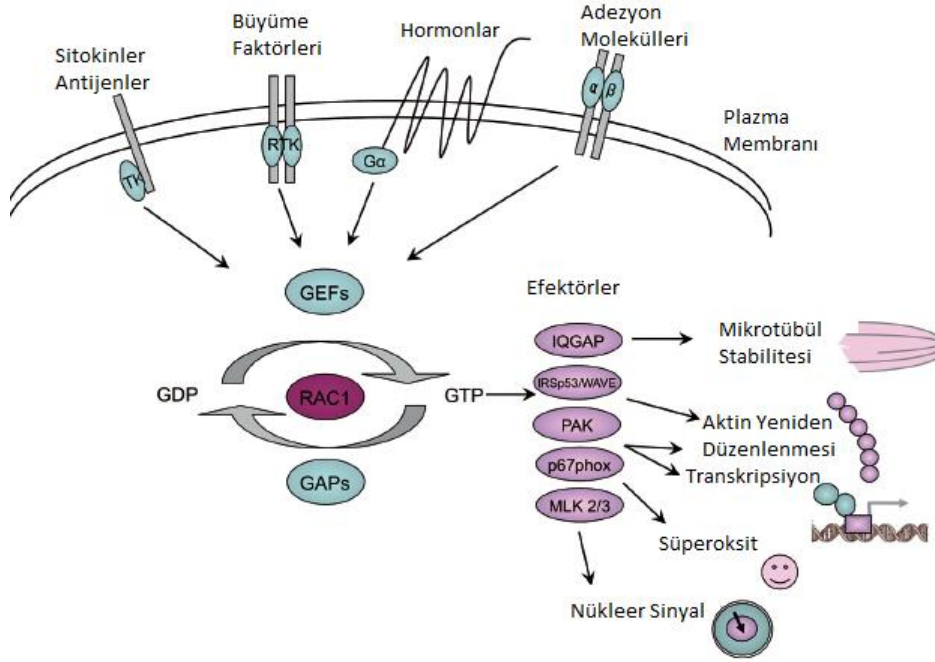
Sıçan mesanelerinde artmış distansiyonun indüklediği oksidatif stresin, ROS üretimi ile ilişkili olduğunun gösterilmesiyle birlikte (204); ROS aracılı Rho kinaz aktivasyonunun mesane düz kas fonksiyonu veya disfonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (11). LPA, $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve sfingosilfosforilkolinin, Rho kinazı aktive ederek myozin fosfataz hedef alt ünitesi 1 (myosin phosphatase target subunit 1, MYPT1)

fosforilasyonunu ve kalsiyum sensitizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (205). LPA, insan ve sıçan mesane kültür hücrelerinde, anlamlı kasılma yanıtı oluşturmuştur (206).

4.7.2. Rac1

Rho ailesinin bir üyesi olan Rac1, ilk olarak Ras aracılı C3 Botulinum Toksin Substratı 1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) adıyla 1989 yılında bulunmuştur (207). Son yıllarda Rac1'in, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, hücre farklılaşması, DNA sentezinin indüksiyonu, süperoksit üretimi ve hücre göçü gibi çok çeşitli hücresel olaylarda temel rol üstlendiği gösterilmiştir. Memelilerde, Rac proteinlerinin üç izoformu (Rac1, Rac2, Rac3) bulunmuştur. Rac proteinlerinin aminoasit dizilimleri %90 benzerlik göstermesine rağmen, doku dağılımları ve ekspresyon düzeyleri değişkenlik gösterir (208). Rac1, pek çok dokuda geniş bir dağılım gösterirken, Rac2 protein ekspresyonu daha çok hematopoetik hücrelerle sınırlıdır, kemotaksisin düzenlenmesi ve süperoksit üretimine katılır (209). Rac3 proteinleri beyin dokusunda yüksek oranda eksprese olur (210).

Rac1, pek çok spesifik efektör molekül ile etkileşir ve çeşitli fizyolojik sonuçları olan çok sayıda sinyal ileti yolağının aktivasyonuna neden olur. Rac1 efektör proteinleri arasında ilk bulunanlar, PAK (p21 ile aktive edilen kinaz) ailesidir. PAK, Rac1'e GTP aracılığıyla bağlanarak PAK kinaz aktivitesini güçlü bir şekilde uyarır ve hücre iskeleti dinamikleri, adezyon ve gen transkripsiyonuna yol açar (211, 212). Rac, bir reseptör tirozin kinaz olan platelet kökenli büyüme faktörü (platelet-derived growth factor, PDGF) reseptörü gibi çeşitli membran reseptörleri aracılığıyla ekstrasellüler sinyaller tarafından aktive edilebilir. Rac1, PAK'ı kullanarak transmembranal GS'ı direkt aktive eder ve hücre içinde ikincil mesajcı cGMP'nin düzeyini artırır. PDGF aracılı fibroblast hücre göçü ve lamellipod formasyonunda, Rac/PAK/GS/cGMP yolağı görevlidir (213). Rac1, efektörü 'mixed lineage' kinaz (MLK2/3) ile JNK yolağını aktive ederek nükleer sinyali etkiler (214, 215). Rac1 sinyali, hücresel farklılaşmanın anti-apoptotik ve hücre döngüsü mekanizmaları ile modülasyonunda önemli rol oynayabilir. Rac1, nükleer faktör kappaB (NFkB) transkripsiyon faktör aracılı düzenleyicileri pozitif olarak regüle eder (216). Rac1'in rol aldığı hücresel olaylar şekil 8'de özetlenmiştir.



Şekil 8. Rac1 aracılı sinyal ileti yollarının şematik görünümü
(208 nolu kaynaktan alınmıştır)

4.7.2.a. Rac1 Aracılığıyla Gerçekleşen Hücresel Olaylar

ROS Üretimi

Rac1, transkripsiyon faktör aktivasyonu, proliferasyon, transformasyon, apoptozis ve hücrel immun yanıt gibi çeşitli fonksiyonların düzenlendiği hücrelerde ROS oluşumuna katılır (217, 218). Mikroorganizmalara karşı savaşan fagositik hücrelerde NADPH oksidaz aktivasyonu için Rac1 gereklidir (219, 220). Rac1'in süperoksit anyon üretimini katalize eden NADPH oksidaz için koordine edici protein olduğu gösterilmiştir. NADPH oksidaz enzimi fagositlerde ve daha az olmakla birlikte nonfagositik hücrelerde ROS üretimini katalize eden bir enzimdir. Bu enzimin membranal (gp91phox ve p22phox) ve sitozolik (p47phox, p40phox, p67phox ve Rac) komponentleri bulunmaktadır. NADPH oksidaz enziminin aktive olabilmesi için sitoplazmik komponentlerinin bir araya gelmesi ve membranal subünitleri aktive etmesi gereklidir (16). Rac1'in ROS üretiminde ve dolayısıyla ROS'a bağlı olarak gelişen komplikasyonlarda ve hastalıklarda rolü olduğu düşünülmektedir. İnsan ve farede endotel, fibroblast ve düz kas hücrelerinde ekspresyonu artan Rac1'in, hücre içi ROS üretimini indüklediği gösterilmiştir. Arter düz kasında Rac1/NADPH sisteminin düz kas tonusu ve proliferasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (221).

Apoptozis

Rac1, bir onkogen ürünü olan p21-ras'ın efektörüdür. Ras onkogeni tarafından kodlanan p21-ras proteini, insanlarda gelişen birçok tümörde önemli onkogenlerden biridir (222, 223). Onkojenik Ras proteini tarafından aktive edilen efektörlere bağlı olarak, p21-ras'ın, apoptotik yolakta hem pozitif hem negatif düzenleyici etkileri olduğu gösterilmiştir (224).

Rac1 tümör hücrelerinde aktin polimerizasyonu, JNK aktivasyonu ve hücre içi süperoksit anyon üretimi gibi farklı yollarda görev almaktadır. Fosfoinositid-3-kinaz (PI3-kinaz) aktivasyonu, Rac ve Akt/PKB kinaz (ptotein kinaz B) yolağını aktive eder. Akt/PKB yolağının indüksiyonu, tümör hücrelerinin sağkalımı ile ilgilidir (225).

Rac aktivasyonu transforme fibroblastlarda mitojenik sinyal ile ilişkilendirilmiştir (226, 227). Rac aktivasyonunun etkileri ile ilgili bildirilen raporların birincisinde, Rac aktivasyonunun Ras tarafından indüklenen apoptozisi inhibe ettiği (228) bildirilmiş; ikinci çalışmada ise insülin reseptörü aracılı sağkalım sinyali, Akt/PKB yolağından bağımsız olarak Rac aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (229). Bu iki yayından elde edilen bilgiler, Rac aktivasyonunun, hücre çoğalmasına ek olarak, apoptotik uyarılara verilen tümör hücre yanıtını regüle edebildiğini göstermektedir (224).

Rac1, NADPH oksidaz enziminin bir subüniti olarak ROS oluşumunu arttırdığından, artmış hücre içi serbest radikallere bağlı olarak, hücre büyümesi, göçü, transformasyonu ve apoptozis gibi pek çok hücreyel olayda rol oynamaktadır (230, 231). Diyabetik farelerde Rac1 aracılı NADPH oksidaz aktivasyonunun, kardiyomyositlerde (231) ve intestinal epitelyal hücrelerde (232) apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. Ancak bazı çalışmalarda Rac1'in hücreleri apoptozisten koruduğu da bildirilmiştir (233, 234).

Rac1'in, NADPH oksidaz enziminin bir subüniti olarak ROS oluşumunu arttırdığı ve artmış hücre içi serbest radikallere bağlı olarak apoptozis gibi pek çok hücreyel olayda rol oynadığı düşünülürse; Rac1'i inhibe eden tedavilerin, diyabete bağlı komplikasyonların önlenmesinde veya tedavisinde etkili ve yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (231).

4.7.2.b. Hücresel Olaylarda RhoA/Rac1 Arasındaki Denge

Küçük GTPaz'lar Rac1 ve RhoA'nın pek çok fizyolojik ve patolojik olayda bir denge içinde aktivite gösterdikleri ve birbirlerinin etkilerini modüle ettikleri bilinmektedir. RhoA ve Rac1'in endotel hücrelerindeki aktin hücre iskeletinin kontrolünde zıt etkili oldukları hipoksi/reoksijenasyon modelinde gösterilmiştir. Rac1 aracılı ROS oluşumu, RhoA aktivitesinde down-regülasyona ve eşzamanlı olarak hücre membranında büzüşmeye ve integrin aracılı hücre yayılımına neden olmaktadır (15).

Yine RhoA'nın endotel hücrelerinde NO üretimini suprese ettiği ve RhoA aktivasyonunun, endotel hücrelerinde NO yapımını azaltarak endotel disfonksiyonuna katkıda bulunduğu bildirilmektedir (235). Rac1 endotel hücrelerinden NO salınımını artırarak damarlarda gevşemeye neden olurken, RhoA ise NO salınımını inhibe ederek kasıcı etkiye neden olur (236). Rac1'in damarlardaki etkisini başlıca efektör molekülü olan PAK'ı aktive ederek ve aynı zamanda RhoA'yı inhibe ederek göstermektedir. Literatürde RhoA ve PAK'ın vasküler reaktivitenin regülasyonuna vasküler düz kas hücrelerinde MLCP veya MLCK'ı inhibe ederek katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Hemorajik şok sonrası vasküler reaktivitenin bifazik değişikliğinin düzenlenmesinde de RhoA ve Rac 1 aktiviteleri arasındaki denge önemli rol oynamaktadır. RhoA'nın pozitif düzenleyici etkisi varken, Rac1'in negatif düzenleyici etkisi vardır. RhoA ve Rac1'in vasküler reaktiviteyi düzenlemesinde ana yollar sırasıyla Rho kinaz ve PAK yolağıdır (237).

Hücre kontraksiyonu, dinamik membran tomurcuklanması, nükleer disintegrasyon ve apoptotik hücrelerin apoptotik cisimlere fragmentasyonu gibi apoptozisin işlem (execution) fazında meydana gelen morfolojik olaylarda, Rho kinaz enziminin majör düzenleyici olduğu bilinmektedir (238). Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ile tümör hücrelerinin invazyonu, metastazı ve regülasyonu bozulan mikroçevre ilişkisi arasında güçlü bir korelasyon bulunur. Birçok prelinik modelde, Rho kinaz inhibitörlerinin tümör büyümesi ve metastazını azaltmadaki etkililiğinin kayda değer olduğu gösterilmiştir. İlginç olarak hücrenin son kararını kontrol eden Rho kinaz aracılı moleküler mekanizma bilinmemekle birlikte, Rho kinaz sinyalinin, hücre tipine ve ortama bağlı olarak hem pro-apoptotik hem de 'pro-survival (hücrenin sağkalımı)' olduğu gösterilmiştir (239).

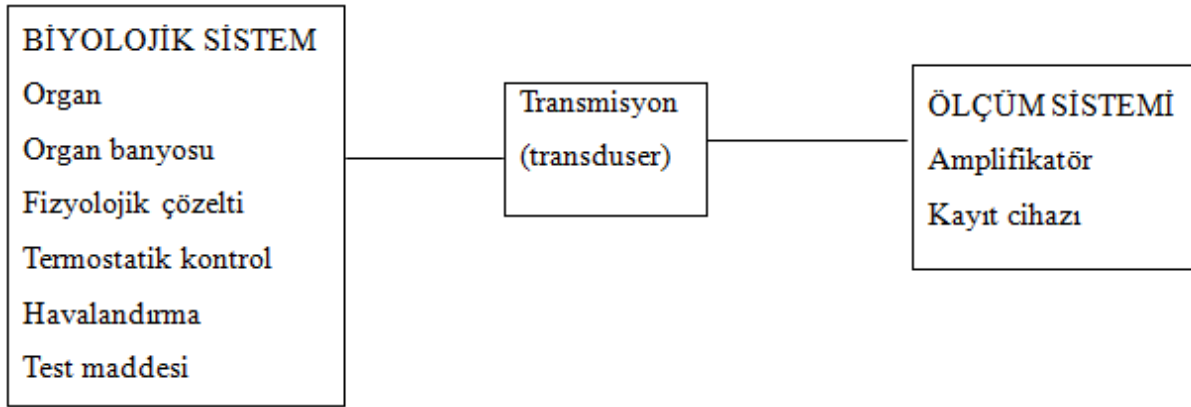
Rho ile ilişkili genlerin ekspresyonu, mikroarray, qPCR ve Western blotting yöntemleri kullanılarak ürotelyal hücreli karsinom (UCC) örneklerinde, normal ürotelyum ile karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve Rho ile ilişkili genlerin büyük çoğunluğunun ekspresyonunun, UCC örneklerinde artmış olduğu bulunmuştur. Mesanede UCC gelişimi ve ilerlemesinde, RhoA, RhoB, RhoC, Rac1 ve Cdc42 ekspresyonundaki değişikliklerin önemli rol oynadığı bildirilmektedir (240). İnsanlarda RhoA ekspresyon artışının, apoptoziste ikincil mesajcı olan seramid üretiminin artışı ile korele olduğu bildirilmiştir (241). Yukarıda belirtildiği gibi, onkogenik Ras proteini tarafından aktive edilen efektörlere bağlı olarak, Rac1'in, apoptotik yolda hem pozitif hem negatif düzenleyici etkileri olduğu gösterilmiştir (224). Dolayısıyla RhoA/Rac1 arasında apoptotik yolların düzenlenmesinde de bir denge olduğu olduğu bilinmektedir.

Yukarıda belirtilen çalışmalar bir arada değerlendirildiğinde hem RhoA hem de Rac1 aracılı sinyal ileti yollarının hem apoptotik hem de antiapoptotik süreçlerde rol oynadığı görülmektedir. Diyabette gelişen farklı komplikasyonlarda apoptozisin rolü pek çok çalışmada gösterilmiştir. Diyabetik nefropatide, apoptozisin önemli bir rolü olduğu birçok çalışmada bildirilmektedir (242-245). Diyabette gelişen komplikasyonlarda küçük GTPaz'ların apoptotik ya da antiapoptotik süreçlerde rolleri araştırılmaktadır.

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. ORGAN BANYOSU

İzole düz kas preparatlarında organın vücut dışına çıkarılarak uygun bir ortamda canlı tutulması, ortamın kimyasal yapısının düzenlenmesi, ortam sıcaklığının denetlenmesi ve optimum oksijenasyonun sağlanması suretiyle yapılır. İzole organ preparatlarının incelenmesi için kullanılan tekniklerden birisi izole organ banyosu sistemidir. Bu sistemde bir üçüncüyle aralarında bağlantının sağlandığı iki öge vardır. Bunlardan ilki, preparata optimal in vitro şartları sağlayan biyolojik sistem, ikincisi ise ölçme sistemidir. Bu iki sistem arasındaki mekanik bağlantıyı sağlayan transmisyon (aktarım) da üçüncü sistemi oluşturmaktadır (Şekil 9, Resim 1).



Şekil 9. İzole organ preparatlarının incelenmesinde kullanılan sisteme ait diyagram

İn vitro çalışılacak bir organın canlılığının korunmasındaki en önemli koşul, organın bulunacağı ortamdır. Özellikle aynı türden elde edildiği zaman gerekli gazları taşıma özelliği açısından kan en iyi ortamdır. Ancak kanın temininin zor ve pahalı olması, içerdiği aktif maddeler nedeniyle spontan aktivitelere sebep olması ve incelenen ilacın etkinliğini değiştirebilmesi gibi nedenlerle kan kompozisyonuna yakın fizyolojik tuzlu su çözeltileri kullanılmaktadır. Bu tuz çözeltilerinin bileşiminde enzimler, reseptörler vs. gibi proteinlerin işlevleri için gerekli olan Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ve Cl^- iyonlarının bulunması gereklidir. Hücrelerdeki fonksiyonel proteinlerin H^+ iyonuna karşı duyarlı olmaları ve bunlar üzerinden oluşan yanıtların dar bir pH aralığında ortaya çıkması nedeniyle bazı kimyasal maddeler (H_2PO_4 , HCO_3 , albumin, aminoasitler, tris ve benzeri organik tamponlar) fizyolojik tuz çözeltilerinin tamponlanmasında kullanılırlar. Tamponlama ile amaçlanan pH'nın nötral (7.4) düzeyde olmasıdır. Deney süresince fizyolojik tuz çözeltisinden %95 O_2 + %5 CO_2 gaz karışımı

geçirilerek, dokuya gerekli oksijen iletimi sağlanır. Organ banyolarında, canlılardan elde edilen dokuların fizyolojik yanıtlarının sağlanması için 37°C civarında sıcaklıklar kullanılmalıdır. Bu amaç için ceketli sistem kullanılmakta, banyo çeperindeki ceketten ısıtılmış su geçirilmektedir.



Resim 1. İzole organ preparatlarının incelenmesinde kullanılan sistem

İzole düz kas preparatına taze fizyolojik çözelti sağlamak ve çalışma sırasında eklenen test bileşiklerini uzaklaştırmak için preparatlar belirli aralarla yıkanır. Bu çalışmada kullanılan yıkama şeklinde, banyo önce tamamen boşaltılır ve sonra boşaltma musluğu kapatılarak taze, uygun sıcaklıktaki çözelti ile doldurulur. İzole düz kas preparatının organ banyosuna asılabilmesi için organ askısına ihtiyaç vardır. Önce organ bu askıya bağlanır ve sonra organ banyosunun içine yerleştirilir. Preparat ve transduser arasındaki bağlantı ipe sağlanır. Dokuya ait yanıtlar transduser aracılığıyla amplifikatöre oradan da kaydediciye iletilir ve doku yanıtı hareketli kağıt üzerine yazdırılır.

5.2. KONSANTRASYON-YANIT EĞRİLERİ

Konsantrasyon-yanıt eğrisi, bir maddenin organ banyosundaki konsantrasyonu ile onun preparat üzerindeki etki şiddetini göstermektedir.

5.2.1. Agonistlerin test edilmesi

İzole organa başka herhangi bir madde verilmeksizin sadece test maddesinin uygulanmasıdır. Bir agonist test edilirken doz kademeli olarak arttırılır. Bu işlem en küçük cevabın alındığı konsantrasyondan başlar ve maksimum etki elde edilinceye kadar sürdürülür. Organ banyosundaki konsantrasyon M (mol/L) olarak ifade edilir ve onar onar (10, 20, 30, ...), aritmetik olarak (1, 2, 4, 8, ...) veya logaritmik olarak (1, 3, 10, ...) arttırılabilir.

5.2.2. Konsantrasyon-yanıt eğrisine ilişkin terimler

Maksimum Etki (E_{max}): Preparata zarar vermeksizin onun verebileceği maksimum cevabı oluşturan konsantrasyondur. Maksimum doz, artan konsantrasyonda uygulanan test maddesine maksimum yanıt alındıktan sonra konsantrasyonun arttırılmasına karşın doku cevabının daha fazla artmadığı hatta azalmaya başladığı konsantrasyondur.

Medyan efektif konsantrasyon (EC_{50} veya ED_{50}): Maksimum etkinin %50'sini oluşturan konsantrasyondur. Çeşitli ilaçların aktivitelerinin araştırılmasında kullanılan bir parametredir. pD_2 ($-\log EC_{50}$) ise, EC_{50} değerinin negatif logaritmasıdır.

5.3. ARAŞTIRMA YÖNTEMİ

5.3.1. Çalışmada Kullanılan Hayvanlar

Çalışmada 200-250 g erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Tüm hayvanlar çalışma saatine dek yem yeme ve su içme serbestliğine sahip oldular. Sıçanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusunda, ortam sıcaklığının 22 ± 2 °C olduğu laboratuvar koşullarında bulunduruldu.

5.3.2. Diyabetes Mellitus Oluşturma

Sıçanlarda diyabet oluşturmak için sitrat tamponu (0.02 M, pH 4.5) içinde çözündürülmüş streptozotosin (STZ) i.p. tek doz (45 mg/kg) enjekte edildi (246). Enjeksiyondan sonraki 3-4. günlerde kuyruk venlerinden alınan bir damla kan örneklerinden, glukometri cihazı (Medisense Optium glucometer, Abbott Laboratoires, Bedford MA) kullanılarak kan şekerleri (KŞ) ölçüldü; kan şekeri 300 mg/dl ve üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Tedavi gruplarında ilaç tedavileri ve salin uygulamaları, KŞ'leri ölçümünden sonra başlayarak sekiz hafta uygulandı. Salin enjeksiyonlarının amacı tedavi gruplarında uygulanan ilaç enjeksiyonlarına bağlı stres sürecini eşit kılmaktır. Sekiz haftanın sonunda hayvanlar deney için kullanıldı (247).

5.3.3. Deney Grupları

- 1. Kontrol grubu (K):** STZ'in çözücüsü olan sitrat buffer (0.02 M) i.p olarak tek doz uygulandı ve 3-4. günlerde KŞ'leri 50-135 mg/dl arasında olan sıçanlar normal kabul edildi ve bu hayvanlara sekiz hafta süreyle diğer gruplarla eşdeğer hacimde salin s.c. uygulandı (n=8).
- 2. Diyabetik kontrol grubu (Diyabet grubu, D):** STZ ile diyabetize edildikten sonra KŞ'leri 300 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlara sekiz hafta süreyle diğer gruplarla eşdeğer hacimde salin s.c. uygulandı (n=10).
- 3. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubu (Dİ):** Diyabetize edildikten sonra KŞ'leri 300 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlara sekiz hafta süreyle 6 U/kg/gün NPH insülin s.c. uygulandı (n=10).

5.3.4. Deneyden Çıkarılma Kriterleri

Hayvanların başlangıç, haftalık ve deney sırasındaki ağırlıkları kaydedildi. Diyabete bağlı hayvanların su ve yem ihtiyacı artacağı için günde iki kez sulukları ve yemleri kontrol edildi. Bu süre içinde başlangıç vücut ağırlığının %15'inden fazlasını kaybeden (diyabete bağlı kilo kaybı beklenmekle birlikte, bu genellikle %15'in altında olmaktadır), dehidratasyon ya da enfeksiyon tespit edilen sıçanlar deneyden çıkarıldı.

5.3.5. Organ banyosu deneyleri

Sekiz haftanın sonunda hayvanlar eter koklatılarak sersemledikten sonra servikal dislokasyonla öldürölüp ekstremitelerinden sıçan yataklarına sabitlendikten sonra deri ve deri altı dokusu karnın ortasından boyuna dek uzunlamasına kesilerek açıldı, mesaneleri hızlıca alındı. Çevre bağ dokusu temizlendikten sonra mesaneden 2 mm x 10 mm boyutlarında üç longitudinal şerit hazırlandı. Preparatlar spontan aktiviteyi azaltmak için 32°C'de ısıtılan, %95 O₂ + %5 CO₂ ile gazlandırılan Krebs Henseleit solüsyonu (mM olarak; NaCl 118.2, KCl 4.8, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, glukoz 11, pH 7.4) içeren 10 ml'lik organ banyolarına asıldı. İki gr'lık izometrik dinlenme gerilimi uygulandıktan sonra 30 dakika dinlenme periyoduna bırakıldı. Asılan bu preparatlarda düz kas kasılma yanıtları organ banyosunun içine aşağıdaki ajanlar uygulanarak değerlendirildi:

Karbakol (CCh) (10⁻⁹-10⁻⁴ M) kümülatif dozda denenerek doz-yanıt eğrileri çizildi (n=8-10) . Her bir grup için CCh Emax ortalamaları ve pD₂ değerleri hesaplandı.

Protokol 1

30 dakikalık dinlenme sonrasında düz kas kasılmasına RhoA'nın aracılık edip etmediği Rho kinaz inhibitörü Y-27632 ile Rac1'in aracılık edip etmediği ise Rac1 inhibitörü NSC 23766 ile değerlendirildi. Bu amaçla mesane dokuları Y-27632 (0.1, 1 ve 10 µM olmak üzere 3 ayrı doz) ile 30 dakika inkübe edildikten sonra CCh (10⁻⁹-10⁻⁴ M) kümülatif dozda denenerek doz-yanıt eğrileri çizildi ve Y-27632'nin CCh kasılmalarını doza bağımlı olarak inhibe edip etmediği değerlendirildi. Rac1 etkileri için de organ banyosuna NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 µM olmak üzere 3 ayrı doz) 30 dakika inkübe edildikten sonra CCh (10⁻⁹-10⁻⁴ M) kümülatif dozda denenerek doz-yanıt eğrileri çizildi ve NSC 23766'nın CCh kasılmalarını doza bağımlı olarak inhibe edip etmediği değerlendirildi. Rho kinaz inhibitörü Y-27632 ve Rac1 inhibitörü NSC 23766'nın birbirlerinin etkisini değiştirip değiştirmediğini (arttırıcı ya da azaltıcı yönde) inceleyebilmek için her iki inhibitör, ekimolar konsantrasyonlarda (0.1, 1 ve 10 µM olmak üzere 3 ayrı doz) kombine edilerek eş zamanlı olarak organ banyosuna eklendi ve 30 dakikalık inkübasyon sonrasında CCh kasılmalarını doza bağımlı olarak inhibe edip etmedikleri değerlendirildi (n=5-8).

Protokol 2

RhoA ve Rac1'in ürotelyal fonksiyonlar üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla ürotelyumdan salınan mediyatörlerden biri olan prostaglandinler ile ilişkisi değerlendirildi. Bu amaçla prostaglandin sentezini inhibe etmek için siklooksijenaz inhibitörü indometazin

varlığında deneyler tekrarlandı. Bir saatlik dinlenme periyodundan sonra organ banyosuna indometazin (5×10^{-7} M) ilave edilerek bir saat inkübe edildi (23.Pinna C. 1992). Sonrasında protokol 1 uygulanarak Rho kinaz inhibitörü Y-27632 ve/veya Rac1 inhibitörü NSC 23766'nın indometazin varlığında CCh kasılmalarını doza bağımlı olarak inhibe edip etmediği değerlendirildi (n=5-8).

5.3.6. Biyokimyasal analizler

Kan şekeri bakıldı. Bu amaçla servikal dislokasyonla öldürülen tüm hayvanların vena cava caudalis'lerinden 1-2 ml kan hızlı bir şekilde alındı (kalp çıkarılmadan önce) ve buradan elde edilen serumlar -20 °C'de saklandı, çalışmanın sonunda hepsine birden bakıldı.

5.3.7. Mesanedeki değişikliklerin histolojik olarak gösterilmesi

Servikal dislokasyon sonrası histolojik inceleme için mesane boynundan bir cm'lik kısım %10'luk formalin içine alınarak iki gün tespit olması için bekletildi. Rutin histolojik takip aşamalarından sonra dokular parafine gömüldü. Işık mikroskopik inceleme için beş µ kalınlığında alınan kesitler hematoksilin-eozin ile boyandı ve histopatolojik değişiklikler açısından değerlendirildi. Histomorfometrik ölçümler 'UTHSCSA Image Tool 3.0 software' programı kullanılarak yapıldı.

Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü: %10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri, fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla bir gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika dört değişim aseton solüsyonlarından geçirildikten sonra iki değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde iki değişim parafin uygulanıp birer saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile beş µm'lik kesitler alındı.

Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü: Mikrotom (Leica, RM 2255) aracılığı ile alınan beş µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'er dakika üç değişim ksilolde tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoksilin (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, iki dakika eozin (Surgipath, 01602, Canada) boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (Merck) ile kapatıldı.

İmmunhistokimyasal Yöntem: RhoA ve Rac1 immunreaktivitelerinin gösterilmesi amacıyla RhoA (sc-418, Santa Cruz Biotechnology) ve Rac1 (sc-217, Santa Cruz Biotechnology) antikörleri kullanıldı. İmmunhistokimyasal inceleme için 60°C lik etüvde bir gece ve ksilolde üç değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Tripsin (00-3008, Digest All 2A, Zymed, San Francisco, California, CA) solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 10 dk %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. 3x5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler bir saat oda ısısında bloklama solusyonu (İnvitrogen, Histostain-Plus Broad Spectrum, 85-9043) ile inkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan primer antikörler ile bir gece +4°C'de inkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile üç defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikör (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum 85-9043) ile 15 dk inkübe edildi. PBS solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum 85-9043) 15 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) (1718096, Roche) kullanıldı. Zemin boyaması Harris hematoksilen yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. Işık mikroskobu ile incelendi. İmmunhistokimyasal değerlendirme semikantitatif yöntem ile yapıldı. Her preparat için rastgele seçilen üç alan sayıldı. Bu yöntemde 0; boyanma yok, 1:Az boyanma, 2:Orta boyanma, 3:Şiddetli boyanma olarak iki farklı histolog tarafından kör olarak değerlendirildi.

5.3.8. İstatistiksel analiz

Farklı gruplar arasındaki parametrik değerlerin karşılaştırılması için varyans analizi (ANOVA) ve gruplar arasındaki farkın anlamlılık testi için Bonferroni testi uygulandı. İmmunhistokimyasal verilerin analizinde gruplar arası farklılık Kruskal Wallis, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için 'Prism 4.0, GraphPad Software' adlı bilgisayar programı kullanıldı. Çalışmadaki tüm değerler, ortalama±SEM olarak verildi. İstatiksel olarak anlamlılık $p < 0.05$ olarak gözetildi.

6. BULGULAR

6.1. Hayvanların Vücut ve Mesane Ağırlıkları, Kan Şekeri Değerleri

Sıçanların vücut ağırlıkları diyabet grubunda, kontrol ($p<0.05$) ve insülin tedavisi verilen diyabet ($p<0.01$) gruplarına göre anlamlı olarak azaldı. Mesane ağırlıkları ise diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı ($p<0.05$). Kan şekeri değerlerinin diyabet grubunda, kontrol ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarına göre artmış olduğu saptandı ($p<0.01$, Tablo 1).

Tablo 1. Tüm gruplarda hayvanların vücut ağırlığı, mesane ağırlığı ve kan şekeri değerleri

	Vücut ağırlığı (g)	Mesane ağırlığı (g)	Kan şekeri (mg/dl) #	Hayvan sayısı
K	231±7	0.15±0.02	210±16	8
D	188±11 *	0.22±0.01 *	536±35 **	10
Dİ	234±11 ***	0.21±0.01 *	290±47 ***	10

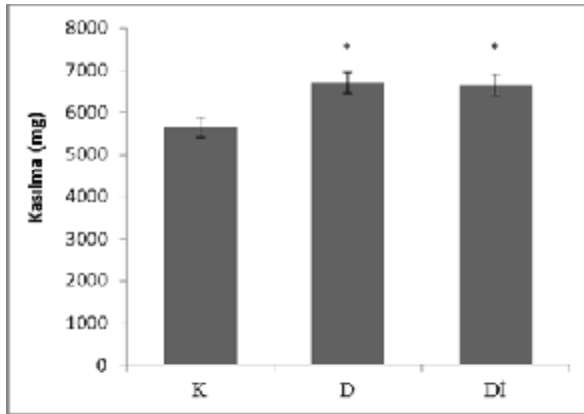
* $p<0.05$, ** $p<0.01$ K grubuna göre, *** $p<0.01$ D grubuna göre

Kan şekeri değerleri, tokluk kan şekerlerini göstermektedir.

6.2. Mesane Detrusor Kas Kasılmasındaki Değişikliklerin İncelenmesi

6.2.1. KCl İle Elde Edilen Kontraktıl Yanıtlar

Organ banyosuna asılan mesane detrusor düz kas şeritlerine, KCl (120 mM) uygulanması, tüm deney gruplarında kasılma yanıtları oluşturdu. KCl'e bağlı kasılma yanıtları, diyabet (6707 ± 257 mg) ve insülin tedavisi verilen diyabet (6655 ± 254 mg) gruplarında, kontrol grubuna (5647 ± 233 mg) göre anlamlı olarak arttı ($p<0.05$, Şekil 10).

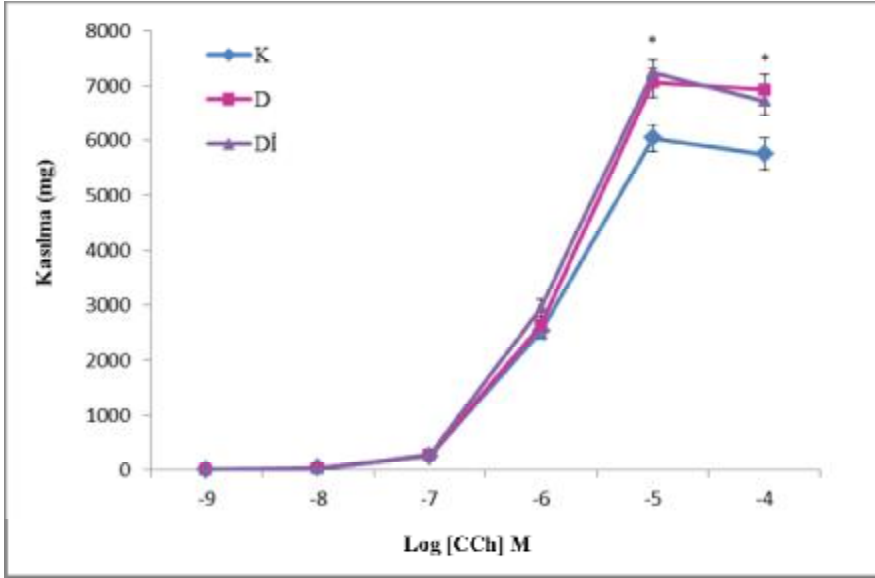


Şekil 10. Tüm gruplarda KCl uygulaması sonrası mesanede oluşan kasılma yanıtları

* $p<0.05$ K grubuna göre

6.2.2. Kümülatif Karbakol İle Elde Edilen Kontraktıl Yanıtlar

Kümülatif dozlarda uygulanan karbakol (CCh, 10^{-9} - 10^{-4} M), tüm gruplarda doza bağımlı kasılma yanıtları oluşturdu. Diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında, CCh kasılma yanıtları yüksek konsantrasyonlarda (10^{-5} ve 10^{-4} M), kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı ($p < 0.001$, Şekil 11).

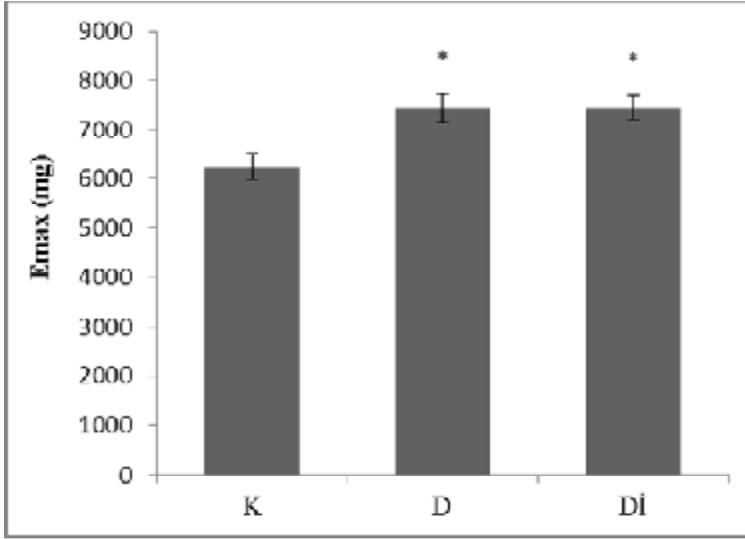


Şekil 11. Tüm gruplarda kümülatif dozlarda uygulanan CCh (10^{-9} - 10^{-4} M) kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ K grubuna göre

Ancak CCh kasılmaları, KCl (120 mM) kasılmalarının %'si olarak değerlendirilip karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

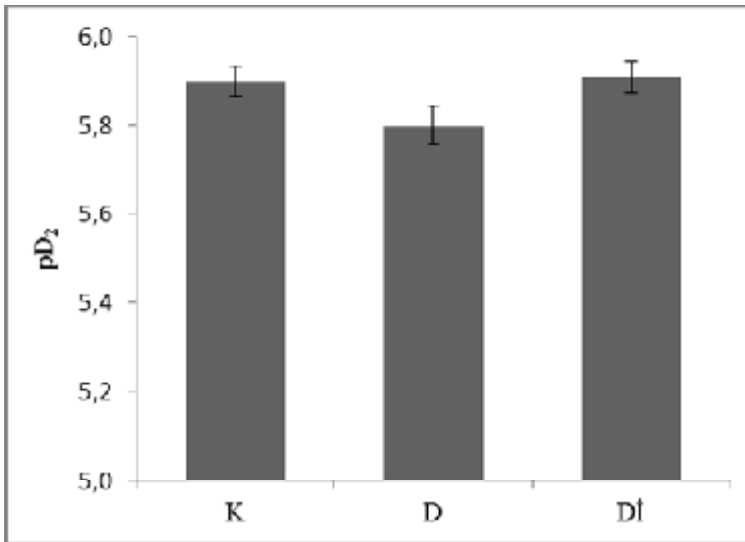
CCh Emax değerleri, diyabet (7437 ± 276 mg) ve insülin tedavisi verilen diyabet (7445 ± 243 mg) gruplarında, kontrol grubuna (6233 ± 259 mg) göre anlamlı olarak arttı ($p < 0.01$, Şekil 12).



Şekil 12. Tüm gruplarda CCh Emax değerleri

* $p < 0.01$ K grubuna göre

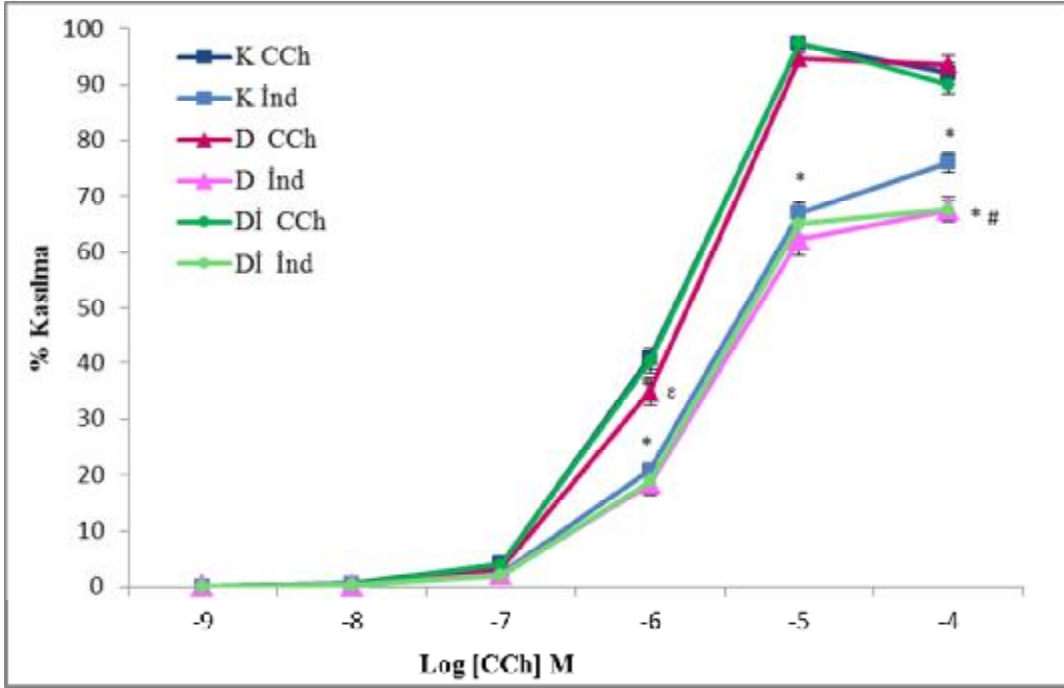
CCh pD_2 değerleri, kontrol grubunda 5.90 ± 0.03 , diyabet grubunda 5.80 ± 0.04 , insülin tedavisi verilen diyabet grubunda 5.91 ± 0.03 olarak hesaplandı. Grupların CCh pD_2 değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.101$, Şekil 13).



Şekil 13. Tüm gruplarda CCh pD_2 değerleri

6.2.3. İndometazin Varlığında CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler

İndometazin (5×10^{-7} M) varlığında, CCh (10^{-9} - 10^{-4} M) % kasılma yanıtları, tüm deney gruplarında anlamlı olarak inhibe oldu ($p < 0.001$, Şekil 14). CCh kasılma yanıtları indometazin varlığında, kontrol grubunda %23, diyabet grubunda %30, insülin tedavisi verilen diyabet grubunda %29 oranında azaldı ($p < 0.001$).



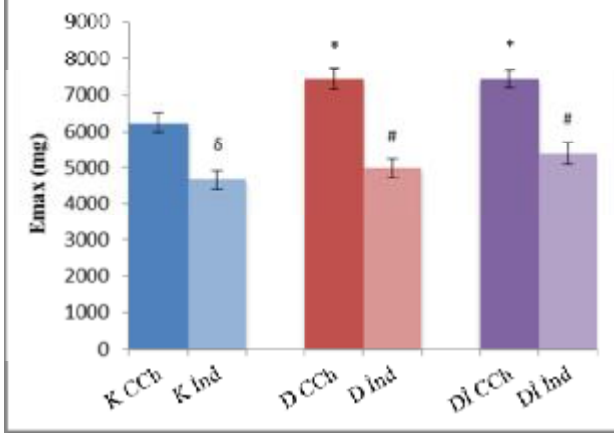
Şekil 14. Tüm gruplarda indometazin yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ grup içi CCh'lerine göre,

ε $p < 0.01$ K CCh ve Dİ CCh'e göre,

$p < 0.001$ K İnd'e göre

İndometazin varlığında CCh Emax değerleri, tüm gruplarda azaldı ($p<0.001$, Şekil 15). İndometazin yokluğunda kontrol, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında sırasıyla 6233 ± 259 , 7437 ± 276 , 7445 ± 243 olan CCh Emax değerleri, indometazin varlığında sırasıyla 4658 ± 248 ($p<0.01$), 4971 ± 257 ($p<0.001$) ve 5389 ± 298 mg ($p<0.001$) olarak bulundu. İndometazinin yaptığı inhibisyon açısından, üç grup arasında anlamlı bir fark yoktu.

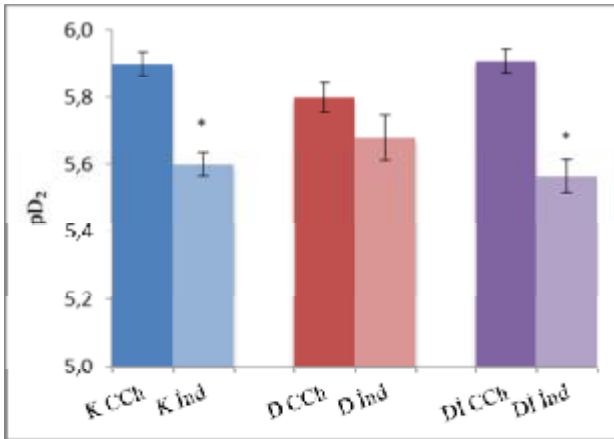


Şekil 15. Tüm gruplarda indometazin yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

* $p<0.05$ K CCh'e göre,

$p<0.001$, δ $p<0.01$ grup içi CCh'lerine göre

İndometazin varlığında CCh pD_2 değerlerinin tüm gruplarda azaldığı, ancak diyabetik grupta anlamlı bir azalmanın olmadığı gözlemlendi ($p<0.001$, Şekil 16). İndometazin yokluğunda kontrol, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında sırasıyla 5.90 ± 0.03 , 5.80 ± 0.04 , 5.91 ± 0.03 olan CCh pD_2 değerleri, indometazin varlığında sırasıyla 5.60 ± 0.03 ($p<0.001$), 5.68 ± 0.07 ve 5.57 ± 0.05 ($p<0.001$) olarak bulundu.



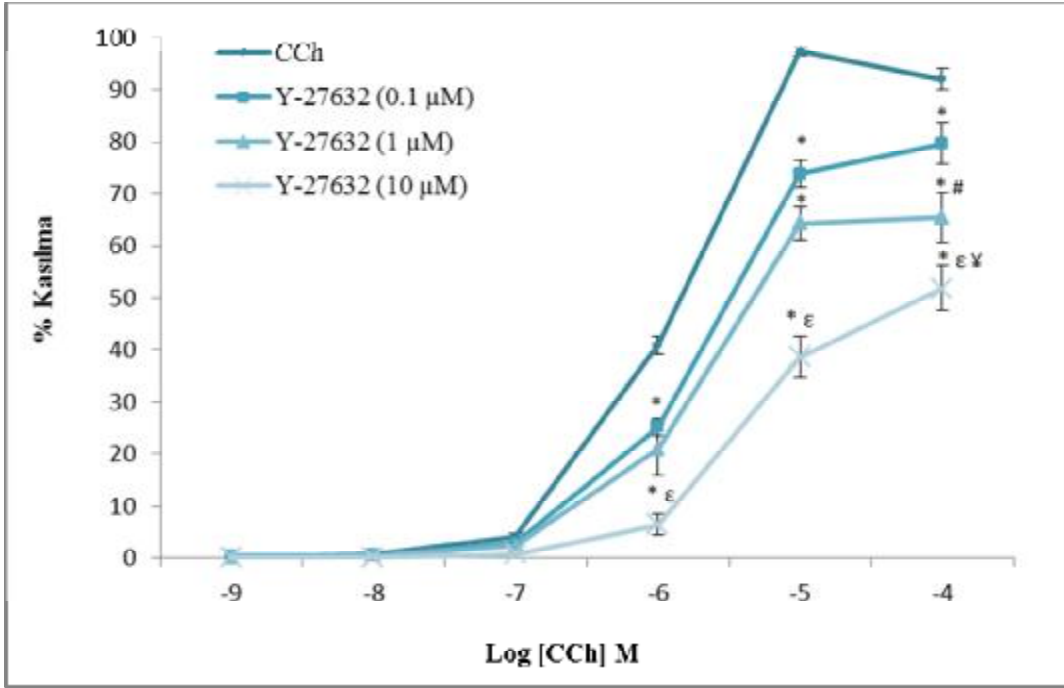
Şekil 16. Tüm gruplarda indometazin yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

* $p<0.001$ grup içi CCh'lerine göre

6.2.4. Kontrol Grubunda Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler

6.2.4.a. Rho Kinaz İnhibitörü Y-27632 Varlığında CCh Yanıtları

Y-27632 varlığında CCh (10^{-9} - 10^{-4} M) kasılmaları, inhibitör yokluğunda elde edilmiş CCh yanıtlarının yüzdesi olarak alındığında, Y-27632'nin doza bağımlı (0.1, 1 ve 10 μ M) olarak CCh'e bağlı kasılma yanıtlarını inhibe ettiği gözlemlendi. CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon sırasıyla %20, %30 ve %48 olarak bulundu ($p < 0.001$, Şekil 17).



Şekil 17. Kontrol grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

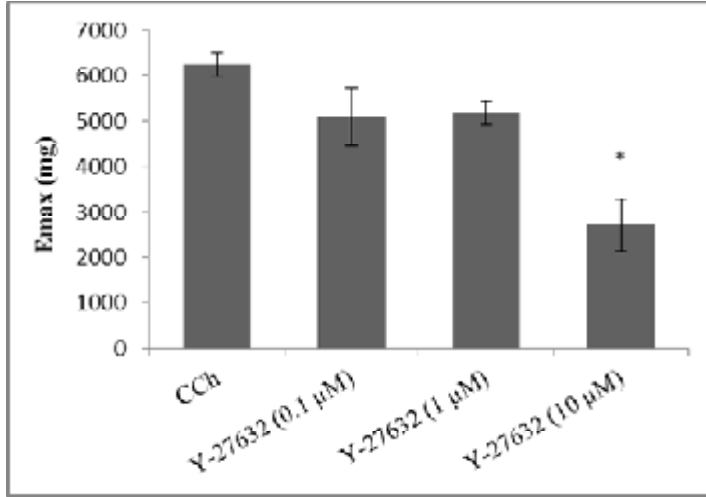
* $p < 0.001$ CCh'e göre,

ε $p < 0.001$ Y-27632 (0.1 ve 1 μ M)'a göre

$p < 0.01$ Y-27632 (0.1 μ M)'a göre

¥ $p < 0.01$ Y-27632 (1 μ M)'a göre

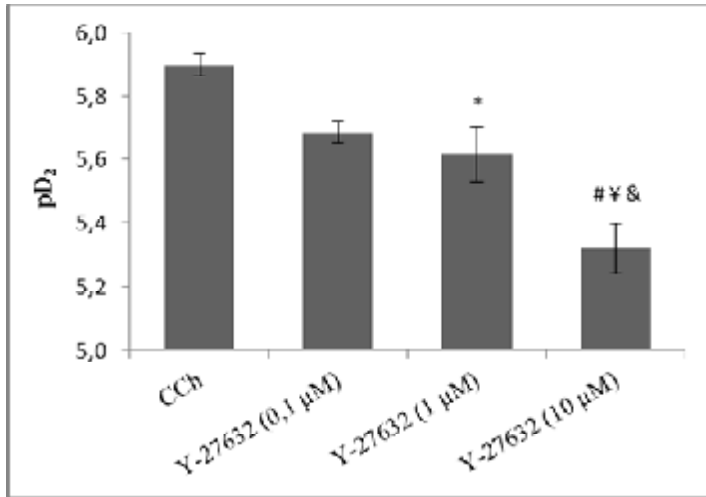
CCh Emax değerleri, Y-27632 varlığında üç konsantrasyonda da (0.1, 1 ve 10 μ M) azalmış olmakla birlikte istatistiksel anlamlılık sadece yüksek (10 μ M) konsantrasyonda bulundu ($p<0.001$, Şekil 18). Kontrol CCh Emax değeri 6233 ± 259 mg iken, Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırasıyla 5084 ± 630 , 5162 ± 245 ve 2708 ± 519 mg'a düştü.



Şekil 18. Kontrol grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

* $p<0.001$ CCh'e göre

Kontrol CCh pD_2 değeri (5.90 ± 0.03), Y-27632 varlığında (0.1, 1 ve 10 μ M), sırası ile 5.69 ± 0.03 , 5.62 ± 0.09 ve 5.25 ± 0.05 olarak hesaplandı ($p<0.001$, Şekil 19).



Şekil 19. Kontrol grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

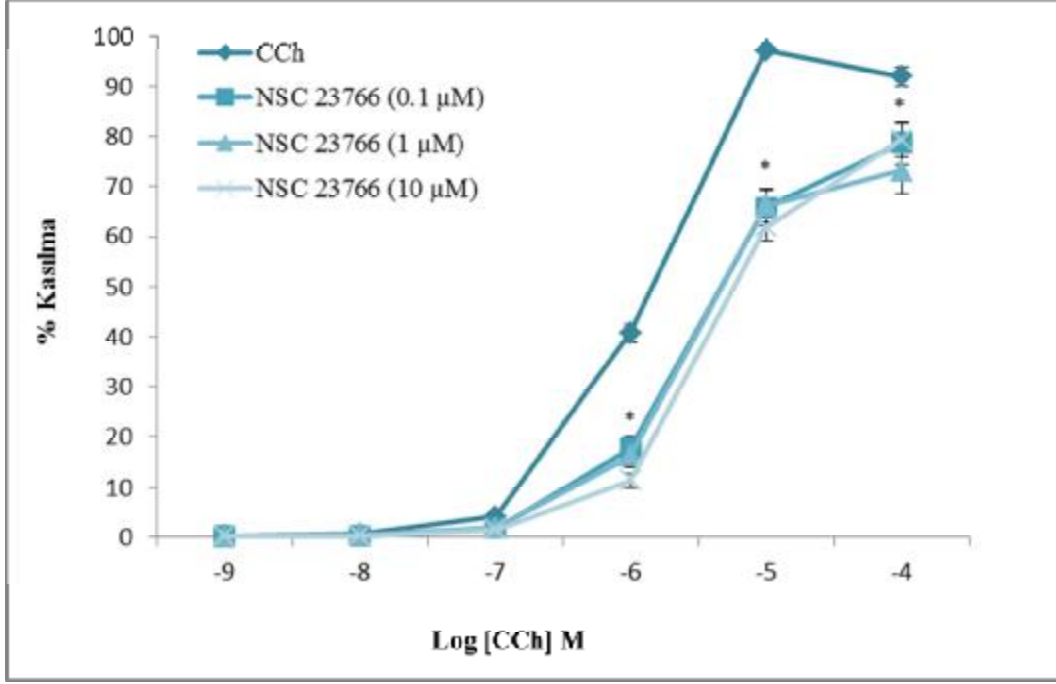
$p<0.001$, * $p<0.01$ CCh'e göre,

¥ $p<0.001$ Y-27632 (0.1 μ M)'a göre,

& $p<0.05$ Y-27632 (1 μ M)'a göre

6.2.4.b. Rac1 İnhibitörü NSC 23766 Varlığında CCh Yanıtları

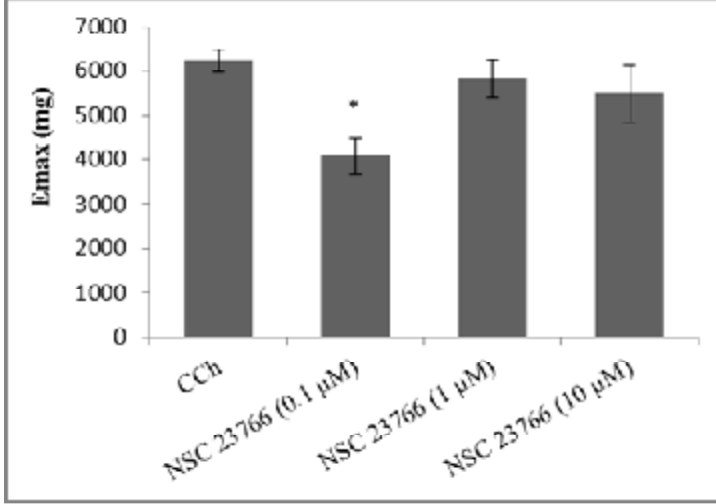
NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında elde edilen CCh (10^{-9} - 10^{-4} M) yanıtları, inhibitör yokluğunda elde edilen CCh kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak alındığında, NSC 23766'nın CCh kasılma yanıtlarını dozdan bağımsız olarak inhibe ettiği gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 20). NSC 23766'nın üç konsantrasyonun yaptığı inhibisyonlar arasında anlamlı fark bulunmadı ve CCh kasılma yanıtlarında yaptıkları inhibisyon sırasıyla %21, %24 ve %21 idi.



Şekil 20. Kontrol grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ CCh'e göre

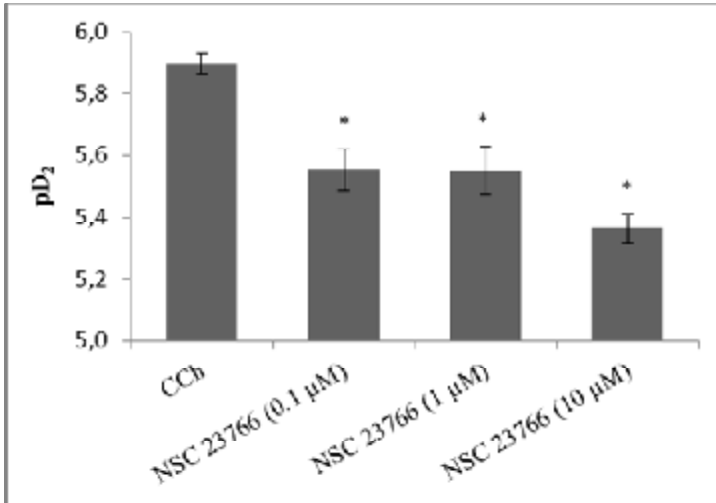
CCh Emax değerleri, en fazla 0.1 μ M NSC 23766 varlığında olmak üzere azaldı ($p<0.01$, Şekil 21). CCh Emax değerleri, 0.1, 1 ve 10 μ M NSC 23766 varlığında sırası ile 4087 ± 406 , 5833 ± 421 ve 5485 ± 646 mg bulundu.



Şekil 21. Kontrol grubunda NSC 23766 yokluğında ve varlığında CCh Emax değerleri

* $p<0.01$ CCh'e göre

NSC 23766'nın tüm konsantrasyonları (0.1, 1 ve 10 μ M) CCh pD_2 değerlerini, anlamlı olarak azalttı ($p<0.001$, Şekil 22). CCh pD_2 değerlerinin, 0.1 ve 1 μ M NSC 23766 varlığında benzer olduğu (sırası ile 5.55 ± 0.07 ve 5.55 ± 0.08), 10 μ M NSC 23766 varlığında (5.37 ± 0.05) ise daha fazla azaldığı saptandı ($p<0.001$).

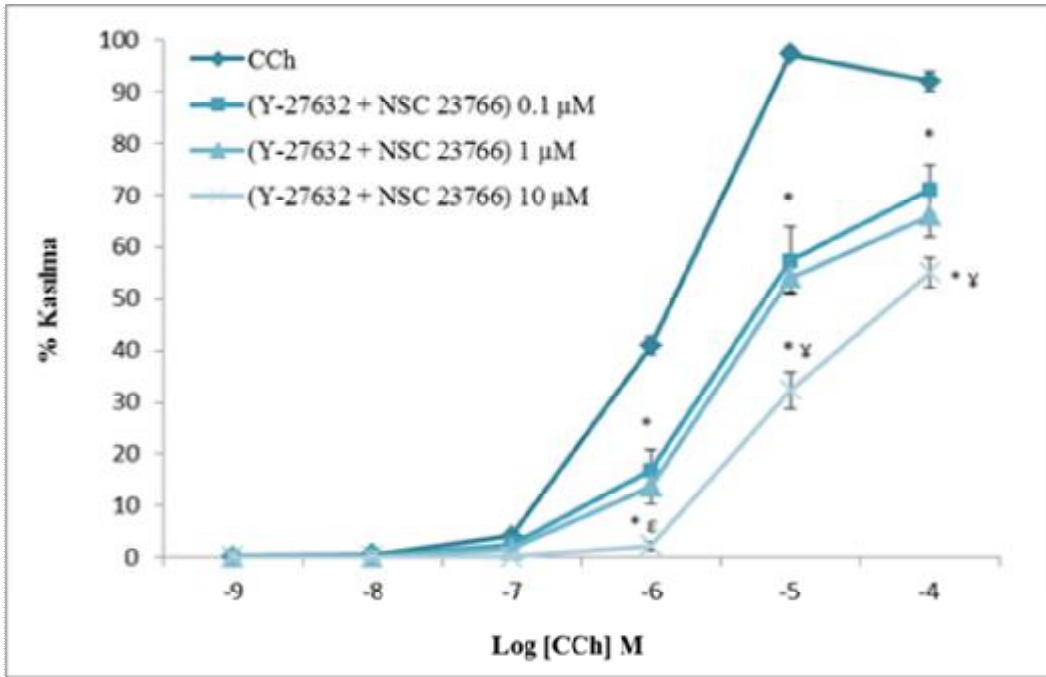


Şekil 22. Kontrol grubunda NSC 23766 yokluğında ve varlığında CCh pD_2 değerleri

* $p<0.001$ CCh'e göre

6.2.4.c. Rho kinaz İnhibitörü Y-27632 + Rac1 inhibitörü NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

Ekimolar konsantrasyonlarda kombine edilmiş Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M)'nın üç konsantrasyonu da CCh'ün % kasılma yanıtlarını anlamlı olarak inhibe etti ($p < 0.001$, Şekil 23). CCh % kasılma yanıtlarında yaptığı inhibisyon açısından, kombine Y-27632 + NSC 23766 uygulamasının 0.1 ve 1 μ M konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmazken, 10 μ M konsantrasyonda istatistiksel anlamlılık bulundu ($p < 0.001$). CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon sırasıyla %30, %32 ve %44 idi.

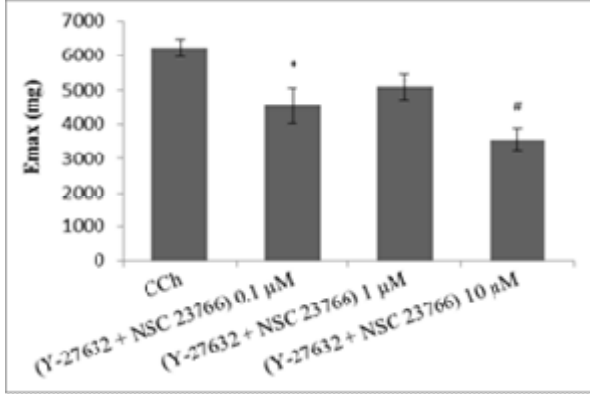


Şekil 23. Kontrol grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ CCh'e göre,

¥ $p < 0.001$, ϵ $p < 0.01$ (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μ ve 1 μ M 'a göre

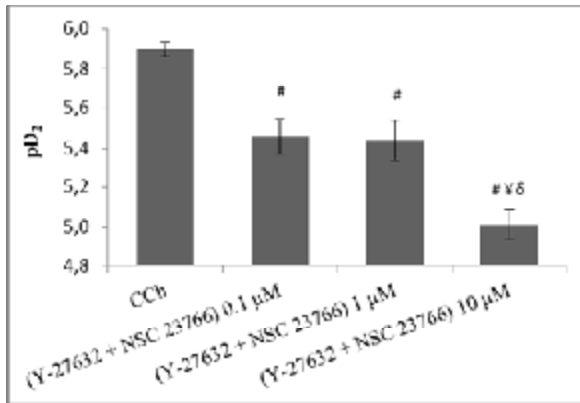
Ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında CCh Emax değerlerinde, üç konsantrasyonda (0.1, 1 ve 10 μ M) da azalma görülürken ($p<0.001$, Şekil 24); en fazla azalmanın, Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun 10 μ M konsantrasyonunda olduğu görüldü ($p<0.001$). CCh Emax değerleri, Y-27632 + NSC 23766'nın üç konsantrasyonunda sırası ile 4546 ± 525 , 5108 ± 364 ve 3569 ± 311 mg bulundu.



Şekil 24. Kontrol grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

$p<0.001$, * $p<0.05$ CCh'e göre

Kontrol grubunda, ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında, CCh pD_2 değerlerinin anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0.001$, Şekil 25). CCh pD_2 değeri (5.90 ± 0.03)'nin, ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında, sırası ile 5.46 ± 0.09 , 5.44 ± 0.10 ve 5.01 ± 0.08 olduğu saptandı ($p<0.001$).



Şekil 25. Kontrol grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

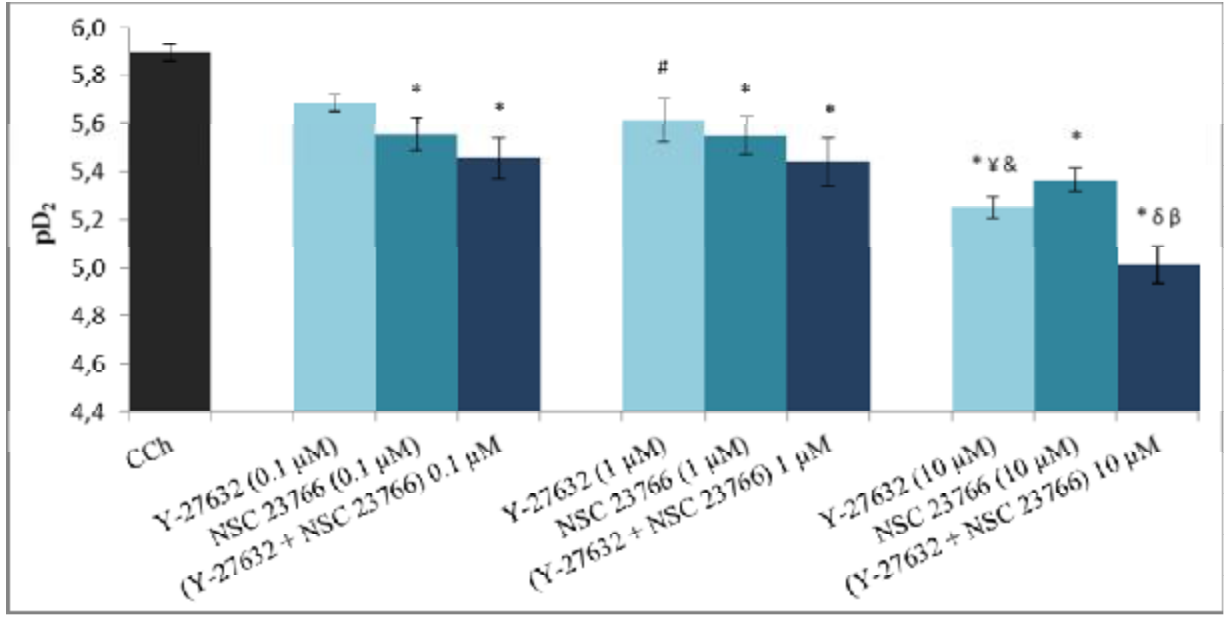
$p<0.001$ CCh'e göre,

¥ $p<0.001$ (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μ M'a göre,

δ $p<0.01$ (Y-27632 + NSC 23766) 1 μ M'a göre

6.2.5.b. Kontrol Grubunda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

CCh pD₂ değerlerinde, Y-27632'nin ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonlarının doza bağımlı (inhibisyon 0.1 ve 1 µM dozlarında benzer olmakla birlikte, 10 µM dozunda belirgin), NSC 23766'nın ise dozdan bağımsız inhibisyon yaptığı gözlemlendi (p<0.001, Şekil 27). Kontrol CCh pD₂ değeri 5.90±0.03 iken, en fazla düşmenin görüldüğü 10 µM Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında 5.01±0.08 olarak bulundu (p<0.001).



Şekil 27.Kontrol grubunda küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında CCh pD₂ değerleri

* p<0.001, # p<0.01 CCh'e göre,

¥ p<0.001 Y-27632 (0.1 µM)'a göre,

&p<0.05 Y-27632 (1 µM)'a göre,

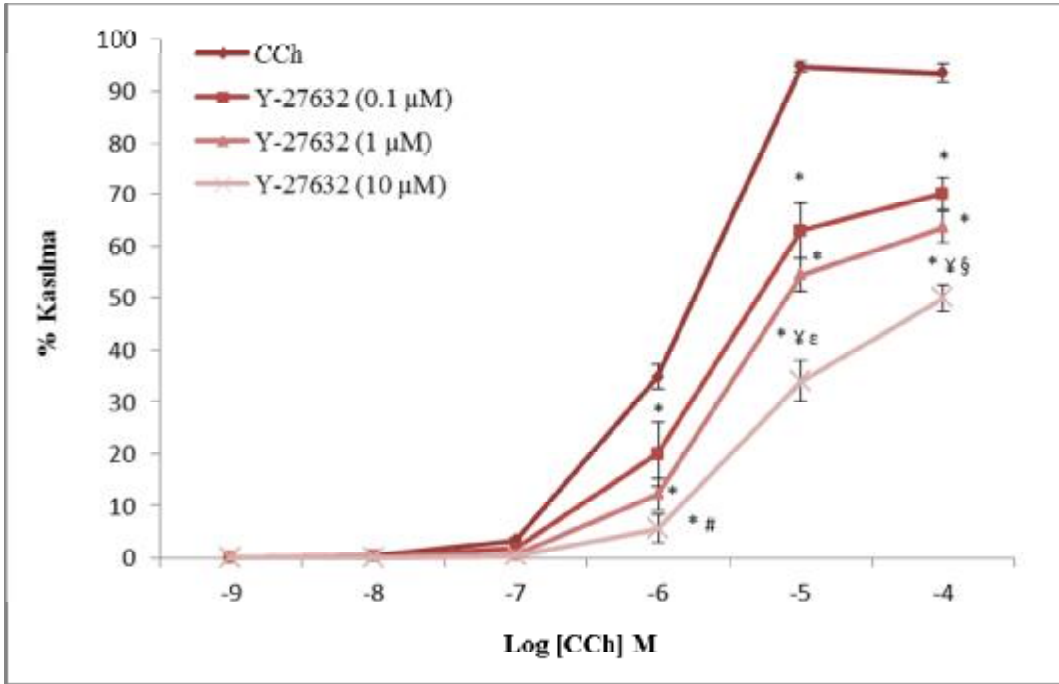
δ p<0.001 Y-27632 + NSC 23766 (0.1 µM)'a göre,

β p<0.01 Y-27632 + NSC 23766 (1 µM) ve NSC 23766 (10 µM)'a göre

6.2.6. Diyabet Grubunda Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler

6.2.6.a. Rho Kinaz İnhibitörü Y-27632 Varlığında CCh Yanıtları

Diyabet grubunda Y-27632 varlığında CCh (10^{-9} - 10^{-4} M) kasılmaları, kontrol CCh yanıtlarının yüzdesi olarak alındığında, Y-27632'nin tüm konsantrasyonlarının (0.1, 1 ve 10 μ M), CCh yanıtlarında inhibisyon yaptığı gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 28). Ancak, 0.1 ile 1 μ M Y-27632 varlığında CCh yanıtlarında görülen inhibisyon (%30 ve %32) arasında anlamlı bir fark yok iken, Y-27632 (10 μ M) varlığında oluşan inhibisyon (%47) en fazla idi.



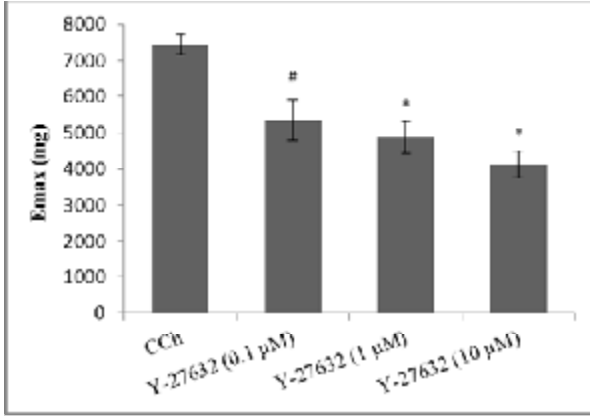
Şekil 28. Diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ CCh'e göre,

¥ $p < 0.001$, # $p < 0.05$ Y-27632 (0.1 μ M)'a göre,

ε $p < 0.001$, § $p < 0.05$ Y-27632 (1 μ M)'a göre

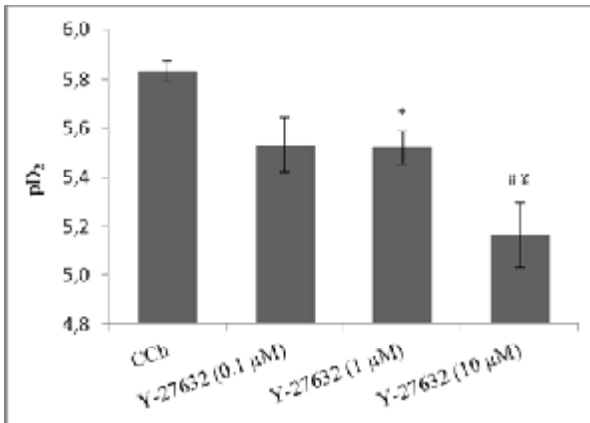
Diyabet grubunda, Y-27632 varlığında, CCh Emax değerleri anlamlı olarak azaldı ($p<0.001$, Şekil 29). Ancak Y-27632'nin dozları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Y-27632 yokluğunda 7437 ± 276 mg olan CCh Emax değeri, Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μM) varlığında sırası ile 5337 ± 555 , 4885 ± 435 ve 4126 ± 394 mg saptandı.



Şekil 29. Diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

* $p<0.001$, # $p<0.01$ CCh'e göre

Diyabet grubunda Y-27632 varlığında, CCh pD_2 değerlerinde azalma olduğu görüldü ($p<0.001$, Şekil 30). Kontrol CCh pD_2 değeri (5.80 ± 0.04), Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μM) varlığında sırasıyla 5.53 ± 0.11 , 5.52 ± 0.07 ve 5.16 ± 0.13 olarak hesaplandı. Y-27632'nin düşük (0.1) ve orta (1 μM) konsantrasyonlarında elde edilen CCh pD_2 değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmaz iken, Y-27632'nin yüksek (10 μM) konsantrasyonunda elde edilen CCh pD_2 değerinin, kontrol ve 1 μM Y-27632 varlığında elde edilen CCh pD_2 değerlerinden anlamlı olarak daha düşük olduğu bulundu ($p<0.05$).



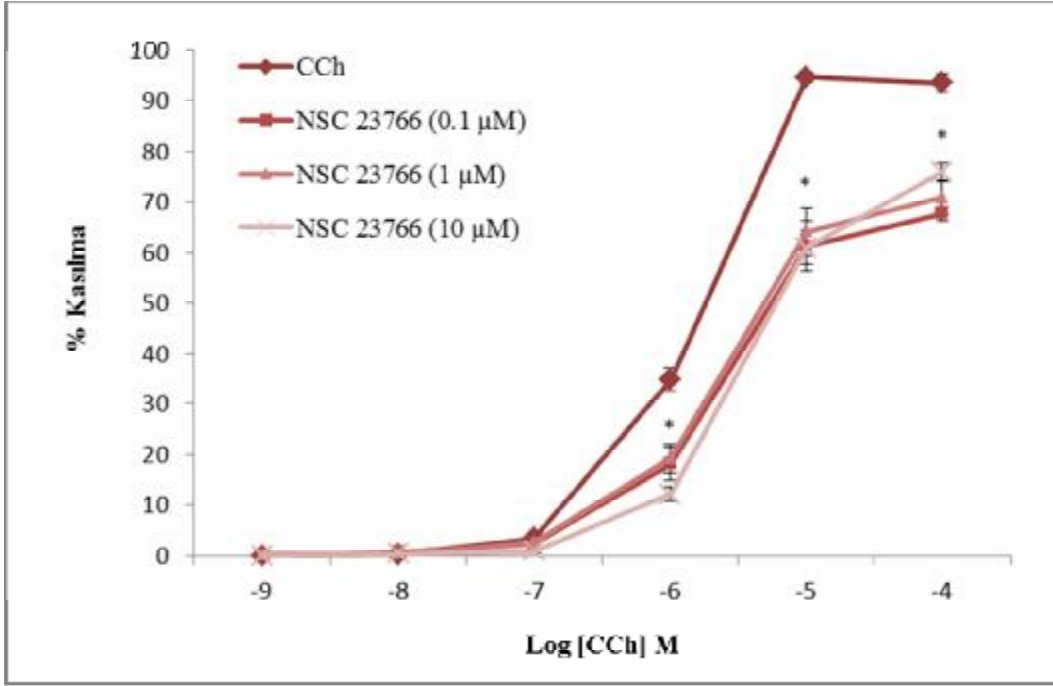
Şekil 30. Diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

$p<0.001$, * $p<0.05$ CCh'e göre,

¥ $p<0.05$ Y-27632 (1 μM)'a göre

6.2.6.b. Rac1 İnhibitörü NSC 23766 Varlığında CCh Yanıtları

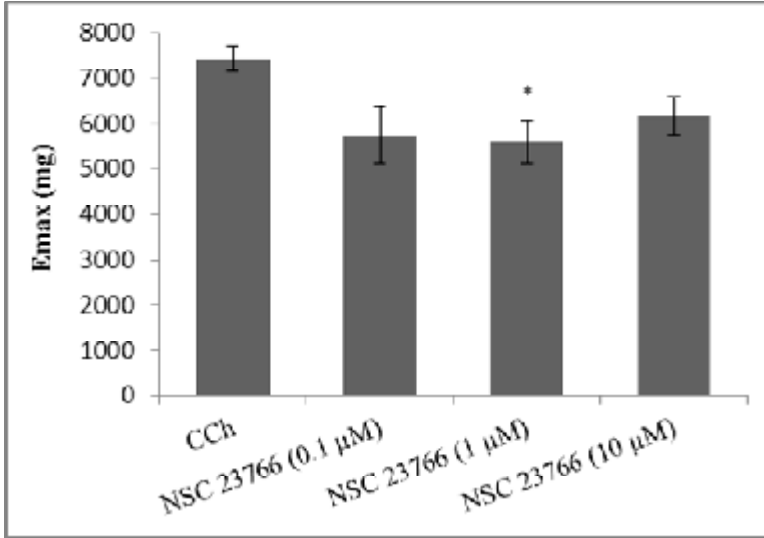
Diyabet grubunda NSC 23766 varlığında, CCh (10^{-9} - 10^{-4} M) kasılmaları, inhibitör yokluğunda elde edilmiş CCh yanıtlarının yüzdesi olarak alındığında, NSC 23766'nın tüm dozlarında (0.1, 1 ve 10 μ M) CCh yanıtlarında inhibisyon yaptığı gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 31). Ancak % CCh kasılma yanıtlarındaki azalma açısından NSC 23766'nın dozları arasında anlamlı bir fark yoktu. CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon sırasıyla %30, %28 ve %24 idi.



Şekil 31. Diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ CCh'e göre

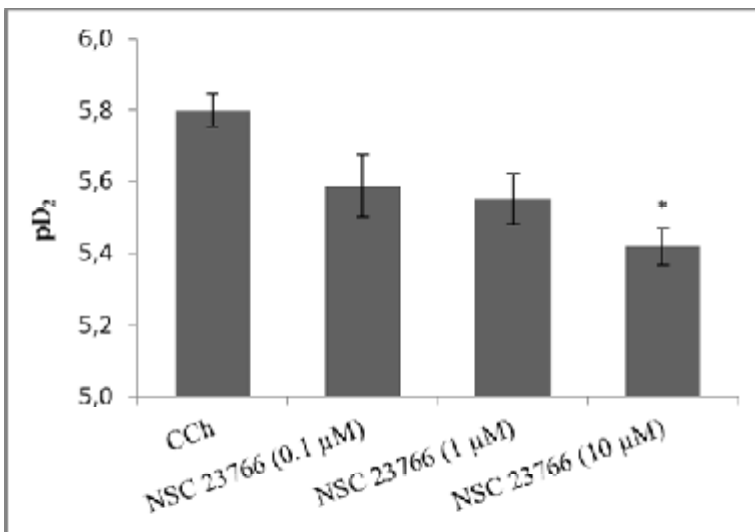
Diyabet grubunda CCh Emax değerlerinin, NSC 23766'nın 1 μ M konsantrasyonunda anlamlı olmak üzere, tüm dozlarında (0.1, 1 ve 10 μ M) azaldığı gözlemlendi ($p < 0.01$, Şekil 32). NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığından bulunan CCh Emax değerleri sırası ile 5747 ± 625 , 5586 ± 476 ve 6161 ± 417 mg bulundu.



Şekil 32. Diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

* $p < 0.05$ CCh'e göre

Diyabet grubunda CCh pD_2 değerlerinin NSC 23766'nın, 10 μ M konsantrasyonunda anlamlı olmak üzere, tüm dozlarında (0.1, 1 ve 10 μ M) azaldığı gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 33). Kontrol CCh pD_2 değeri (5.80 ± 0.04), NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırasıyla, 5.59 ± 0.09 , 5.55 ± 0.07 ve 5.42 ± 0.05 olarak hesaplandı.

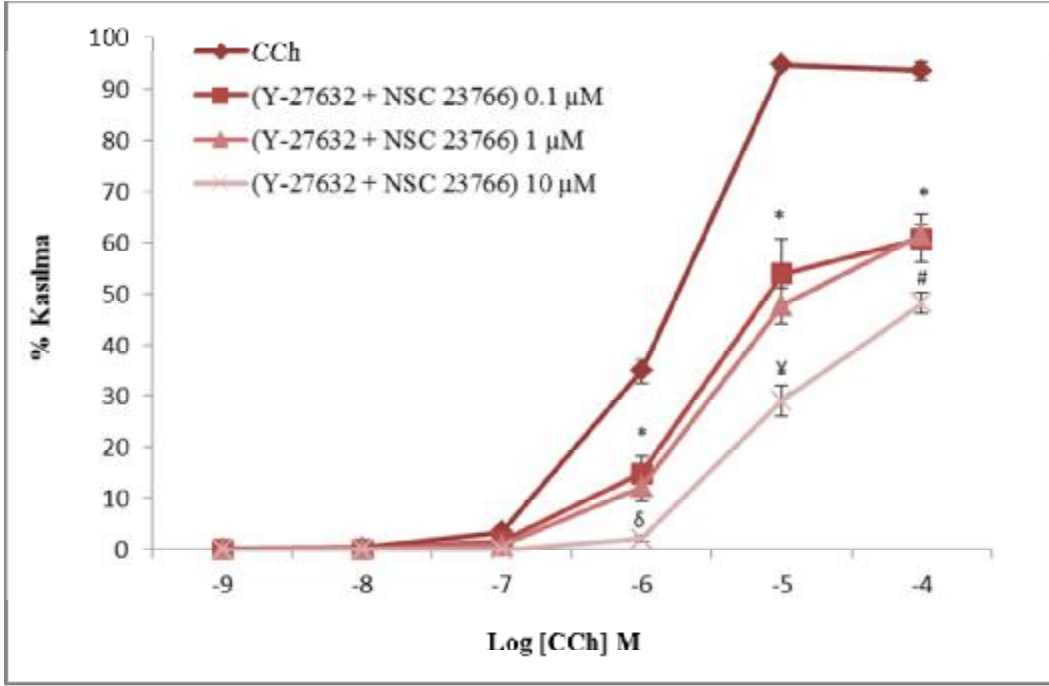


Şekil 33. Diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

* $p < 0.001$ CCh'e göre

6.2.6.c. Rho Kinaz İnhibitörü Y-27632 + Rac1 İnhibitörü NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

Diyabet grubunda, ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında, CCh (10^{-9} - 10^{-4} M) kasılmaları, kontrol CCh yanıtlarının yüzdesi olarak alındığında, Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun, tüm dozlarda (0.1, 1 ve 10 μ M) CCh yanıtlarında doza bağımlı inhibisyon yaptığı gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 34). CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon sırasıyla %36, %38 ve %52 idi.

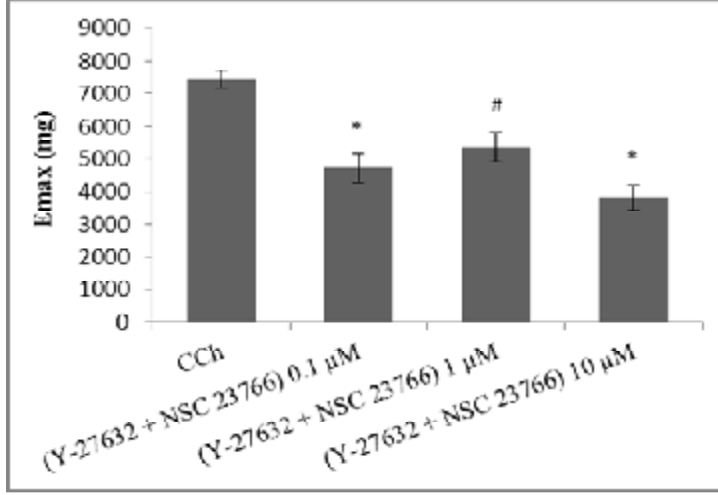


Şekil 34. Diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ CCh'e göre,

¥ $p < 0.001$, # $p < 0.01$, δ $p < 0.05$ (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 μ M'a göre

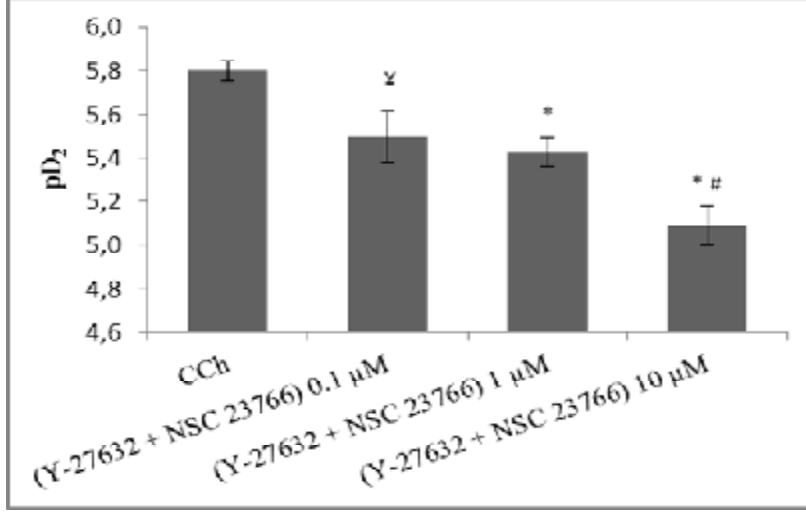
Diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun tüm konsantrasyonlarında (0.1, 1 ve 10 μ M), CCh Emax değerleri anlamlı olarak azaldı ($p<0.001$, Şekil 35). Ancak inhibitör kombinasyonlarının CCh Emax değerlerinde yaptığı inhibisyon doza bağımlı değildi ve üç konsantrasyon arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol CCh Emax değeri 7437 ± 449 mg iken, Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 4718 ± 449 , 5360 ± 464 ve 3817 ± 386 mg bulundu.



Şekil 35. Diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

* $p<0.001$, # $p<0.01$ CCh'e göre

Y-27632 + NSC 23766 varlığında, pD_2 değerlerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0.001$, Şekil 36). Kontrol CCh pD_2 değeri 5.80 ± 0.04 iken, kombine inhibitör varlığında (0.1, 1 ve 10 μM) sırasıyla 5.50 ± 0.12 , 5.43 ± 0.06 ve 5.09 ± 0.09 bulundu. Y-27632 + NSC 23766'nın yüksek doz (10 μM) kombinasyonunun, düşük ve orta doz kombinasyonlarına göre, CCh pD_2 değerlerini anlamlı olarak daha fazla düşürdüğü bulundu ($p<0.001$).



Şekil 36. Diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

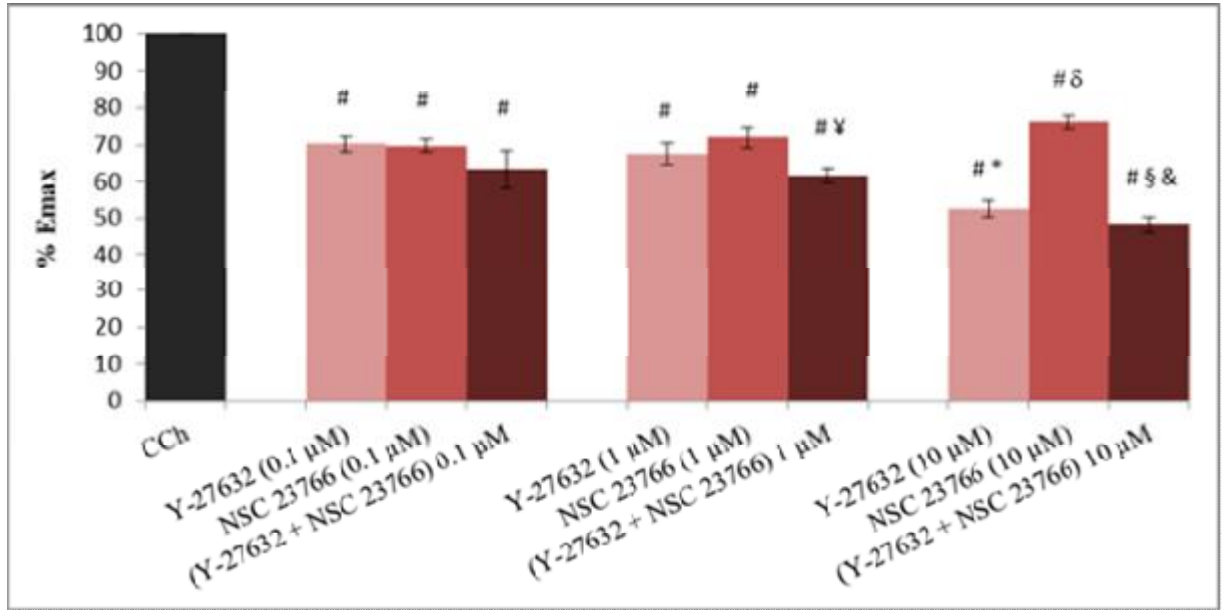
* $p<0.001$, ¥ $p<0.05$ CCh'e göre,

$p<0.05$ (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 μM 'a göre

6.2.7. Diyabet Grubunda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

6.2.7.a. Diyabet Grubunda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax Değerlerinin Karşılaştırılması

İnhibitör varlığında elde edilen CCh Emax değerleri, kontrol CCh Emax değerlerinin yüzdesi olarak alındığında; Y-27632, NSC 23766 ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun tüm dozlarda (0.1, 1 ve 10 µM), CCh Emax değerlerinde anlamlı inhibisyon yaptığı gözlemlendi (p<0.001, Şekil 37). CCh Emax değerlerinde, Y-27632'nin ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun doza bağımlı inhibisyon yaptığı gözlemlendi. CCh Emax değerlerinde NSC 23766'nın yaptığı inhibisyon düşük dozda (0.1 µM) daha fazla (%30) idi. CCh Emax değerlerinde en fazla inhibisyon, ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun 10 µM dozunda (%52) görüldü (p<0.001).



Şekil 37. Diyabet grubunda küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri

p<0.001 CCh'e göre,

* p<0.001 Y-27632 (0.1 ve 1 µM)'a göre,

δ p<0.01 NSC 23766 (0.1 µM)'a göre,

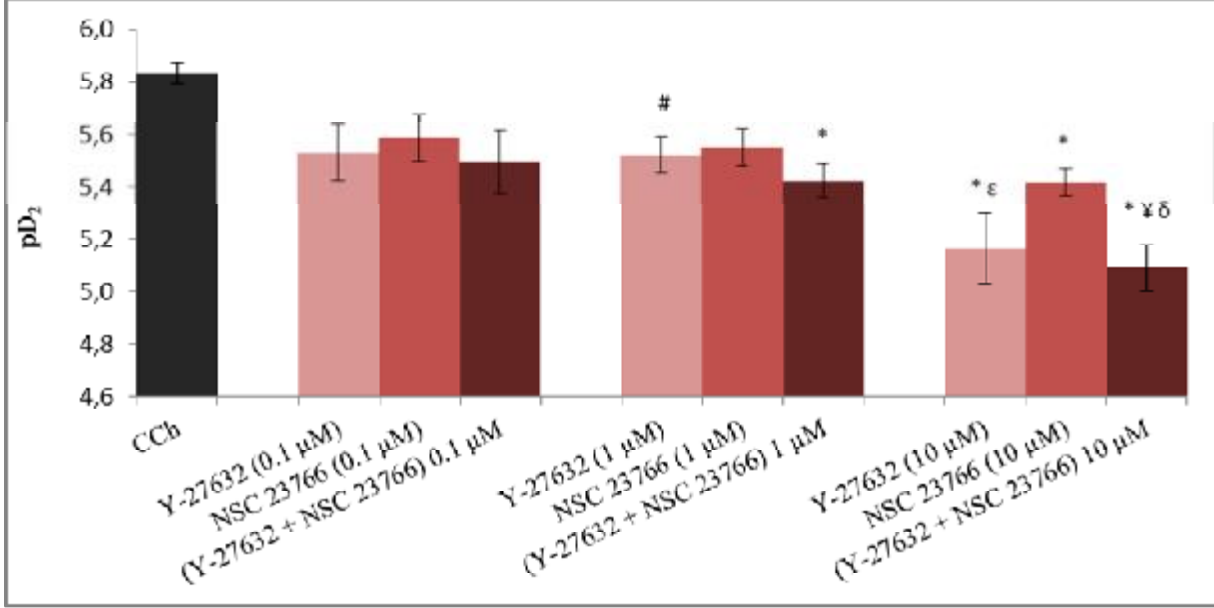
§ p<0.001 (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 µM'a göre,

¥ p<0.001 NSC 23766 (1 µM)'a göre,

& p<0.001 NSC 23766 (10 µM)'a göre

6.2.7.b. Diyabet Grubunda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

CCh pD₂ değerlerinde, Y-27632, NSC 23766 ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun tüm konsantrasyonlarda (0.1, 1 ve 10 µM) inhibisyon yaptığı gözlemlendi (p<0.001, Şekil 38). CCh pD₂ değerlerinde en fazla inhibisyon, ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun 10 µM dozunda (5.09±0.09) görüldü (p<0.001).



Şekil 38. Diyabet grubunda küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında CCh pD₂ değerleri

* p<0.001, # p<0.01 CCh'e göre,

ε p<0.05 Y-27632 (1 µM)'a göre,

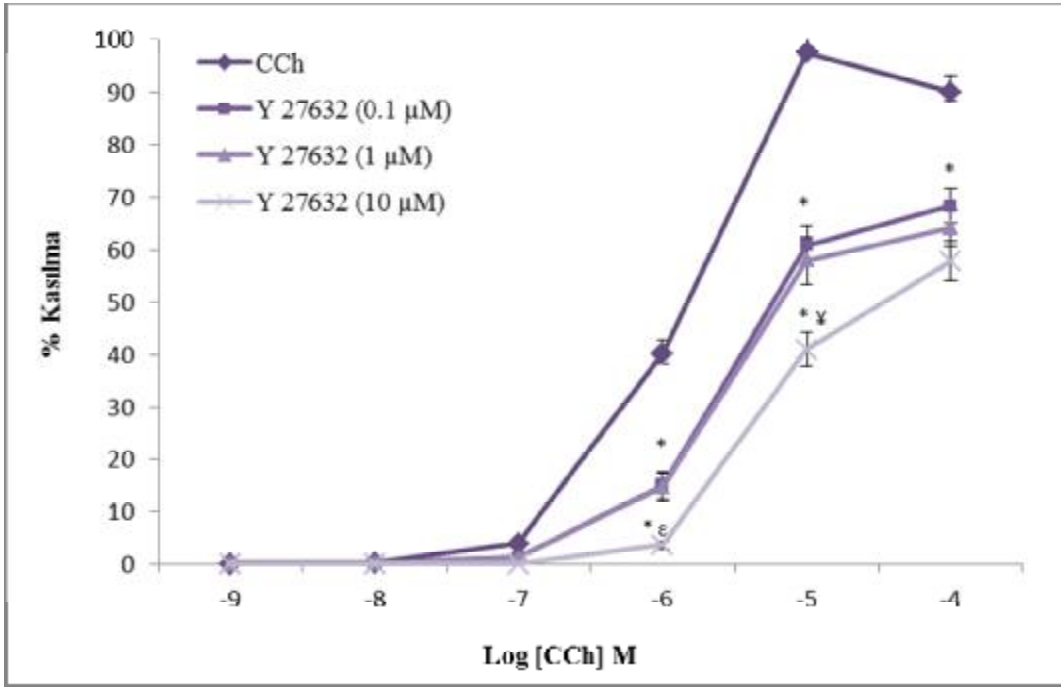
¥ p<0.05 (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 µM'a göre,

δ p<0.05 NSC 23766 (10 µM)'a göre

6.2.8. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler

6.2.8.a. Rho Kinaz İnhibitörü Y-27632 Varlığında CCh Yanıtları

CCh (10^{-9} - 10^{-4} M) kasımları, inhibitör yokluğunda elde edilmiş CCh yanıtlarının yüzdesi olarak alındığında; insülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632'nin tüm konsantrasyonlarda (0.1, 1 ve 10 μ M) CCh kasılma yanıtlarında inhibisyon yaptığı gözlemlendi ($p<0.001$, Şekil 39). Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında, CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon sırasıyla %27, %34 ve %42 idi.



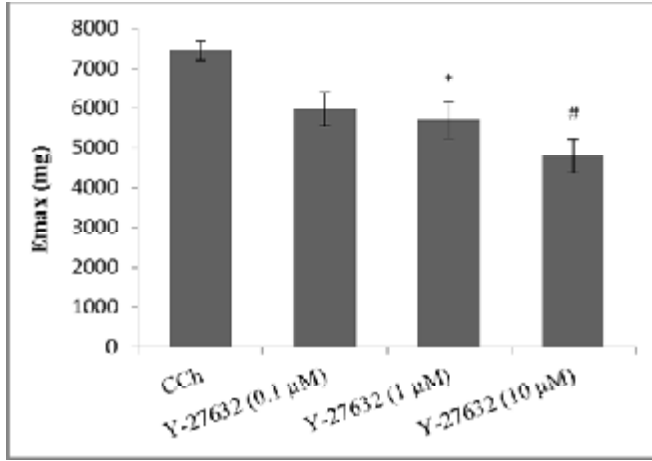
Şekil 39. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p<0.001$ CCh'e göre,

¥ $p<0.001$ Y-27632 (0.1 ve 1 μ M)'a göre,

ε $p<0.05$ Y-27632 (0.1 μ M)'a göre

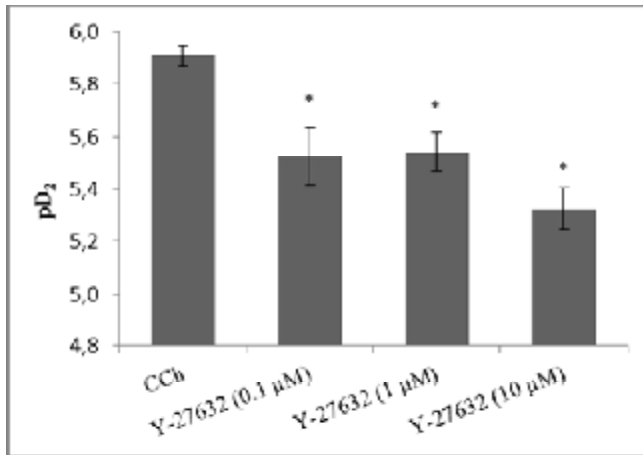
Kontrol Emax değeri (7445 ± 243 mg), Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 5963 ± 426 , 5703 ± 459 ve 4783 ± 421 mg bulundu. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda, CCh Emax değerlerinin, en fazla 10 μ M Y-27632 varlığında olmak üzere Y-27632'nin tüm konsantrasyonlarında azaldığı gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 40).



Şekil 40. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

$p < 0.001$, * $p < 0.05$ CCh'e göre

İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda, 5.91 ± 0.03 olan kontrol CCh pD_2 değeri, Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırasıyla 5.52 ± 0.11 , 5.54 ± 0.08 ve 5.32 ± 0.08 olarak bulundu ($p < 0.001$, Şekil 41).

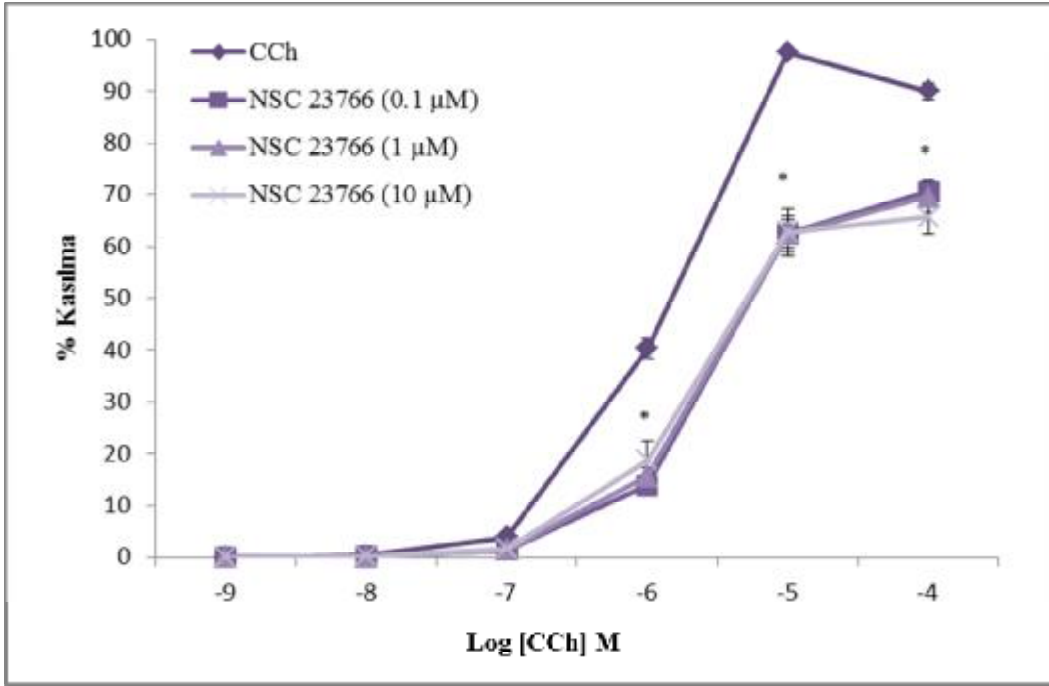


Şekil 41. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

* $p < 0.001$ CCh'e göre

6.2.8.b. Rac1 İnhibitörü NSC 23766 Varlığında CCh Yanıtları

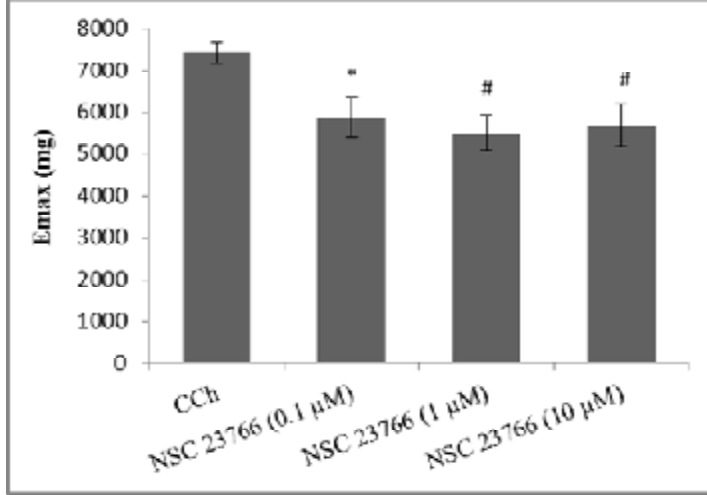
CCh (10^{-9} - 10^{-4} M) kasılmaları, kontrol CCh yanıtlarının yüzdesi olarak alındığında; insülin tedavisi verilen diyabet grubunda NSC 23766'nın tüm konsantrasyonlarda (0.1, 1, 10 μ M), CCh yanıtlarında inhibisyon yaptığı gözlemlendi ($p<0.001$, Şekil 42). NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında üç konsantrasyonda CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon sırasıyla %29, %29 ve %27 idi. NSC 23766'nın dozları arasında CCh kasılma yanıtlarında yaptıkları inhibisyon açısından anlamlı bir fark yoktu.



Şekil 42. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p<0.001$ CCh'e göre

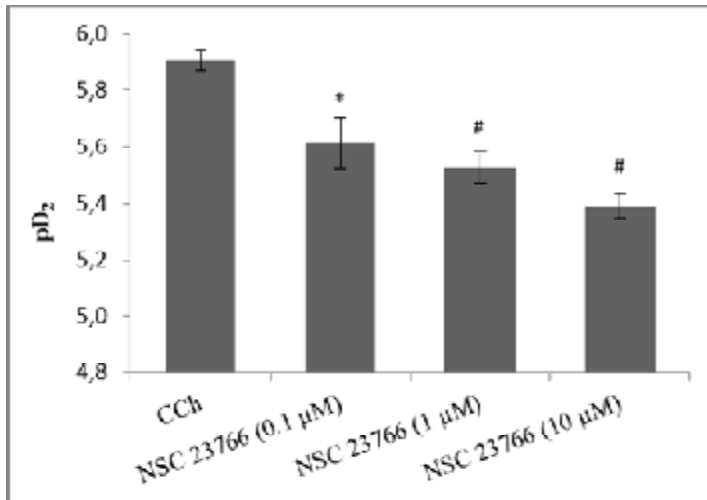
Kontrol CCh Emax değeri 7445 ± 243 mg iken, NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 5875 ± 476 , 5505 ± 423 ve 5679 ± 501 mg bulundu. CCh Emax değerlerinin NSC 23766'nın (0.1, 1 ve 10 μ M) tüm konsantrasyonlarında anlamlı olarak düştüğü ($p < 0.001$), ancak dozlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (Şekil 43).



Şekil 43. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

$p < 0.01$, * $p < 0.05$ CCh'e göre

Kontrol CCh pD_2 değeri, 5.91 ± 0.03 iken, NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında (sırasıyla 5.62 ± 0.09 , 5.53 ± 0.06 ve 5.39 ± 0.05) doza bağımlı olarak azaldı ($p < 0.001$, Şekil 44).

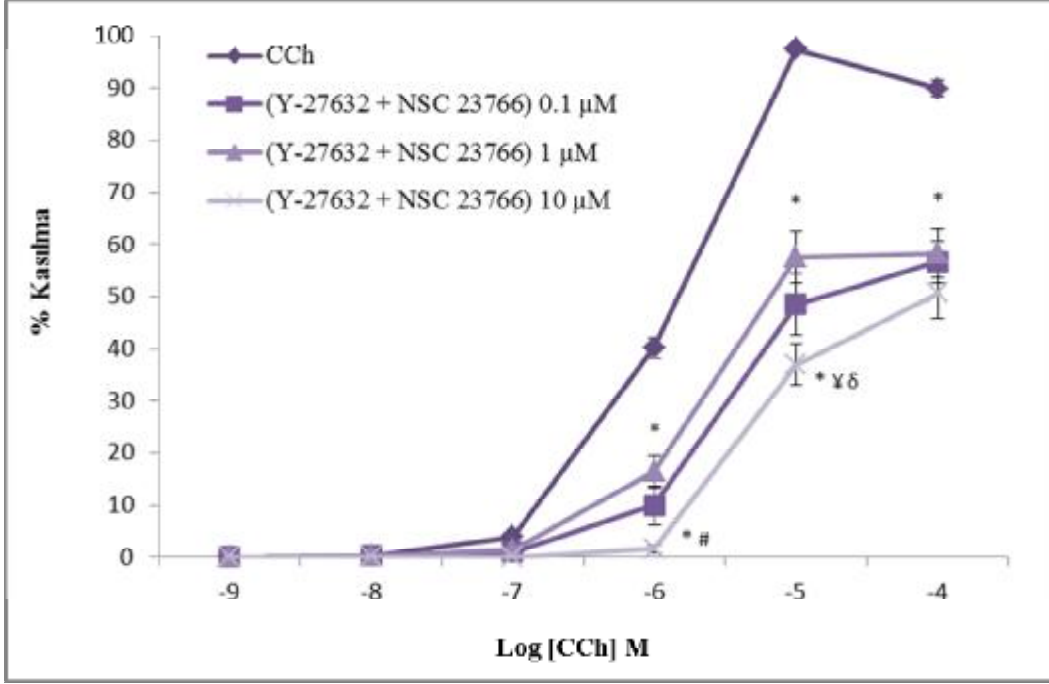


Şekil 44. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

$p < 0.001$, * $p < 0.01$ CCh'e göre

6.2.8.c. Rho Kinaz İnhibitörü Y-27632 + Rac1 İnhibitörü NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun, en fazla 10 μ M konsantrasyonunda olmak üzere tüm konsantrasyonlarında (0.1, 1 ve 10 μ M), CCh kasılma yanıtlarını inhibe ettiği gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 45). CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon sırasıyla %41, %39 ve %49 idi.



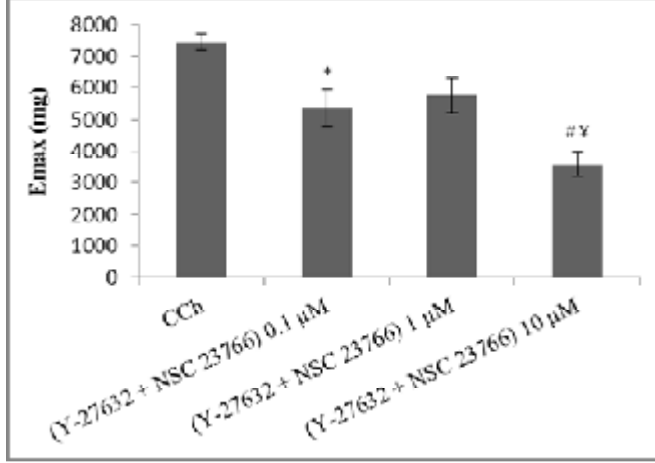
Şekil 45. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ CCh'e göre,

¥ $p < 0.05$ (Y-27632 + NSC 23766) 0,1 μ M'a göre,

δ $p < 0.001$, # $p < 0.01$ (Y-27632 + NSC 23766) 1 μ M'a göre

Kontrol CCh Emax değeri 7445 ± 243 mg iken, NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 5363 ± 579 , 5752 ± 557 ve 3569 ± 380 mg olarak bulundu. Y-27632 + NSC 23766, CCh Emax değerlerini, en fazla 10 μ M konsantrasyonunda olmak üzere tüm konsantrasyonlarında düşürdü ($p < 0.001$, Şekil 46). Y-27632 + NSC 23766'nın, 0.1 ve 10 μ M doz kombinasyonlarının yaptığı inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı iken, 1 μ M doz kombinasyonunun yaptığı inhibisyon anlamlı değildi.

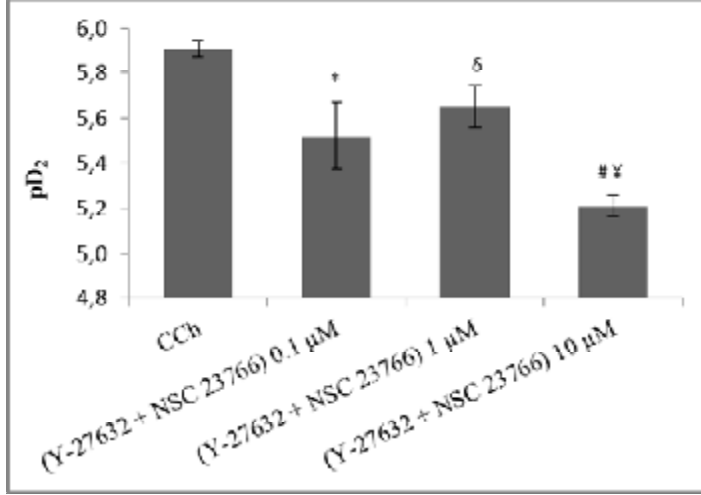


Şekil 46. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

$p < 0.001$, * $p < 0.05$ CCh'e göre,

¥ $p < 0.01$ (Y-27632 + NSC 23766) 1 μ M'a göre

CCh pD₂ değerleri, Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 µM) varlığında, sırasıyla 5.52±0.15, 5.65±0.09 ve 5.21±0.05 olarak bulundu (p<0.001, Şekil 47). CCh pD₂ değerlerindeki düşme, Y-27632 + NSC 23766'nın tüm konsantrasyonlarda görölmekle birlikte en fazla 10 µM konsantrasyonunda gözlemlendi (p<0.001).



Şekil 47. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğında ve varlığında CCh pD₂ değerleri

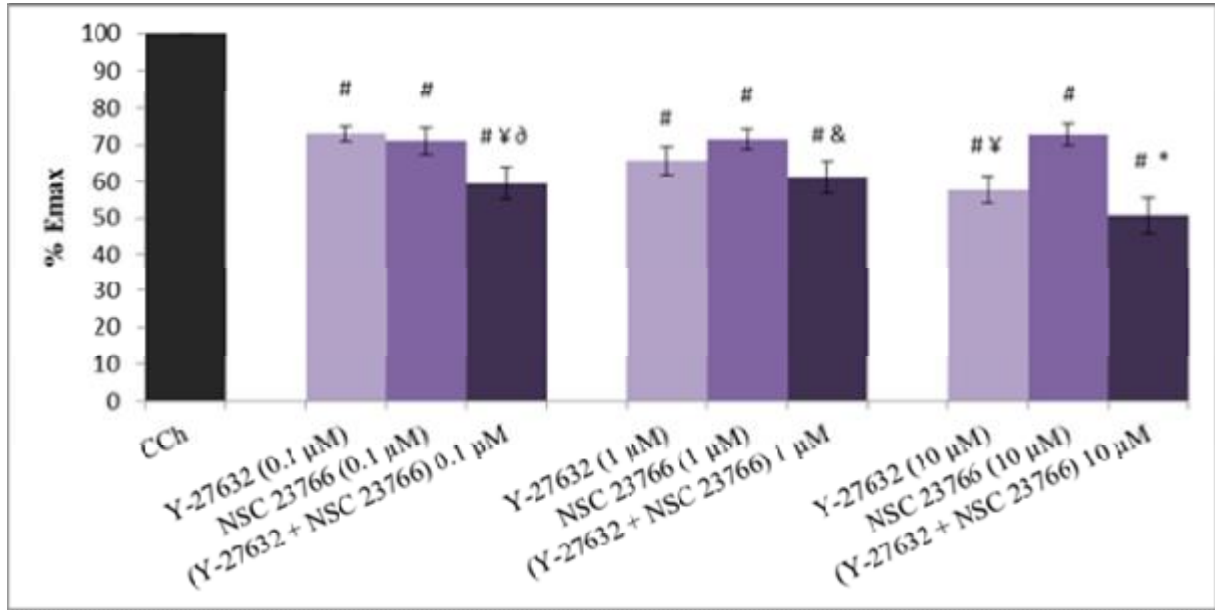
p<0.001, * p<0.01, δ p<0.05 CCh'e göre,

¥ p<0.01 (Y-27632 + NSC 23766) 1 µM'a göre

6.2.9. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

6.2.9.a. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax Değerlerinin Karşılaştırılması

İnhibitör varlığında elde edilen CCh Emax değerleri, kontrol CCh Emax değerlerinin yüzdesi olarak alındığında; Y-27632, NSC 23766 ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun tüm dozlarda (0.1, 1 ve 10 µM), CCh Emax değerlerinde anlamlı inhibisyon yaptığı gözlemlendi (p<0.001, Şekil 48). CCh Emax değerlerinde, Y-27632 ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu doza bağımlı inhibisyon yaparken; NSC 23766'nın yaptığı inhibisyonunda, dozlar arasında anlamlı bir fark yoktu. CCh Emax değerlerinde en fazla inhibisyon, Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun 10 µM dozunda (%49) görüldü (p<0.001).



Şekil 48. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri

p<0.001 CCh'e göre,

¥ p<0.001 Y-27632 (0.1 µM)'a göre,

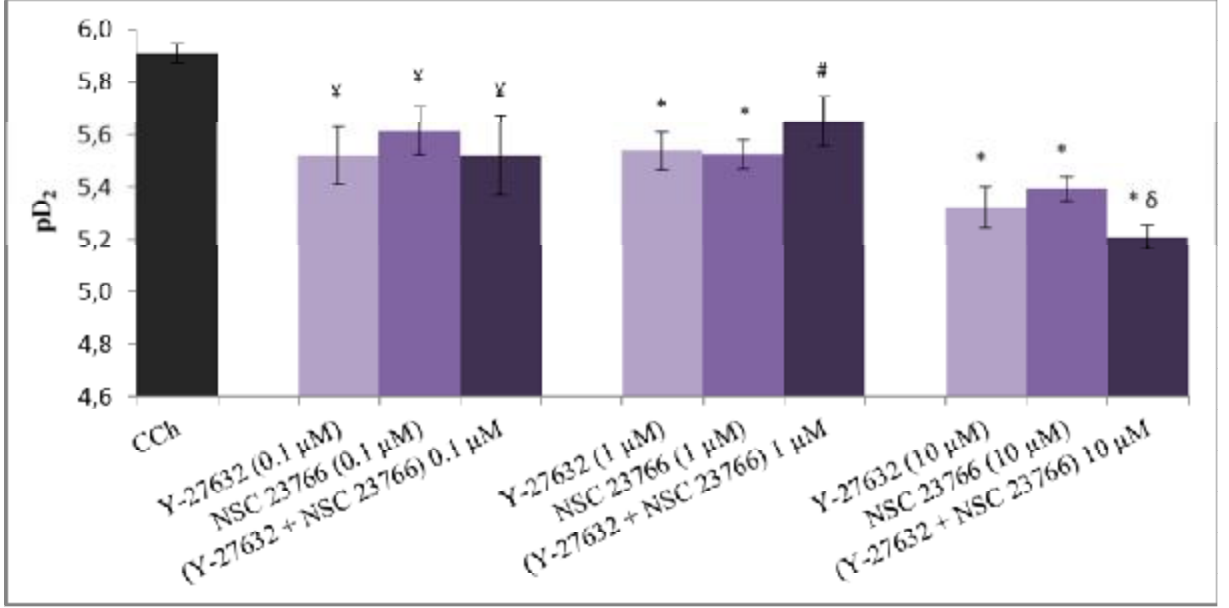
∂ p<0.01 NSC 23766 (0.1 µM)'a göre,

& p<0.05 NSC 23766 (1 µM)'a göre,

* p<0.001 NSC 23766 (10 µM)'a göre

6.2.9.b. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

CCh pD₂ değerlerinde, Y-27632, NSC 23766 ve Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun tüm dozlarda (0.1, 1 ve 10 µM) anlamlı azalma yaptığı gözlemlendi (p<0.001, Şekil 49). CCh pD₂ değerlerindeki azalma, en fazla Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun 10 µM (5.21±0.05) konsantrasyonunda görüldü (p<0.001).



Şekil 49. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında pD₂ değerleri

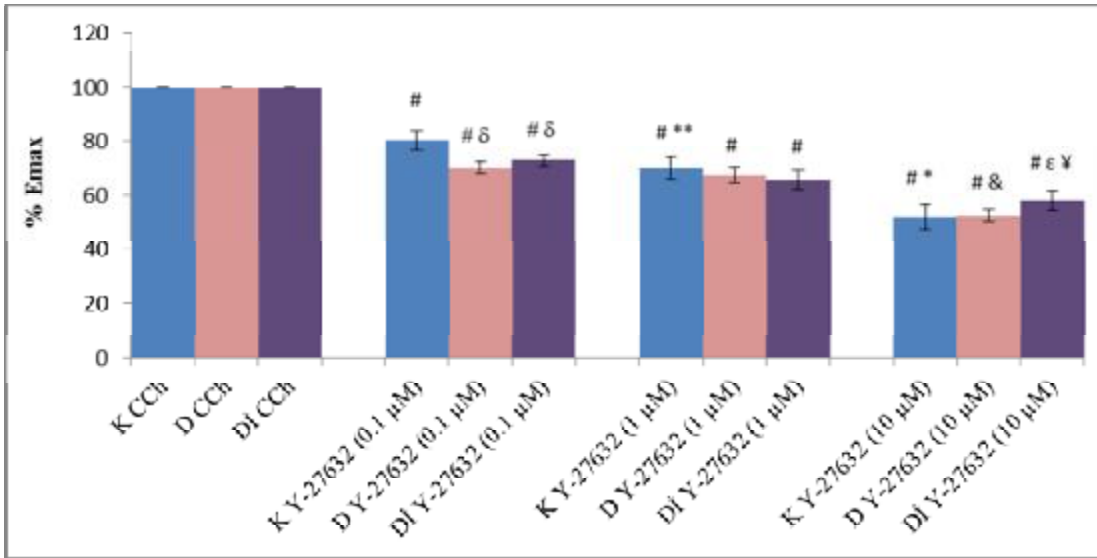
* p< 0.001, ¥ p<0.01, # p< 0.05 CCh'e göre,

δ p<0.01 (Y-27632 + NSC 23766) 1 µM'a göre

6.2.10. Tüm Gruplarda Tek ve Kombine Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

6.2.10.a. Tüm Gruplarda Y-27632 Varlığında CCh Emax Değerlerinin Karşılaştırılması

Y-27632 varlığında, tüm gruplarda CCh Emax değerleri anlamlı olarak azaldı ($p < 0.001$, Şekil 50). Diyabet grubundaki azalma, kontrol grubundakine göre daha fazla idi; istatistiksel anlamlılık sadece 0.1 μM Y-27632 varlığında gözlemlendi ($p < 0.05$). Yüksek doz Y-27632 (10 μM) varlığında, insülin tedavisi verilen diyabet grubunda CCh Emax değerleri, kontrol ve diyabet grubundan daha fazla idi, ancak sadece kontrol grubu ile anlamlı fark bulundu. CCh Emax değerlerinde en fazla azalma, üç grupta da Y-27632'nin yüksek konsantrasyonunda (10 μM) gözlemlendi ($p < 0.001$). Y-27632 varlığında tüm deney gruplarında doza bağımlı inhibisyon görüldü.



Şekil 50. Tüm gruplarda Y-27632 yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri

$p < 0.001$ grup içi CCh'lerine göre,

* $p < 0.001$ K Y-27632 (0.1 ve 1 μM)'a göre,

** $p < 0.05$ K Y-27632 (0.1 μM)'a göre,

& $p < 0.001$ D Y-27632 (0.1 ve 1 μM),

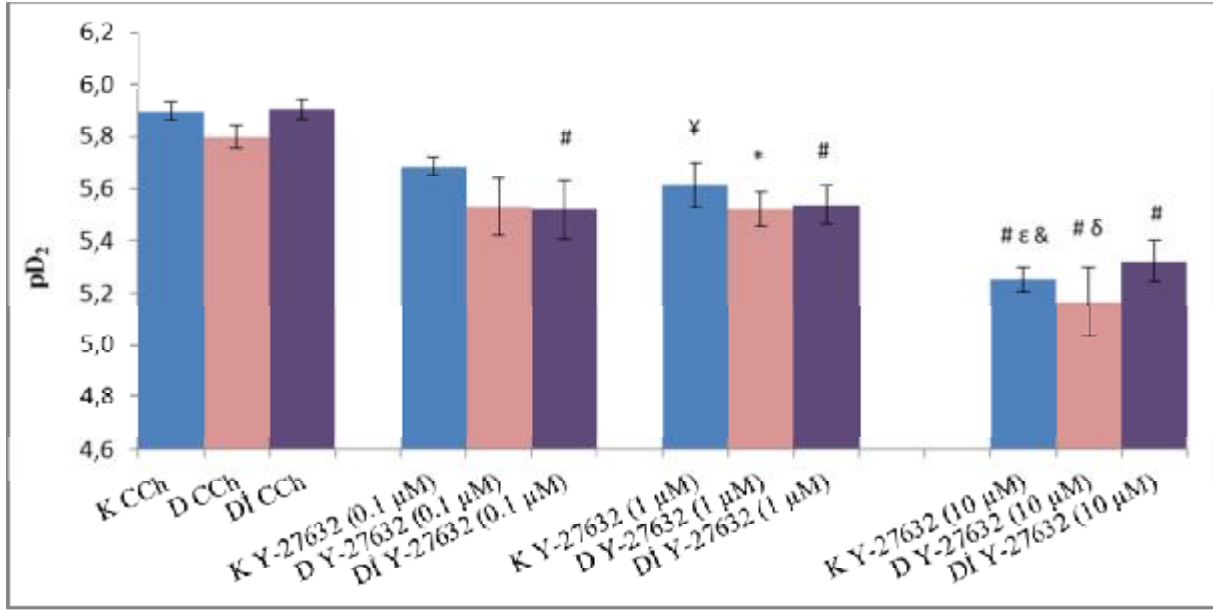
ε $p < 0.001$ DI Y-27632 (0.1 μM)'a göre,

δ $p < 0.001$ K Y-27632 (0.1 μM)'a göre,

¥ $p < 0.05$ K Y-27632 (10 μM)'a göre

6.2.10.b. Tüm Gruplarda Y-27632 Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

Y-27632'nin, tüm gruplarda CCh pD₂ değerlerini düşürdüğü gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 51). Kontrol CCh pD₂ değerlerine göre anlamlılık, kontrol ve diyabet gruplarında 1 ve 10 μ M Y-27632; insülin tedavisi verilen diyabet grubunda 0.1, 1 ve 10 μ M Y-27632 varlığında saptandı ($p < 0.05$). Tüm deney gruplarında CCh pD₂ değerlerinde en fazla azalma, üç grupta da Y-27632'nin yüksek konsantrasyonunda (10 μ M) gözlemlendi ($p < 0.001$). En düşük pD₂ değeri ise (5.16 ± 0.13), diyabet grubunda 10 μ M Y-27632 varlığında saptandı ($p < 0.001$).



Şekil 51. Tüm gruplarda Y-27632 yokluğunda ve varlığında CCh pD₂ değerleri

$p < 0.001$, ¥ $p < 0.01$, * $p < 0.05$ grup içi CCh'lerine göre,

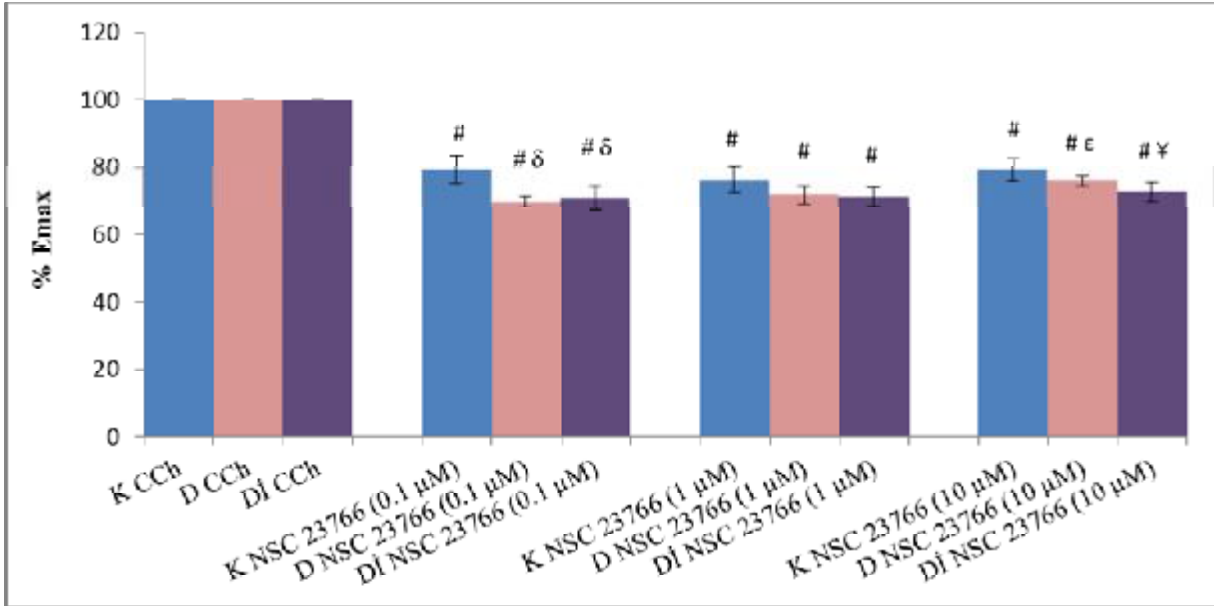
ε $p < 0.001$ K Y-27632 (0.1 μ M)'a göre,

& $p < 0.05$ K Y-27632 (1 μ M)'a göre,

δ $p < 0.05$ D Y-27632 (1 μ M)'a göre

6.2.10.c. Tüm Gruplarda NSC 23766 Varlığında CCh Emax Değerlerinin Karşılaştırılması

Rac1 inhibitörü NSC 23766 varlığında, tüm gruplarda CCh Emax değerleri anlamlı olarak azaldı ($p < 0.001$, Şekil 52), ancak diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarındaki azalma, kontrol grubundan daha fazla idi. Ancak gruplar arasındaki fark açısından kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık, diyabet grubu için sadece $0.1 \mu\text{M}$ NSC 23766 varlığında bulunurken ($p < 0.01$), insülin tedavisi verilen diyabet grubunda ise 0.1 ve $10 \mu\text{M}$ NSC 23766 varlığında bulundu ($p < 0.01$). NSC 23766'nın yaptığı inhibisyon açısından, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. NSC 23766 varlığında, tüm gruplarda CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon, dozdan bağımsız idi.



Şekil 52. Tüm gruplarda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri

$p < 0.001$ grup içi CCh'lerine göre,

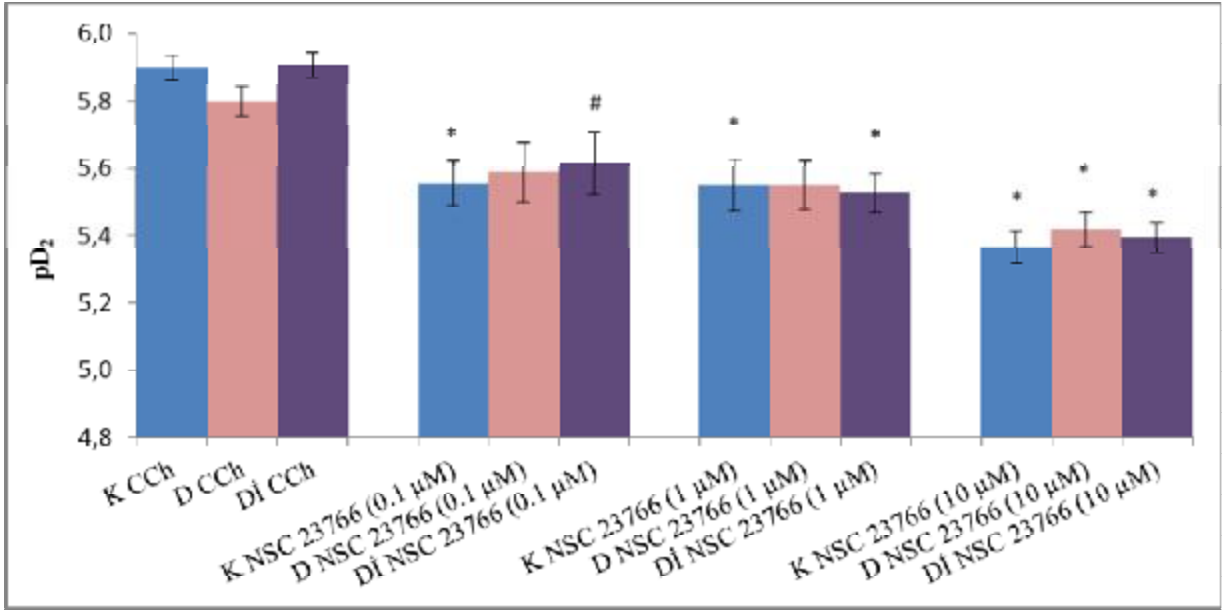
ε $p < 0.01$ D NSC 23766 ($0.1 \mu\text{M}$)'a göre,

δ $p < 0.01$ K NSC 23766 ($0.1 \mu\text{M}$)'a göre,

¥ $p < 0.01$ K NSC 23766 ($10 \mu\text{M}$)'a göre

6.2.10.d. Tüm Gruplarda NSC 23766 Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

NSC 23766'nın, tüm gruplarda CCh pD₂ değerlerini düşürdüğü gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 53). Kontrol CCh pD₂ değerlerine göre anlamlılık, kontrol ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M); diyabet grubunda ise NSC 23766 (10 μ M) varlığında saptandı ($p < 0.05$). CCh pD₂ değerlerinde en fazla azalma, üç grupta da NSC 23766'nın yüksek konsantrasyonunda (10 μ M) gözlemlendi ($p < 0.001$). En düşük pD₂ değeri (5.37 ± 0.05), kontrol grubunda 10 μ M NSC 23766 varlığında saptandı ($p < 0.001$).

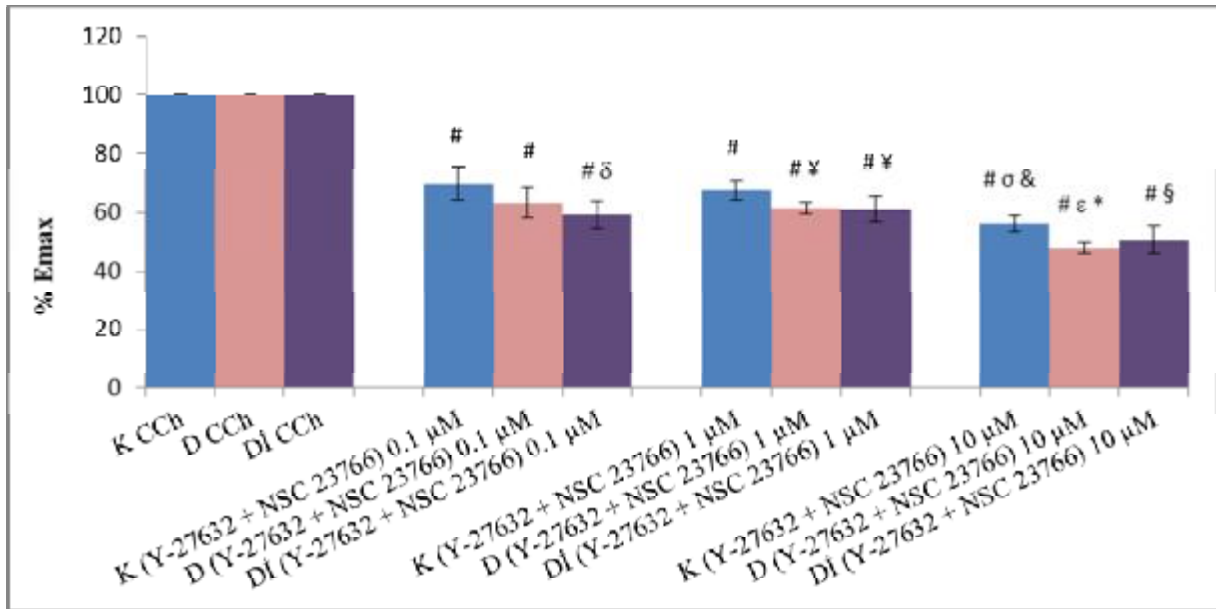


Şekil 53. Tüm gruplarda NSC 23766 yokluğunda ve varlığında CCh pD₂ değerleri

* $p < 0.001$, # $p < 0.01$ grup içi CCh'lerine göre

6.2.10.e. Tüm Gruplarda Y-27632 + NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh Emax Değerlerinin Karşılaştırılması

Y-27632 + NSC23766 varlığında, CCh Emax değerleri anlamlı olarak azaldı ($p < 0.001$, Şekil 54), diyabet grubundaki azalma kontrol grubundakine göre daha fazla idi. Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun CCh Emax değerlerinde oluşturduğu azalma değerlendirildiğinde, diyabet grubunda 1 ve 10 μM konsantrasyonlarda; insülin tedavisi verilen diyabet grubunda ise tüm konsantrasyonlarda gruplar arasında anlamlılık görüldü ($p < 0.001$). İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında CCh Emax değerlerinde anlamlı bir düzelme görülmedi. Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında tüm deney gruplarında doza bağımlı inhibisyon görüldü



Şekil 54. Tüm gruplarda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri

$p < 0.001$ grup içi CCh'lerine göre,

σ $p < 0.001$ K (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μM 'a göre,

& $p < 0.01$ K (Y-27632 + NSC 23766) 1 μM 'a göre

ϵ $p < 0.001$ D (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 μM 'a göre

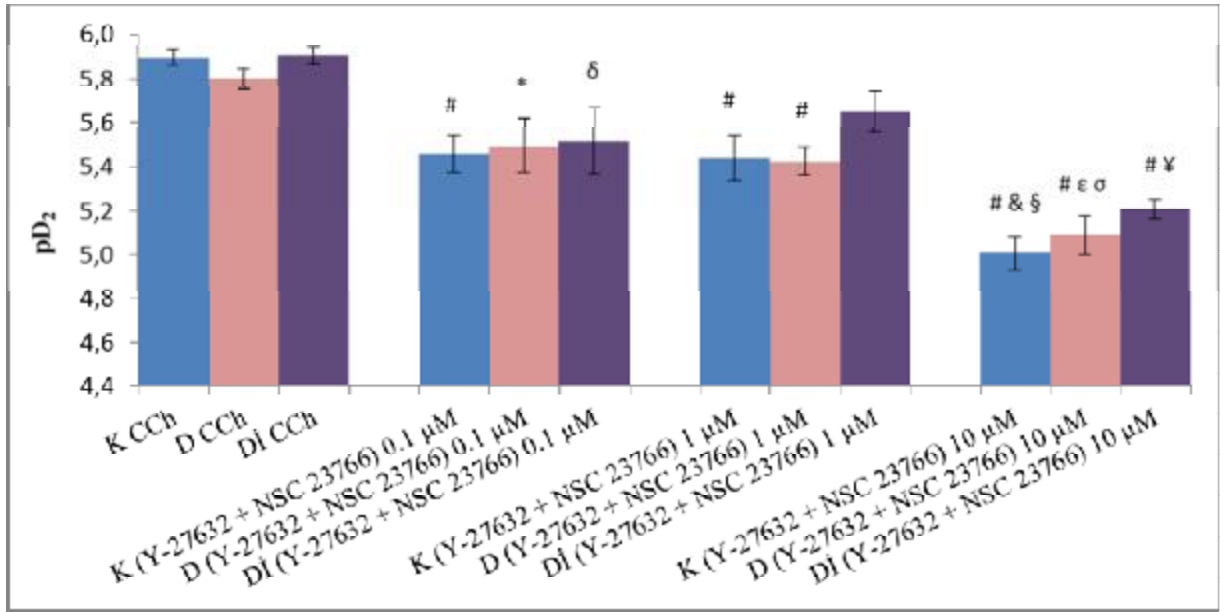
δ $p < 0.01$ K (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μM 'a göre,

γ $p < 0.05$ K (Y-27632 + NSC 23766) 1 μM 'a göre,

* $p < 0.001$, ζ $p < 0.05$ K (Y-27632 + NSC 23766) 10 μM 'a göre

6.2.10.f. Tüm Gruplarda Y-27632 + NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

Y-27632 + NSC23766 kombinasyonunun, tüm gruplarda CCh pD₂ değerlerini düşürdüğü gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 55). Kontrol CCh pD₂ değerlerine göre anlamlılık, kontrol ve diyabet gruplarında Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında; insülin tedavisi verilen diyabet grubunda ise Y-27632 + NSC 23766 (0.1 ve 10 μ M) varlığında saptandı ($p < 0.05$). CCh pD₂ değerlerinde en fazla azalmanın, üç grupta da yüksek doz kombinasyonlarda (10 μ M) olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). En düşük pD₂ değeri (5.01 ± 0.08), kontrol grubunda 10 μ M Y-27632 + NSC23766 varlığında elde edildi.



Şekil 55. Tüm gruplarda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD₂ değerleri

$p < 0.001$, δ $p < 0.01$, * $p < 0.05$ grup içi CCh'lerine göre,

& $p < 0.001$ K (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μ M'a göre,

§ $p < 0.01$ K (Y-27632 + NSC 23766) 1 μ M'a göre

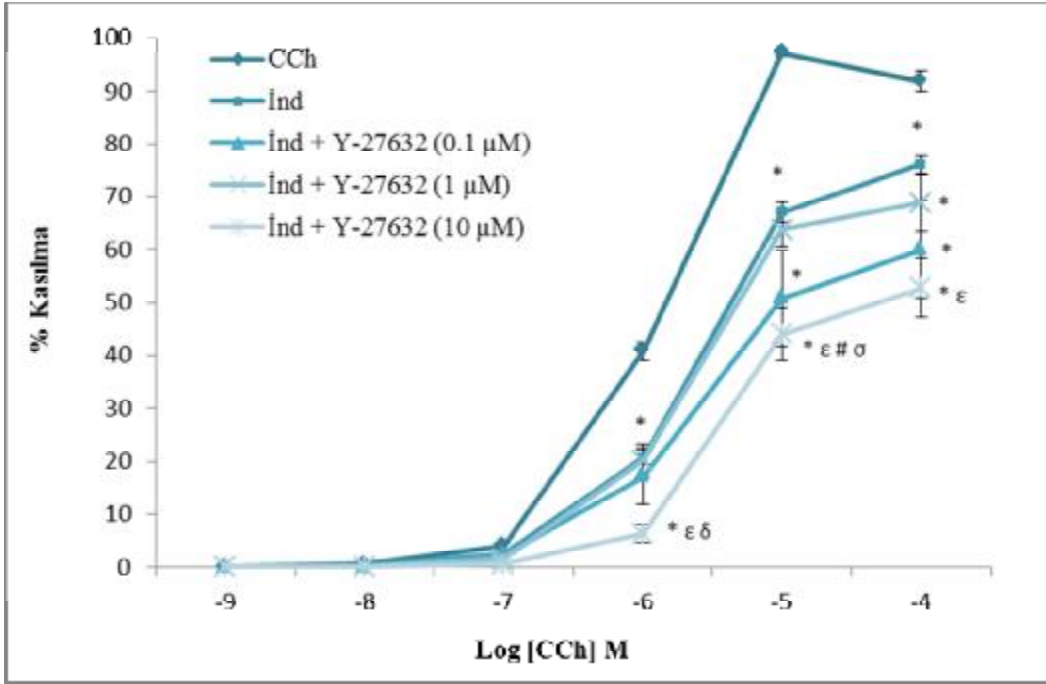
ε $p < 0.05$ D (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 μ M'a göre,

¥ $p < 0.01$ DI (Y-27632 + NSC 23766) 1 μ M'a göre

6.2.11. Kontrol Grubunda İndometazin İle Birlikte Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler

6.2.11.a. İndometazin + Rho Kinaz İnhibitörü Y-27632 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

CCh kasılma yanıtları, indometazin (5×10^{-7} M) uygulanan grupta %23, indometazin + Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) uygulanan gruplarda sırasıyla %40, %31 ve %47 oranında inhibe oldu ($p < 0.001$, Şekil 56).



Şekil 56. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

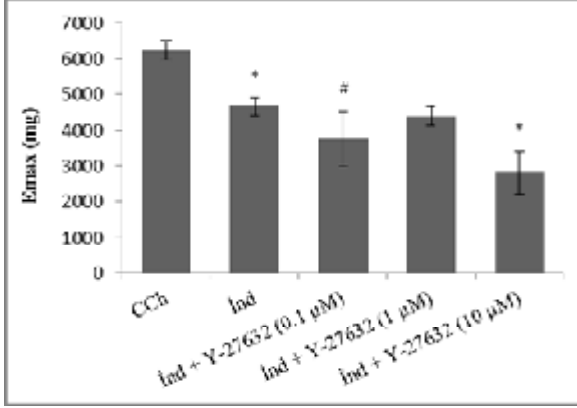
* $p < 0.001$ CCh'e göre,

ϵ $p < 0.001$ İnd'e göre

$p < 0.05$ İnd + Y-27632 (0.1 μ M)'a göre

σ $p < 0.001$, δ $p < 0.05$ İnd + Y-27632 (1 μ M)'a göre

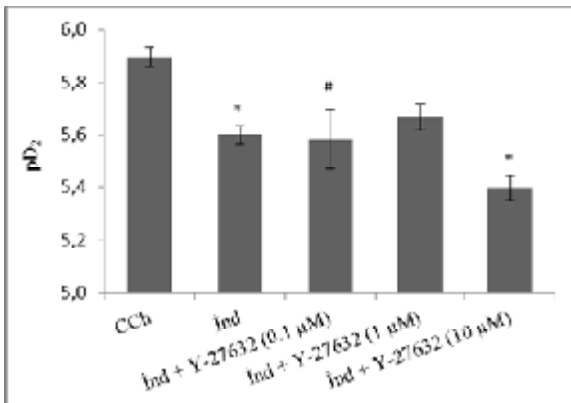
İndometazin (5×10^{-7} M) ile Y-27632'nin her üç konsantrasyonundaki (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, CCh Emax değerlerinde azalma gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 57). Ancak indometazin varlığında 4658 ± 248 mg olan CCh Emax değeri, indometazin + Y-27632 (0.1 ve 10 μ M) varlığında (sırası ile 3741 ± 765 mg, $p < 0.01$ ve 2810 ± 601 mg, $p < 0.001$) istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış iken, 1 μ M konsantrasyonda (4386 ± 269) kontrole istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı.



Şekil 57. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

* $p < 0.001$, # $p < 0.01$ CCh'e göre

İndometazin ile Y-27632'nin her üç konsantrasyonundaki (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonunda, CCh pD_2 değerleri azaldı ($p < 0.001$, Şekil 58). İndometazin varlığında 5.60 ± 0.03 olan CCh pD_2 değeri, indometazin + Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 5.58 ± 0.11 , 5.67 ± 0.05 , 5.40 ± 0.05 olarak bulundu. CCh pD_2 değerlerinde, İnd + Y-27632 (1 μ M) kombinasyonunda kontrole göre istatistiksel anlamlılık bulunmadı.

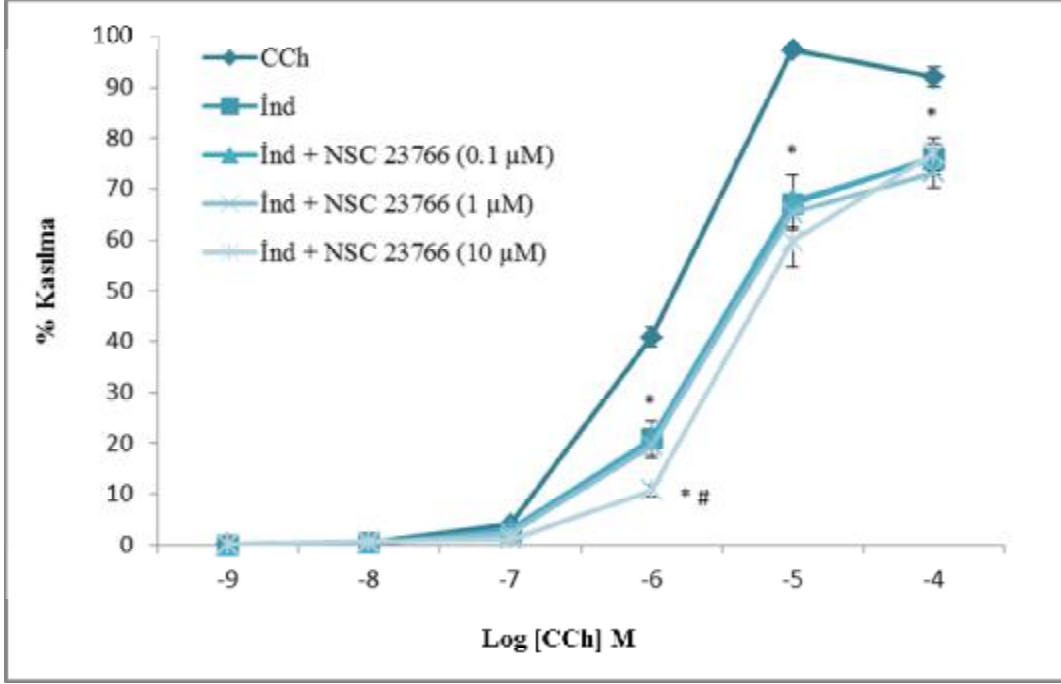


Şekil 58. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

* $p < 0.001$, # $p < 0.01$ CCh'e göre

6.2.11.b. İndometazin + Rac1 İnhibitörü NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

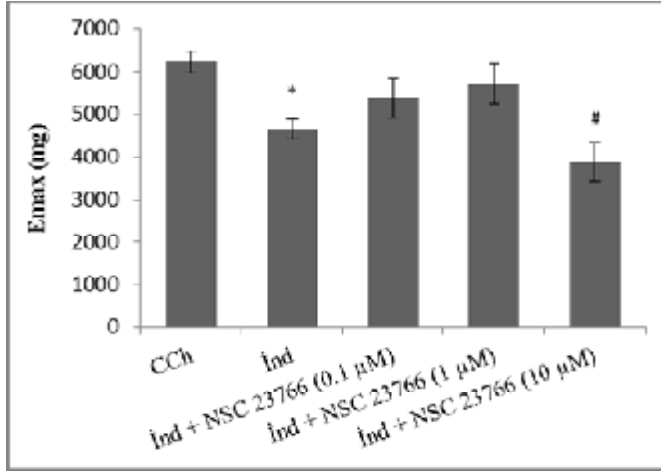
İndometazin (5×10^{-7} M) ve indometazin + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında, CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon, indometazin uygulanan grupta %23, indometazin + Y-27632 uygulanan grupta sırasıyla %22, %26 ve %23 bulundu ($p < 0.001$, Şekil 59), gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 59. Kontrol grubunda, indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ CCh'e göre, # $p < 0.01$ İnd'e göre

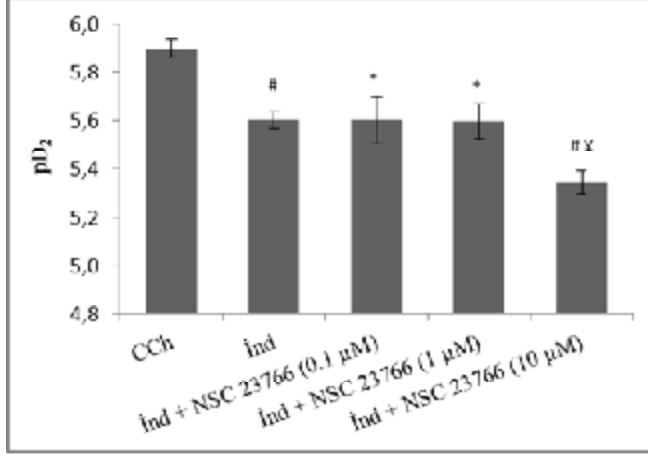
Tek başına indometazin varlığında azalan CCh Emax değerinin (6233 ± 259 mg'dan 4658 ± 248 mg'a), indometazin ile NSC 23766'nın (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, sadece indometazin + NSC 23766 (10 μ M) varlığında (3876 ± 462 mg) indometazine göre daha fazla azaldığı görüldü. İndometazin + NSC 23766 (0.1 ve 1 μ M) varlığında CCh Emax değerlerinin, tek başına indometazin varlığında elde edilen CCh Emax değerine göre daha fazla olduğu (5397 ± 461 ve 5713 ± 470 mg) gözlemlendi. İstatistiksel olarak kontrol CCh Emax değerlerine göre anlamlı azalmanın, tek başına indometazin varlığında ($p < 0.01$) ve indometazin + NSC 23766 (10 μ M) kombinasyonunda ($p < 0.001$) görüldü ($p < 0.001$, Şekil 60).



Şekil 60. Kontrol grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında Emax değerleri

$p < 0.001$, * $p < 0.01$ CCh'e göre

İndometazin ile NSC 23766'nın (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, tek başına indometazin varlığında 5.60 ± 0.03 olan CCh pD_2 değeri, indometazin + NSC 23766 varlığında sırası ile 5.60 ± 0.10 , 5.60 ± 0.07 ve 5.34 ± 0.05 bulundu ($p < 0.001$, Şekil 61). Tek başına indometazin varlığında elde edilen CCh pD_2 değeri ile indometazin + NSC 23766 varlığında (0.1 ve 1 μ M) elde edilen CCh pD_2 değerleri ile arasında anlamlı fark bulunmaz iken, indometazin + NSC 23766 (10 μ M) varlığında anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

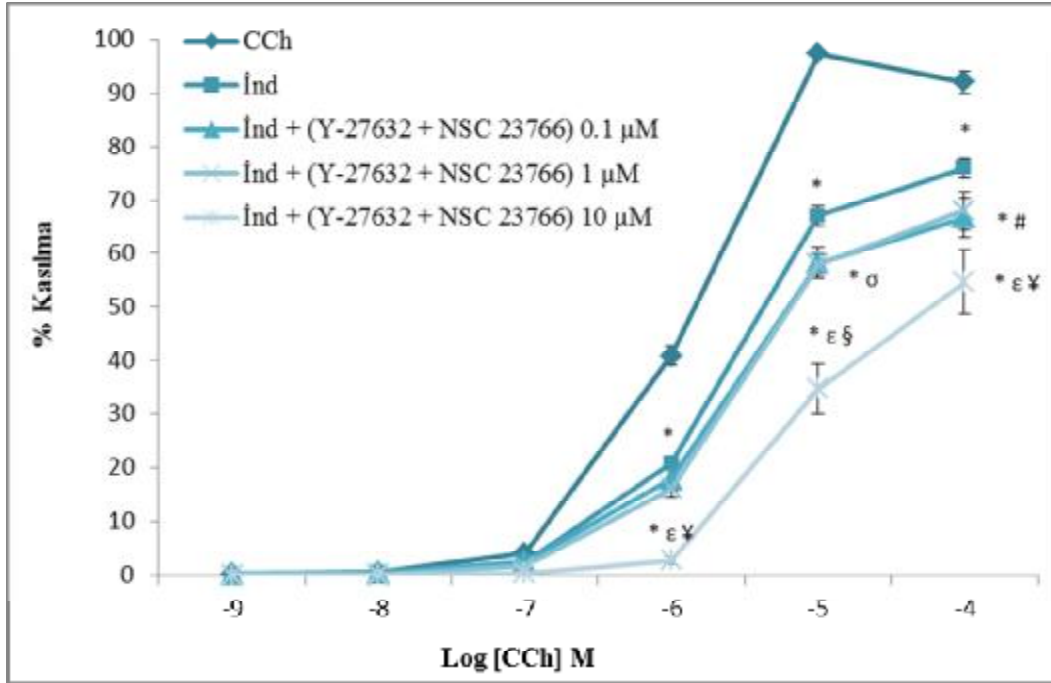


Şekil 61. Kontrol grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında pD_2 değerleri

$p < 0.001$, * $p < 0.05$ CCh'e göre, ¥ $p < 0.05$ İnd'e göre

6.2.11.c. İndometazin + Rho Kinaz İnhibitörü Y-27632 + Rac1 İnhibitörü NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

Tek başına indometazin (5×10^{-7} M) ile ekimolar konsantrasyonda kombine edilmiş Y-27632 + NSC 23766 varlığında, CCh Emax değerlerinde görülen azalma sırasıyla %23, %33, %32 ve %45 idi ($p < 0.001$, Şekil 62). Tek başına indometazin varlığında elde edilen CCh kasılma yanıtları ile indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 ve 1 μ M) kombinasyonunda elde edilen CCh kasılma yanıtları arasında anlamlı fark bulunmaz iken; indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 μ M) kombinasyonun, hem indometazin ($p < 0.05$) hem de indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 ve 1 μ M) kombinasyonu ($p < 0.001$ ve $p < 0.01$) ile arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi.



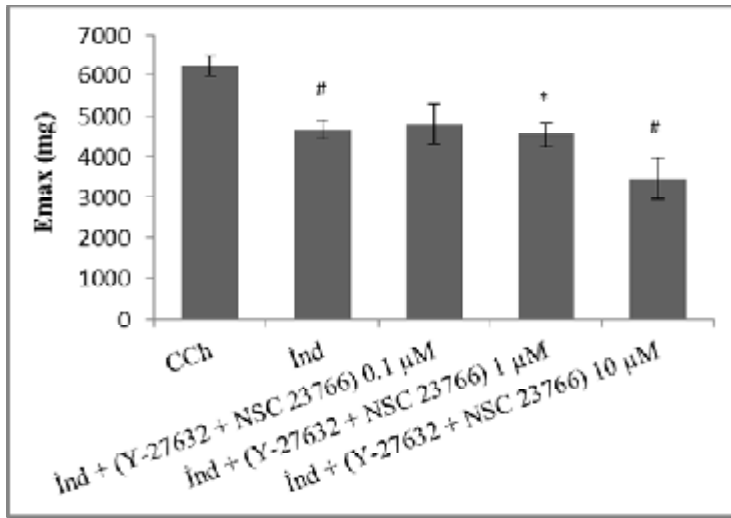
Şekil 62. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ CCh'e göre,

ε $p < 0.001$, σ $p < 0.01$, # $p < 0.05$ İnd'e göre,

§ $p < 0.001$, ¥ $p < 0.01$ İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 μ M'a göre

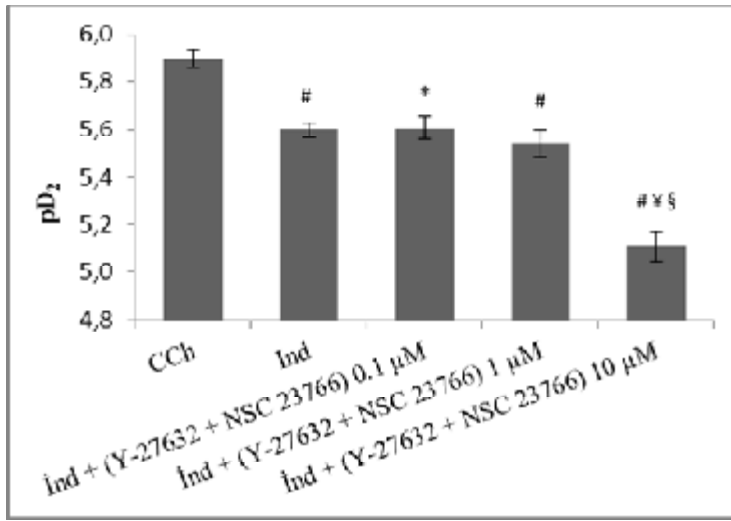
İndometazin (5×10^{-7} M) ile ekimolar Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1, 10 μ M) varlığında CCh Emax değerlerinin, indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 μ M) kombinasyonu dışındaki tüm kombinasyonlarda anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 63). Tek başına indometazin varlığında 4658 ± 248 mg olan CCh Emax değerinin, indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonlarında sırasıyla 4803 ± 518 , 4543 ± 316 ve 3453 ± 501 mg olduğu gözlemlendi. En fazla azalma, indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 μ M) varlığında elde edildi ($p < 0.001$). İndometazin ile indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri arasında CCh Emax değerlerinde anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 63. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında Emax değerleri

$p < 0.001$, * $p < 0.05$ CCh'e göre

İndometazin (5×10^{-7} M) ile Y-27632+ NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, tek başına indometazin varlığında 5.60 ± 0.03 olan CCh pD_2 değeri, indometazin + Y-27632 + NSC 23766 varlığında sırası ile 5.61 ± 0.05 , 5.54 ± 0.06 , 5.11 ± 0.06 bulundu ($p < 0.001$, Şekil 64). Tek başına indometazin varlığında elde edilen CCh pD_2 değeri ile indometazin + Y-27632 + NSC 23766 varlığında (0.1 ve 1 μ M) elde edilen CCh pD_2 değerleri ile arasında anlamlı fark bulunmaz iken; indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 μ M) kombinasyonunun, hem indometazin ($p < 0.001$) hem de indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 ve 1 μ M) kombinasyonları ($p < 0.001$ ve $p < 0.01$) ile arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi.



Şekil 64. Kontrol grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

$p < 0.001$, * $p < 0.01$ CCh'e göre,

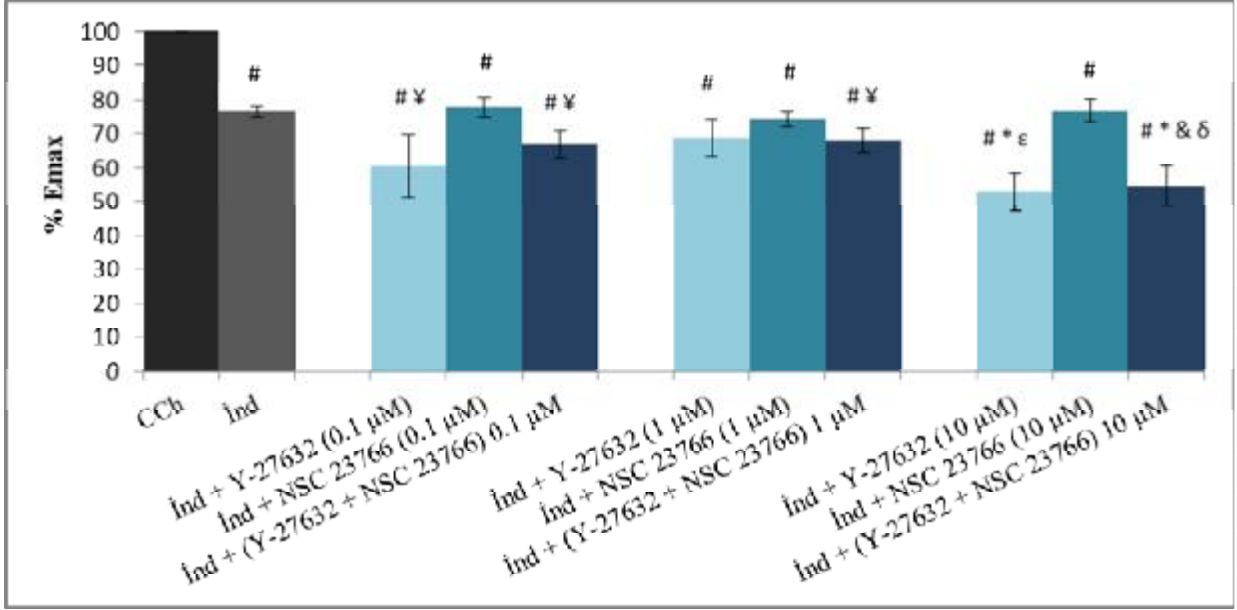
¥ $p < 0.001$ İnd ve İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μ M'a göre,

§ $p < 0.01$ İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 1 μ M'a göre

6.2.12. Kontrol Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

6.2.12.a. Kontrol Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax Değerlerinin Karşılaştırılması

İndometazin ve/veya küçük GTPaz inhibitörleri varlığında elde edilen CCh Emax değerleri, yokluğunda elde edilmiş CCh Emax değerlerinin yüzdesi olarak alındığında; indometazin ve indometazin ile birlikte Y-27632, NSC 23766 ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonlarının tüm dozlarda (0.1, 1 ve 10 µM), CCh Emax değerlerinde anlamlı azalma yaptığı gözlemlendi (p<0.001, Şekil 65). Hem kontrol CCh'e göre (p<0.001) hem de indometazin varlığındaki CCh'e göre (p<0.001) Emax değerlerinde en fazla azalma, indometazin + Y-27632 (10 µM) ve indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonlarında gözlemlendi.



Şekil 65. Kontrol grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri

p<0.001 CCh'e göre,

* p<0.001, ¥ p<0.05 İnd'e göre,

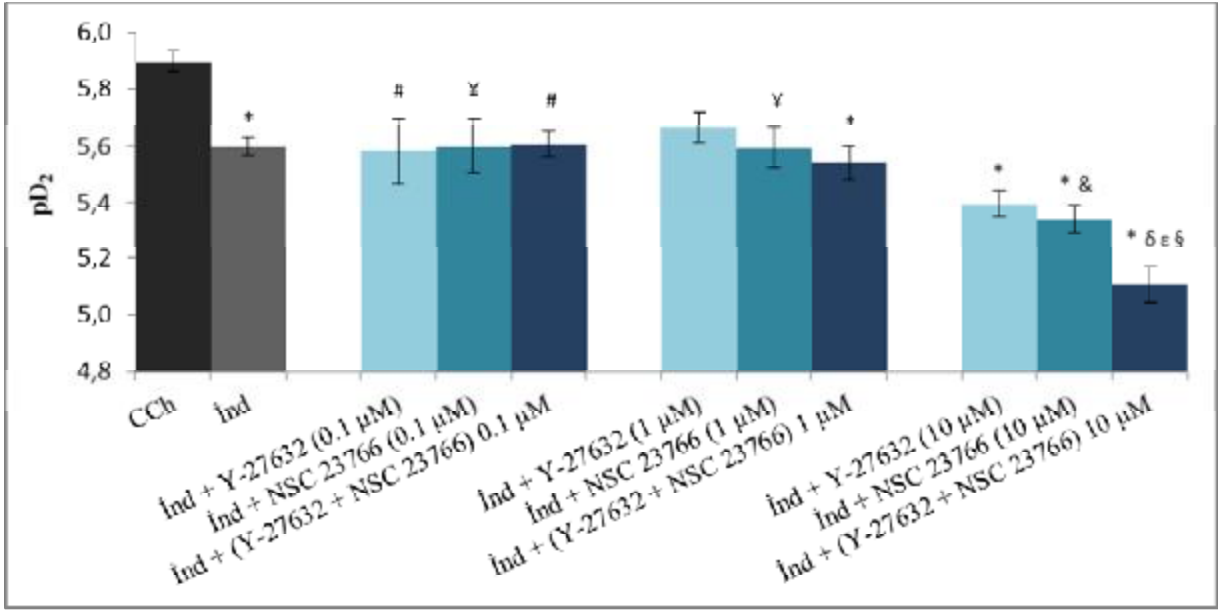
ε p<0.05 İnd + Y-27632 (1 µM)'a göre,

& p<0.05 İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 µM'a göre,

δ p<0.001 İnd + NSC 23766 (10 µM)'a göre

6.2.12.b. Kontrol Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

CCh pD₂ değerlerinde, indometazin ve indometazin ile birlikte Y-27632, NSC 23766 ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonlarının, tüm dozlarda (0.1, 1 ve 10 µM) anlamlı azalma yaptığı gözlemlendi (p<0.001, Şekil 66). CCh pD₂ değerlerinde en fazla düşüş, indometazin ile birlikte ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun 10 µM dozunda (5.11±0.06) görüldü (p<0.001).



Şekil 66. Kontrol grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında CCh pD₂ değerleri

* p<0.001, # P<0.01, ¥ p<0.05 CCh'e göre,

δ p<0.001, & p<0.05 İnd'e göre,

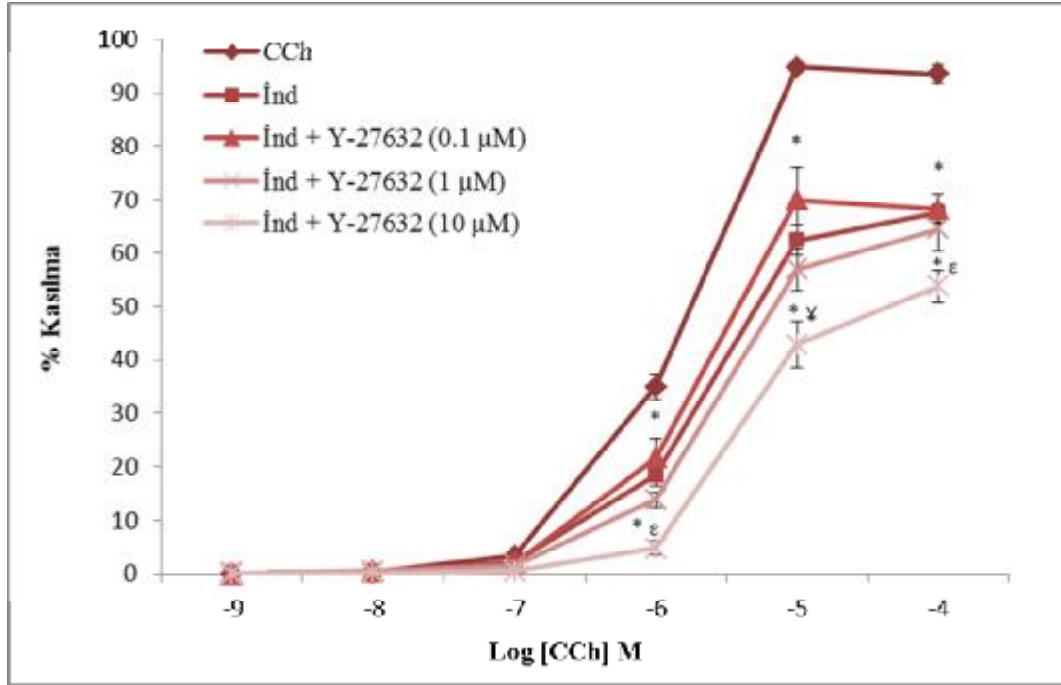
ε p<0.001 İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 µM'a göre,

§ p<0.01 İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 1 µM'a göre

6.2.13. Diyabet Grubunda İndometazin İle Birlikte Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler

6.2.13.a. İndometazin + Rho Kinaz İnhibitörü Y-27632 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

İndometazin (5×10^{-7} M) ve indometazin + Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında, CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon, indometazin uygulanan grupta %30; indometazin + Y-27632 uygulanan grupta sırasıyla %26, %35 ve %46 bulundu ($p < 0.001$, Şekil 67). İndometazin + Y-27632 (10 μ M) kombinasyonu varlığında, CCh kasılma yanıtlarında, kontrol CCh ($p < 0.001$), tek başına indometazin varlığında CCh ve indometazin + Y-27632 (0.1 μ M) varlığında elde edilen CCh yanıtlarına ($p < 0.05$) göre anlamlı azalma gözlemlendi.

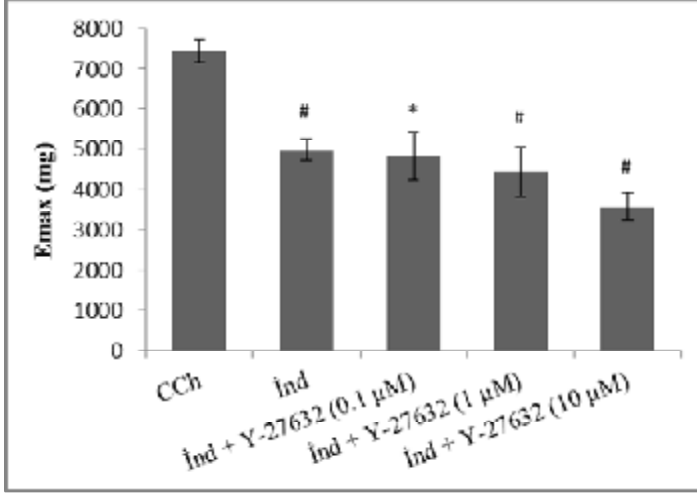


Şekil 67. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ CCh'e göre,

¥ $p < 0.001$, ε $p < 0.05$ İnd ve İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μ M'a göre

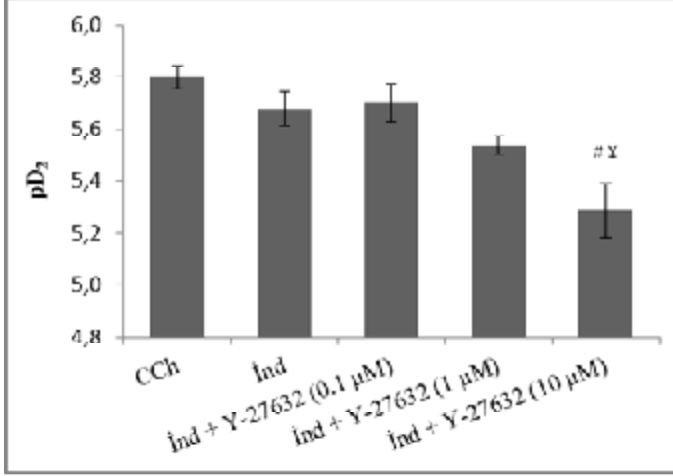
İndometazin ile Y-27632'nin (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, CCh Emax değerlerinde anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0.001$, Şekil 68). İndometazin varlığında 4971 ± 257 mg olan CCh Emax değeri, indometazin ile birlikte Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 4826 ± 593 , 4438 ± 602 ve 3578 ± 335 mg bulundu. CCh Emax değerleri açısından, indometazin ile indometazin+ Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 68. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

$p<0.001$, * $p<0.01$ CCh'e göre

İndometazin varlığında 5.68 ± 0.07 olan CCh pD_2 değeri, indometazin ile birlikte Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μM) varlığında sırası ile 5.70 ± 0.07 , 5.54 ± 0.04 ve 5.29 ± 0.10 bulundu. Tek başına indometazin (5×10^{-7} M) ve indometazin + Y-27632 (0.1 ve 1 μM) kombinasyonları CCh pD_2 değerinde bir değişiklik yapmaz iken, indometazin + Y-27632 (10 μM) kombinasyonunun hem kontrol CCh pD_2 değerini ($p < 0.01$), hem de indometazin varlığında elde edilen CCh pD_2 değerini ($p < 0.05$) anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi (Şekil 69).

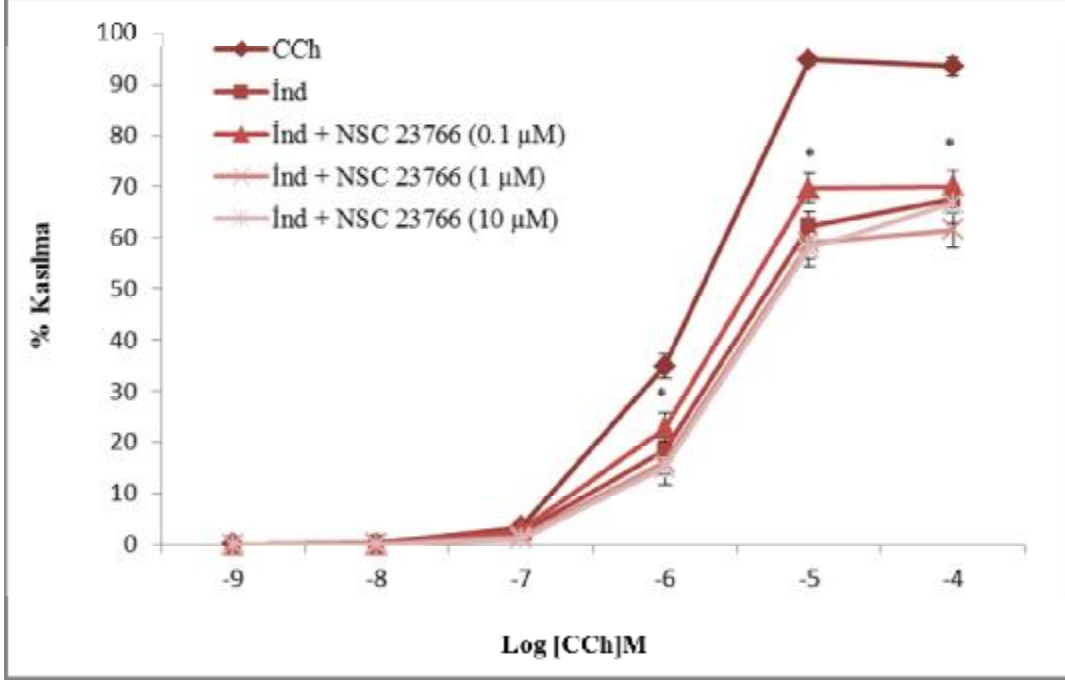


Şekil 69. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

$p < 0.01$ CCh'e göre, Y $p < 0.05$ Ind'e göre

6.2.13.b. İndometazin + Rac1 İnhibitörü NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

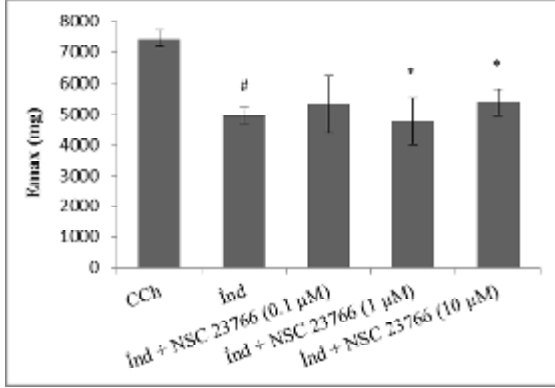
İndometazin ve indometazin + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında, CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon, indometazin uygulanan grupta %30; indometazin + NSC 23766 uygulanan grupta sırasıyla %26, %34 ve %31 bulundu ($p < 0.001$, Şekil 70). Gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 70. Diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ CCh'e göre

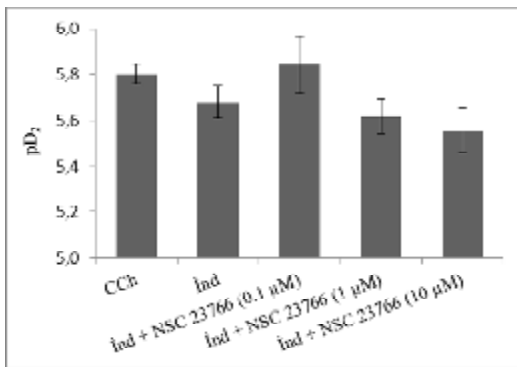
İndometazin ile NSC 23766 (1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, CCh Emax değerlerinde anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0.001$, Şekil 71). İndometazin varlığında 4971 ± 257 mg olan CCh Emax değeri, indometazin ile birlikte NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 5322 ± 907 , 4771 ± 749 ve 5380 ± 442 mg bulundu. CCh Emax değerleri açısından, indometazin ile indometazin + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 71. Diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

$p<0.001$, * $p<0.01$ CCh'e göre

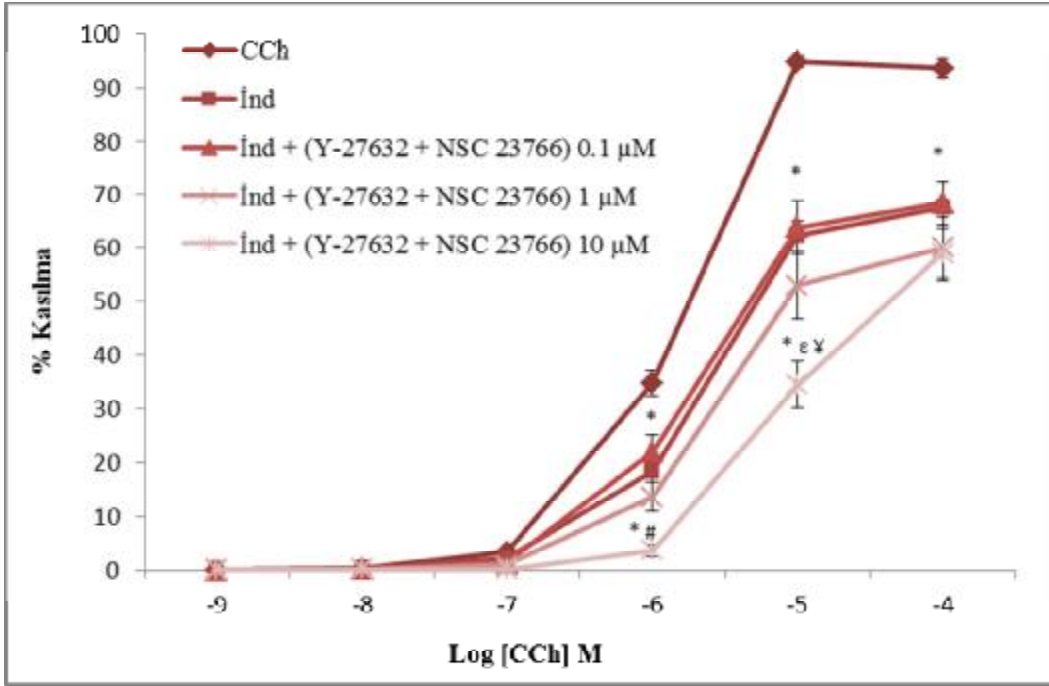
İndometazin (5×10^{-7} M) ile NSC 23766 kombinasyonunda, NSC 23766'nın 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarında, CCh pD_2 değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalma gözlenirken ($p<0.001$, Şekil 72); 0.1 μ M konsantrasyonunda pD_2 değerinde azalma gözlenmedi. CCh pD_2 değerleri, indometazin ile birlikte NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 5.84 ± 0.12 , 5.62 ± 0.08 ve 5.55 ± 0.10 bulundu.



Şekil 72. Diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

6.2.13.c. İndometazin + Rho Kinaz İnhibitörü Y-27632 + Rac1 İnhibitörü NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

İndometazin (5×10^{-7} M) ve indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında, CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon, indometazin uygulanan grupta %30; indometazin + Y-27632 + NSC 23766 uygulanan grupta sırasıyla %31, %39 ve %41 bulundu ($p < 0.001$, Şekil 73). İndometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 μ M) kombinasyonu varlığında CCh kasılma yanıtlarında, kontrol CCh ($p < 0.001$), tek başına indometazin varlığında CCh ($p < 0.01$) ve indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 μ M) kombinasyonu varlığında ($p < 0.01$) elde edilen CCh kasılma yanıtlarına göre anlamlı azalma gözlemlendi.



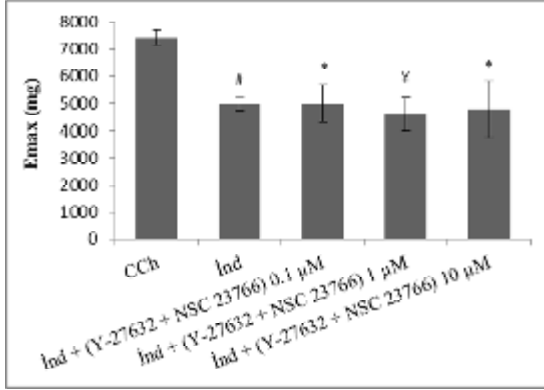
Şekil 73. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

$p < 0.001$ CCh'e göre,

ϵ $p < 0.001$, # $p < 0.01$ İnd ve İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μ M'a göre,

¥ $p < 0.01$ İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 1 μ M'a göre

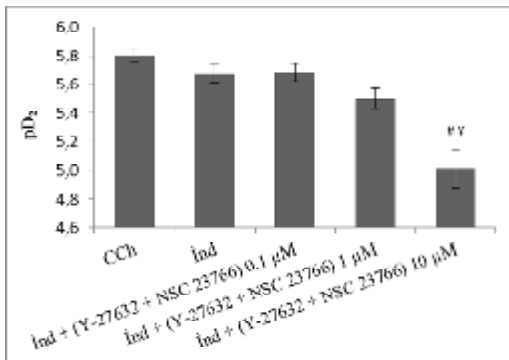
İndometazin (5×10^{-7} M) ile ekimolar Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, CCh Emax değerlerinde anlamlı azalma gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 74). CCh Emax değerleri, indometazin ile birlikte Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 4997 ± 684 , 4597 ± 598 ve 4789 ± 1025 mg bulundu. İndometazin ile indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 74. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

$p < 0.001$, ¥ $p < 0.01$, * $p < 0.05$ CCh'e göre

İndometazin (5×10^{-7} M) + Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında, CCh pD_2 değerleri sırası ile 5.68 ± 0.06 , 5.51 ± 0.07 ve 5.01 ± 0.13 bulundu. İndometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 μ M) kombinasyonu varlığında CCh pD_2 değerlerinde; kontrol CCh pD_2 değerine ($p < 0.001$), indometazin ($p < 0.001$) ve indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 μ M) varlığında elde edilen CCh pD_2 değerlerine ($p < 0.05$) göre anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 75).



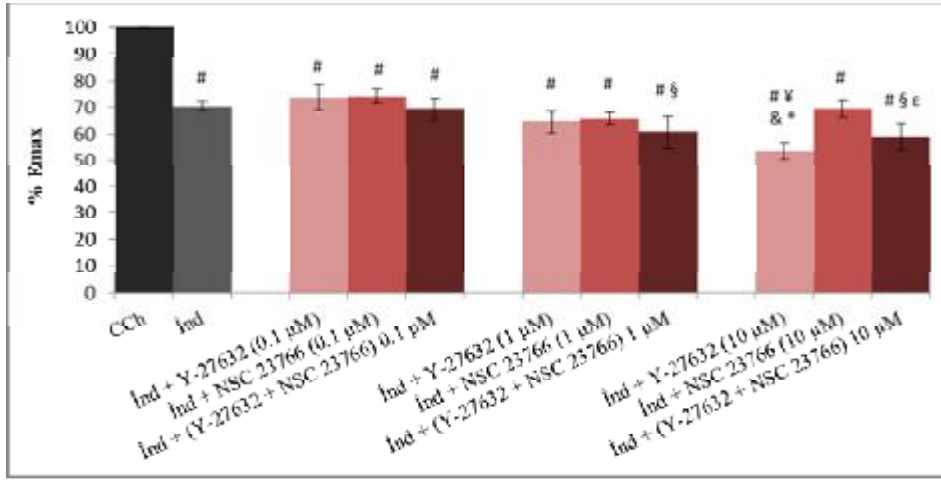
Şekil 75. Diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

$p < 0.001$ CCh ve İnd'e göre, ¥ $p < 0.05$ İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μ M'a göre

6.2.14. Diyabet Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD_2 Değerlerinin Karşılaştırılması

6.2.14.a. Diyabet Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax Değerlerinin Karşılaştırılması

İndometazin ve/veya inhibitör varlığında elde edilen CCh Emax değerleri, indometazin ve inhibitör yokluğunda elde edilmiş CCh Emax değerlerinin yüzdesi olarak alındığında; indometazin ve indometazin ile birlikte Y-27632, NSC 23766 ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun tüm dozlarda (0.1, 1 ve 10 μ M), CCh Emax değerlerinde anlamlı inhibisyon yaptığı gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 76). İndometazin + Y-27632 (10 μ M) kombinasyonu varlığında CCh Emax değerlerinde, kontrol CCh ($p < 0.001$), tek başına indometazin varlığında CCh ($p < 0.001$) ve indometazin + Y-27632 (0.1 ve 1 μ M) varlığında elde edilen CCh Emax değerlerine ($p < 0.001$) göre anlamlı azalma gözlemlendi. Ayrıca indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 μ M) kombinasyonu varlığında CCh Emax değerlerinde, kontrol CCh ($p < 0.001$) ve tek başına indometazin varlığında elde edilen CCh ($p < 0.05$) Emax değerlerine göre anlamlı azalma gözlemlendi.



Şekil 76. Diyabet grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri

$p < 0.001$ CCh'e göre,

¥ $p < 0.001$, § $p < 0.05$ İnd'e göre,

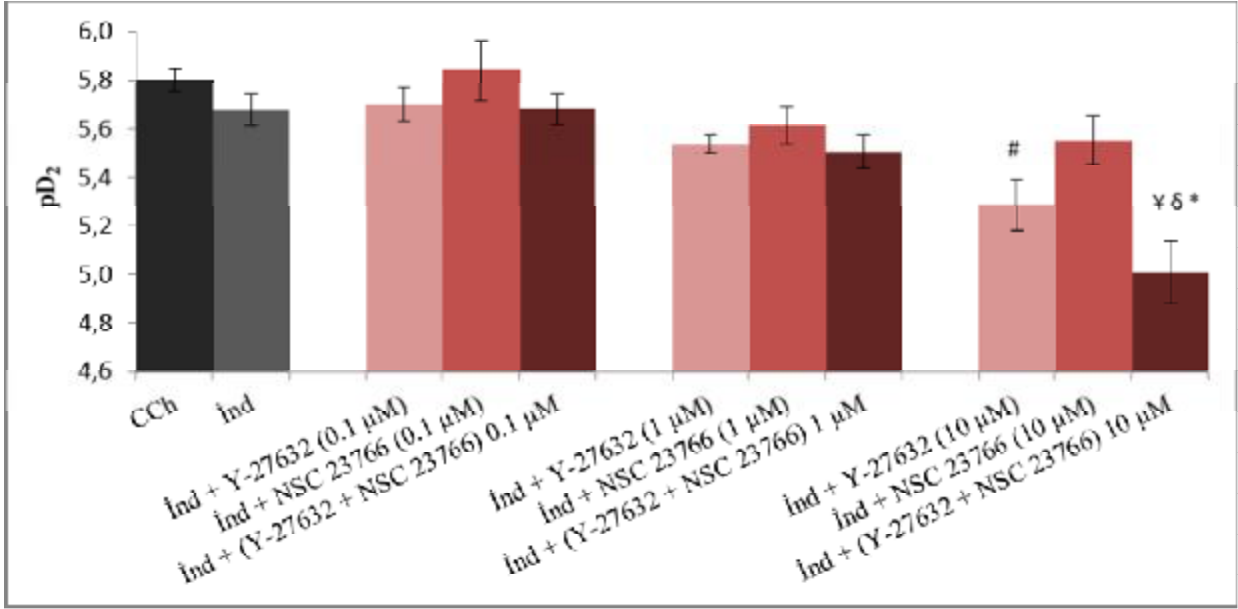
& $p < 0.001$ İnd + Y-27632 (0.1 μ M)'a göre,

* $p < 0.05$ İnd + Y-27632 (1 μ M)'a göre,

ε $p < 0.05$ İnd + NSC 23766 (10 μ M)'a göre

6.2.14.b. Diyabet Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

CCh pD₂ değerlerinde, indometazin ve indometazin ile birlikte Y-27632, NSC 23766 ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun, tüm dozlarda (0.1, 1 ve 10 µM) inhibisyon yaptığı gözlemlendi (p<0.001, Şekil 77). CCh pD₂ değerlerinde en fazla düşüş, indometazin ile birlikte ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun 10 µM konsantrasyonunda (5.01±0.13) görüldü (p<0.001). CCh pD₂ değerlerinde, indometazin + Y-27632 (10 µM) kombinasyonu varlığında sadece kontrol CCh'e göre (p<0.01); indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonu varlığında ise kontrol CCh (p<0.001), tek başına indometazin varlığında CCh (p<0.001), İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 µM (p<0.05) ve İnd + NSC 23766 (10 µM)'a (p<0.05) göre anlamlı azalma bulundu.



Şekil 77. Diyabet grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında CCh pD₂ değerleri

¥ p<0.001, # p<0.01 CCh'e göre,

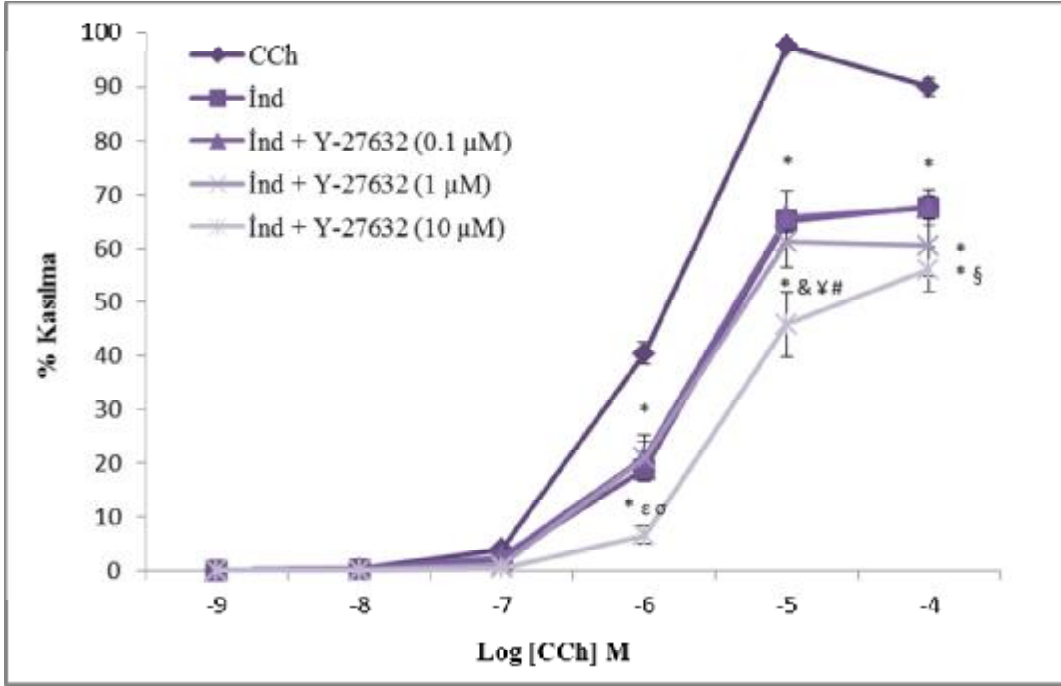
δ p<0.001 İnd'e göre,

* p<0.05 İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 µM ve İnd + NSC 23766 (10 µM)'a göre

6.2.15. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda İndometazin İle Birlikte Küçük GTPaz'ların İnhibisyonuna Bağlı CCh Yanıtlarındaki Değişiklikler

6.2.15.a. İndometazin + Rho Kinaz İnhibitörü Y-27632 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

İndometazin (5×10^{-7} M) ve indometazin + Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon, indometazin uygulanan grupta %29; indometazin + Y-27632 uygulanan grupta sırasıyla %27, %36 ve %42 saptandı ($p < 0.001$, Şekil 78). İndometazin + Y-27632 (10 μ M) kombinasyonu varlığında CCh kasılma yanıtlarında, kontrol CCh ($p < 0.001$), tek başına indometazin varlığında CCh ($p < 0.05$) ve indometazin + Y-27632 (0.1 μ M) kombinasyonu varlığında ($p < 0.05$) elde edilen CCh kasılma yanıtlarına göre anlamlı azalma gözlemlendi.



Şekil 78. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

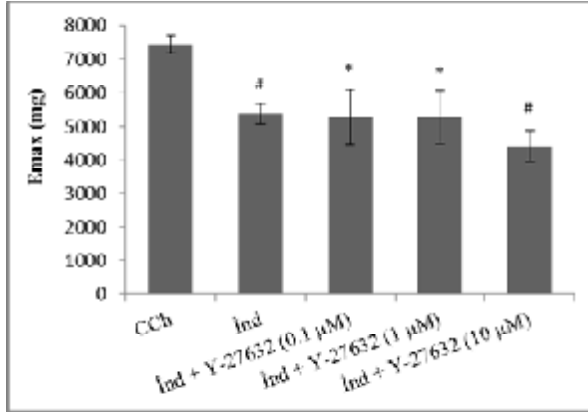
* $p < 0.001$ CCh'e göre,

& $p < 0.001$, ϵ $p < 0.01$, § $p < 0.05$ İnd'e göre,

¥ $p < 0.001$, σ $p < 0.05$ İnd + Y-27632 (0.1 μ M)'a göre,

$p < 0.05$ İnd + Y-27632 (1 μ M)'a göre

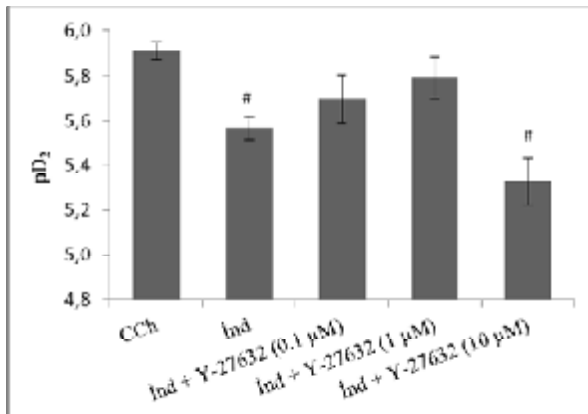
İndometazin (5×10^{-7} M) ile Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, CCh Emax değerlerinde anlamlı azalma gözlemlendi ($p < 0.05$, Şekil 79). İndometazin varlığında 5389 ± 298 mg olan CCh Emax değeri, indometazin ile birlikte Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 5278 ± 825 , 5281 ± 779 ve 4413 ± 461 mg bulundu. CCh Emax değerleri açısından, indometazin ile indometazin + Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 79. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

$p < 0.001$, * $p < 0.05$ CCh'e göre

İndometazin varlığında 5.57 ± 0.05 olan CCh pD_2 değeri, indometazin + Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 5.69 ± 0.11 , 5.79 ± 0.09 ve 5.33 ± 0.11 bulundu. İndometazin ve indometazin + Y-27632 (10 μ M) kombinasyonunda, CCh pD_2 değerlerinde anlamlı azalma gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 80).

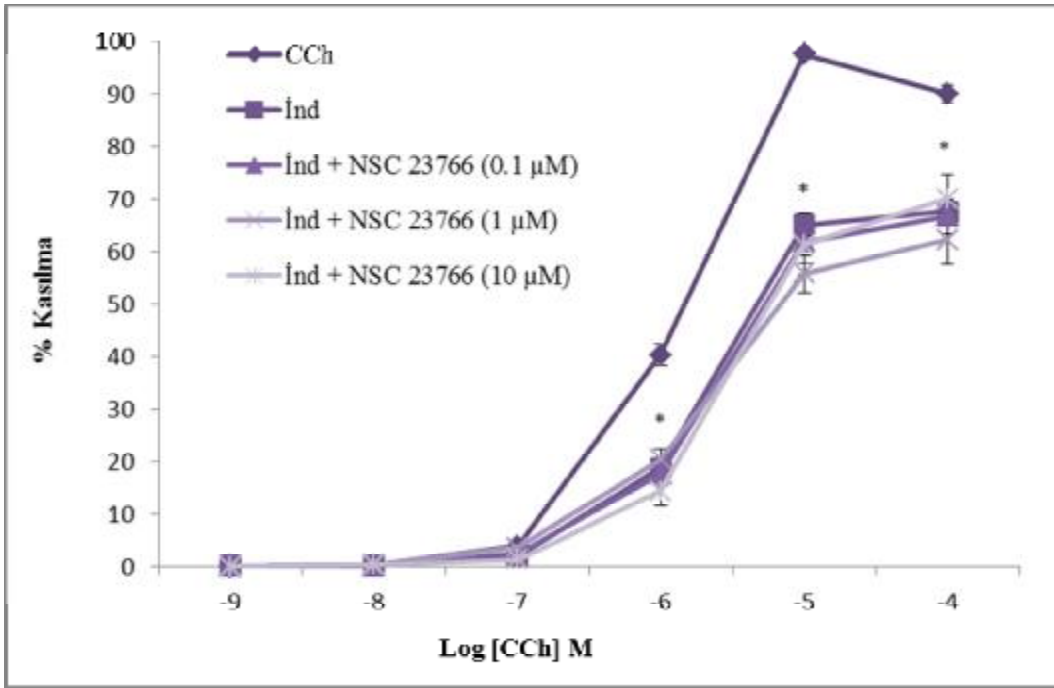


Şekil 80. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

$p < 0.001$ CCh'e göre

6.2.15.b. İndometazin + Rac1 İnhibitörü NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

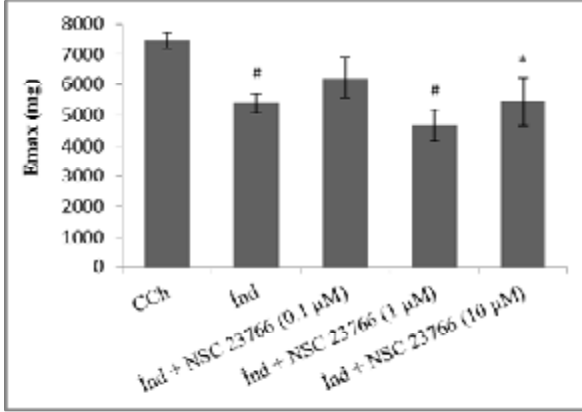
İndometazin (5×10^{-7} M) ve indometazin + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, CCh kasılma yanıtlarında görülen azalma, indometazin uygulanan grupta %29; indometazin + NSC 23766 uygulanan grupta sırasıyla %30, %37 ve %29 idi ($p < 0.001$, Şekil 81). CCh kasılma yanıtları açısından, indometazin ile indometazin + NSC 23766 arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 81. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

* $p < 0.001$ CCh'e göre

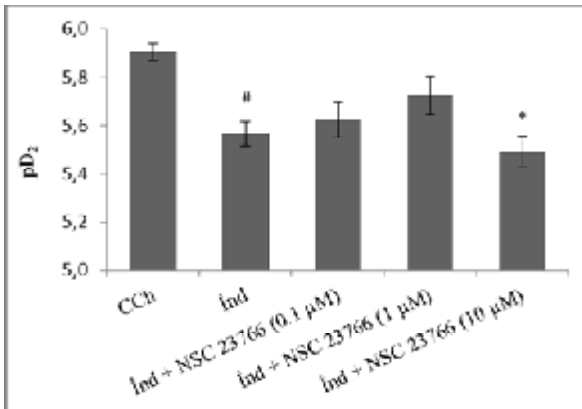
CCh Emax değerleri, indometazin + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 6220 $\pm$ 682, 4677 $\pm$ 503 ve 5444 $\pm$ 792 mg bulundu. Tek başına indometazin ve indometazin + NSC 23766 (1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, CCh Emax değerlerinde anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0.001$, Şekil 82). CCh Emax değerleri açısından, indometazin ile indometazin + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonları arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 82. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

$p<0.001$, * $p<0.05$ CCh'e göre

CCh pD_2 değerleri, indometazin + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 5.62 $\pm$ 0.07, 5.73 $\pm$ 0.08 ve 5.49 $\pm$ 0.06 bulundu. Tek başına indometazin ve indometazin + NSC 23766 (10 μ M) kombinasyonlarında, CCh pD_2 değerlerinde anlamlı düşme gözlemlendi ($p<0.001$, Şekil 83). CCh pD_2 değerleri açısından, indometazin ile indometazin + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonları arasında anlamlı fark bulunmadı.

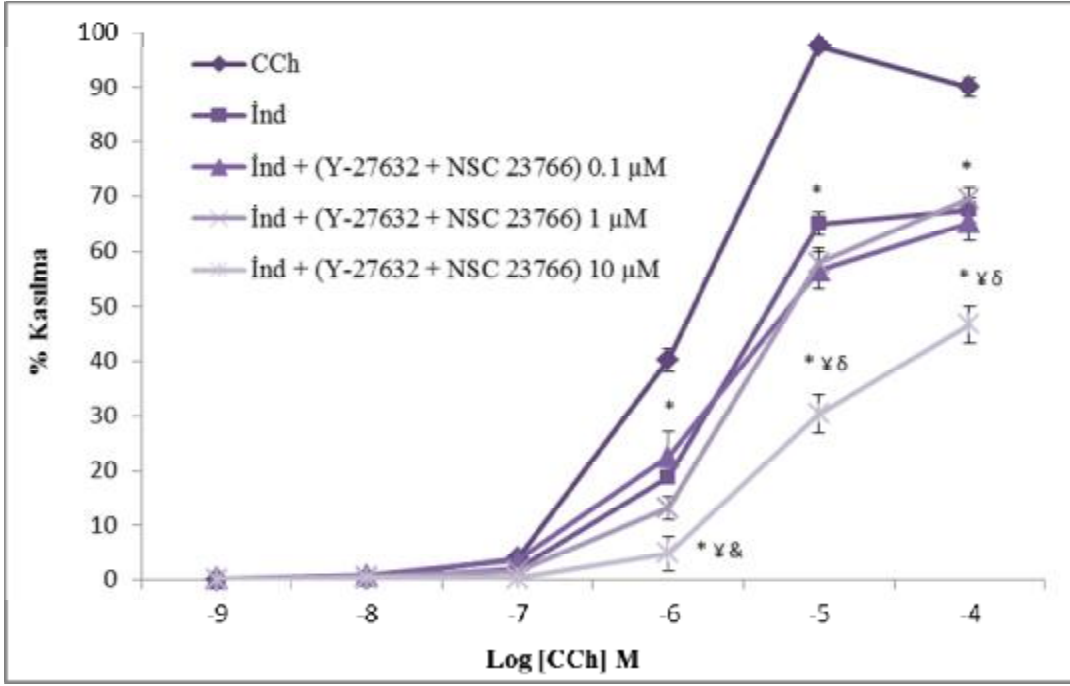


Şekil 83. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

$p<0.001$, * $p<0.01$ CCh'e göre

6.2.15.c. İndometazin + Rho Kinaz İnhibitörü Y-27632 + Rac1 İnhibitörü NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh Yanıtları

İndometazin (5×10^{-7} M) ve indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında, CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon, indometazin uygulanan grupta %29; indometazin + Y-27632 + NSC 23766 uygulanan grupta sırasıyla sırasıyla %34, %30 ve %53 bulundu ($p < 0.001$, Şekil 84). İndometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 μ M) kombinasyonu varlığında CCh kasılma yanıtlarında, kontrol CCh ($p < 0.001$), tek başına indometazin varlığında CCh ($p < 0.001$) ve indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 ve 1 μ M) kombinasyonu varlığında ($p < 0.001$) elde edilen CCh kasılma yanıtlarına göre anlamlı azalma gözlemlendi. Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun, indometazinin etkisini potansiyalize etmediği görüldü.



Şekil 84. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında % CCh kasılma yanıtları

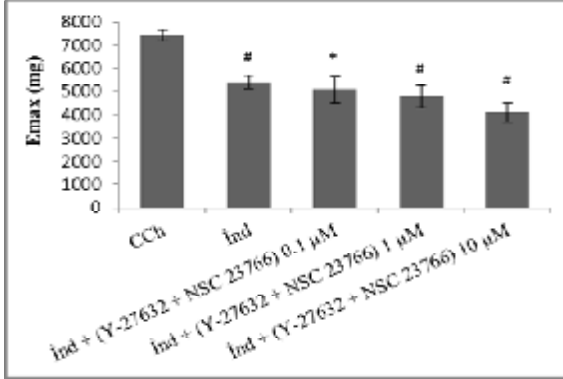
* $p < 0.001$ CCh'e göre,

‡ $p < 0.001$ İnd'e göre,

δ $p < 0.001$ İnd + Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 μ M'a göre,

& $p < 0.001$ İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μ M'a göre

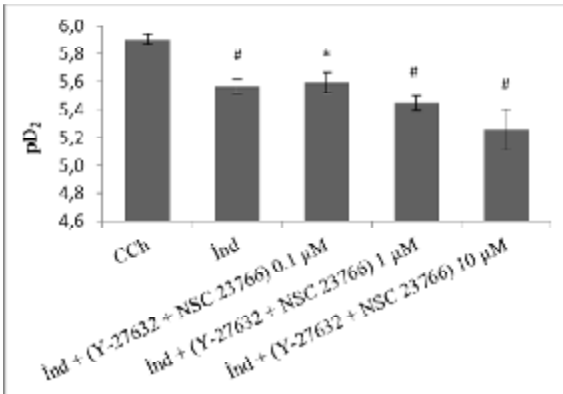
CCh Emax değerleri, indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 5074 $\pm$ 569, 4786 $\pm$ 473 ve 4110 $\pm$ 391 mg bulundu. İndometazin (5×10^{-7} M) ile ekimolar Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, CCh Emax değerlerinde tüm konsatrasyonlarda anlamlı azalma gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 85). CCh Emax değerleri açısından, indometazin ile indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonları arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 85. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh Emax değerleri

$p < 0.001$, * $p < 0.01$ CCh'e göre

CCh pD_2 değerleri, indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında sırası ile 5.59 $\pm$ 0.07, 5.45 $\pm$ 0.05 ve 5.26 $\pm$ 0.15 bulundu. İndometazin ile ekimolar Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) kombinasyonlarında, CCh pD_2 değerlerinde tüm konsantrasyonlarda anlamlı azalma gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 86). CCh pD_2 değerleri açısından, indometazin ile indometazin + Y-27632 + NSC 23766 arasında anlamlı fark bulunmadı.



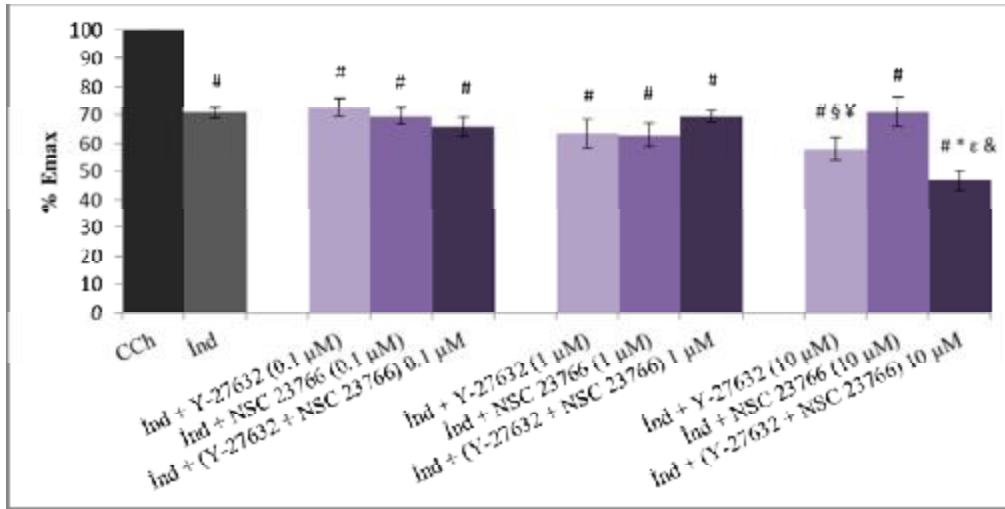
Şekil 86. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu yokluğunda ve varlığında CCh pD_2 değerleri

$p < 0.001$, * $p < 0.05$ CCh'e göre

6.2.16. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

6.2.16.a. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax Değerlerinin Karşılaştırılması

İndometazin ve/veya küçük GTPaz inhibitörleri varlığında elde edilen CCh Emax değerleri, indometazin ve inhibitör yokluğunda elde edilmiş CCh Emax değerlerinin yüzdesi olarak alındığında; indometazin ve indometazin ile birlikte Y-27632, NSC 23766 ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonlarının, tüm dozlarda (0.1, 1 ve 10 µM), CCh Emax değerlerinde anlamlı inhibisyon yaptığı gözlemlendi (p<0.001, Şekil 87). İndometazin + Y-27632 (10 µM) kombinasyonu varlığında CCh Emax değerlerinde, kontrol CCh (p<0.001), tek başına indometazin varlığında CCh (p<0.01) ve indometazin + Y-27632 (0.1 µM) kombinasyonu varlığında (p<0.05) elde edilen CCh Emax değerlerine göre anlamlı azalma gözlemlendi. Ayrıca indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonu varlığında CCh Emax değerlerinde, kontrol CCh (p<0.001), tek başına indometazin varlığında CCh (p<0.001) ve indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 ve 1 µM) kombinasyonu varlığında (p<0.001) elde edilen CCh Emax değerlerine göre anlamlı azalma gözlemlendi.



Şekil 87. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında % CCh Emax değerleri

p<0.001 CCh'e göre,

* p<0.001, § p<0.01 İnd'e göre,

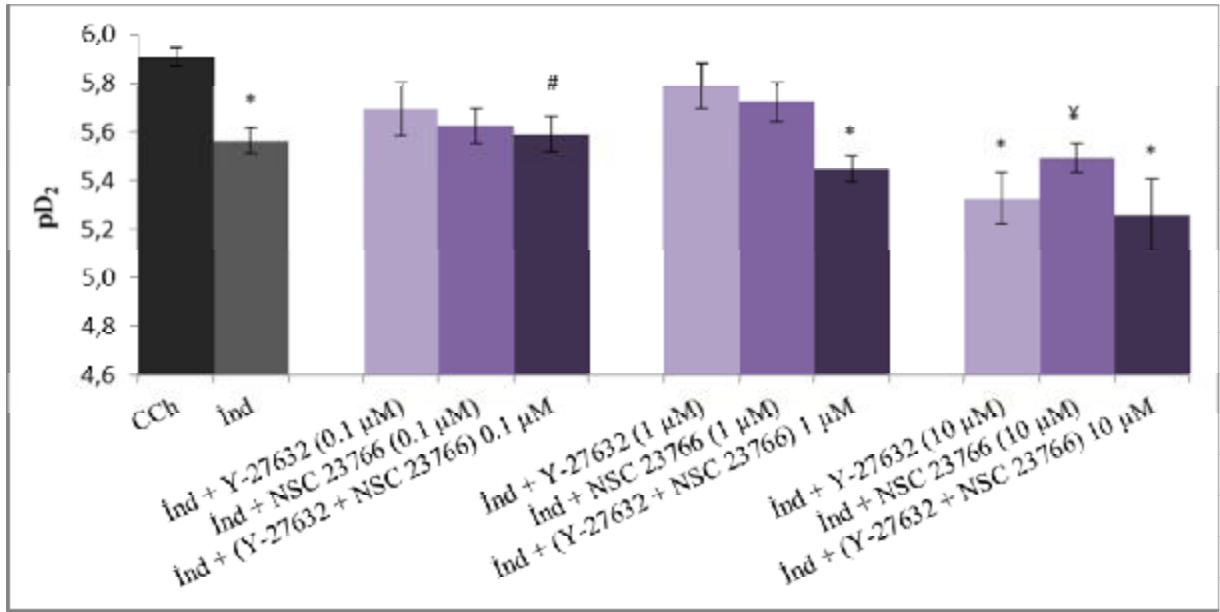
¥ p<0.05 İnd + Y-27632 (0.1 µM)'a göre,

ε p<0.001 İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 µM'a göre,

& p<0.001 İnd + NSC 23766 (10 µM)'a göre

6.2.16.b. İnsülin Tedavisi Verilen Diyabet Grubunda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

İndometazin ve indometazin ile birlikte Y-27632, NSC 23766 ve ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunlarının, CCh pD₂ değerlerini düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 88). Kontrol CCh pD₂ değerlerine göre anlamlılık, tek başına indometazin (p<0.001), indometazin + Y-27632 (10 µM), indometazin + NSC 23766 (10 µM) ve indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 µM) varlığında saptandı (p<0.05). CCh pD₂ değerlerinde en fazla düşüş, indometazin ile birlikte ekimolar Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun 10 µM dozunda (5.26±0.15) saptandı (p<0.001).



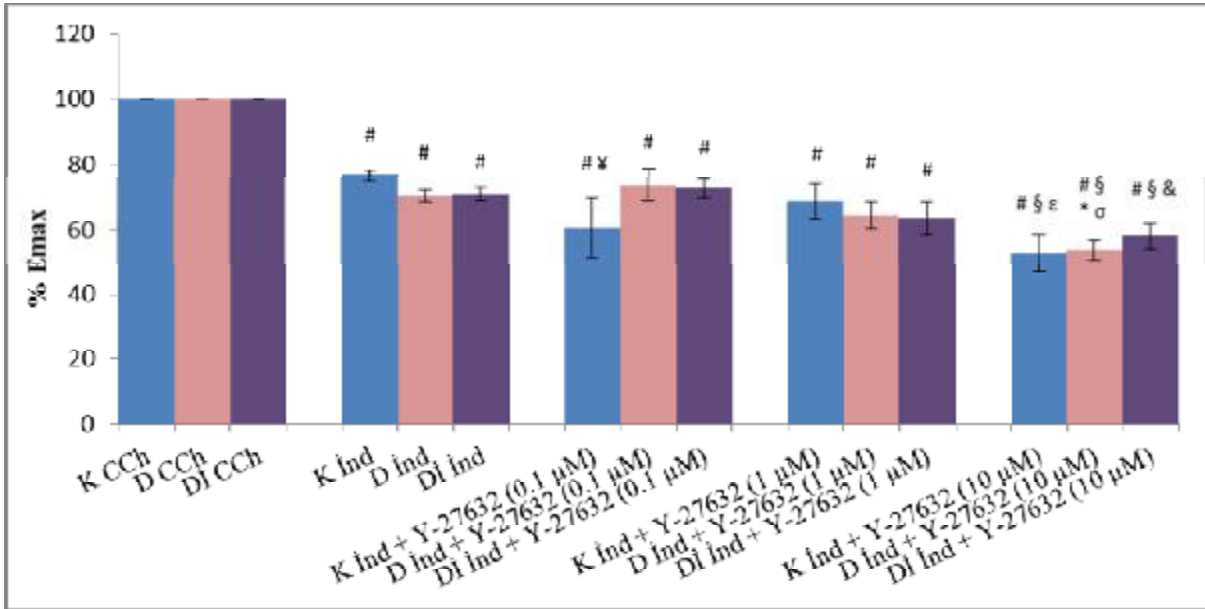
Şekil 88. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + küçük GTPaz inhibitörleri yokluğunda ve varlığında CCh pD₂ değerleri

* p< 0.001, ¥ p<0.01, # p<0.05 CCh'e göre

6.2.17. Tüm Gruplarda İndometazin + Küçük GTPaz İnhibitörleri Varlığında CCh Emax ve pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

6.2.17.a. Tüm Gruplarda İndometazin + Y-27632 Varlığında CCh Emax Değerlerinin Karşılaştırılması

İndometazin + Y-27632 varlığında, tüm gruplarda CCh Emax değerleri anlamlı olarak azaldı ($p < 0.001$, Şekil 89). CCh Emax değerlerinde en fazla azalma, üç grupta da indometazin + Y-27632 (10 μ M) varlığında gözlemlendi. İndometazin + Y-27632 (10 μ M) varlığında, insülin tedavisi verilen diyabet grubunda CCh kasılma yanıtları, kontrol ve diyabet grubundan daha fazla idi, ancak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. İnsülin tedavisinin, diyabetik grupta Y-27632'nin yaptığı inhibisyonları düzeltemediği görüldü. İndometazin + Y-27632 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında doza bağımlı inhibisyon saptandı.



Şekil 89. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

$p < 0.001$ grup içi CCh'lerine göre,

§ $p < 0.001$, § $p < 0.05$ grup içi İnd'lerine göre,

ε $p < 0.05$ K İnd + Y-27632 (1 μ M)'a göre,

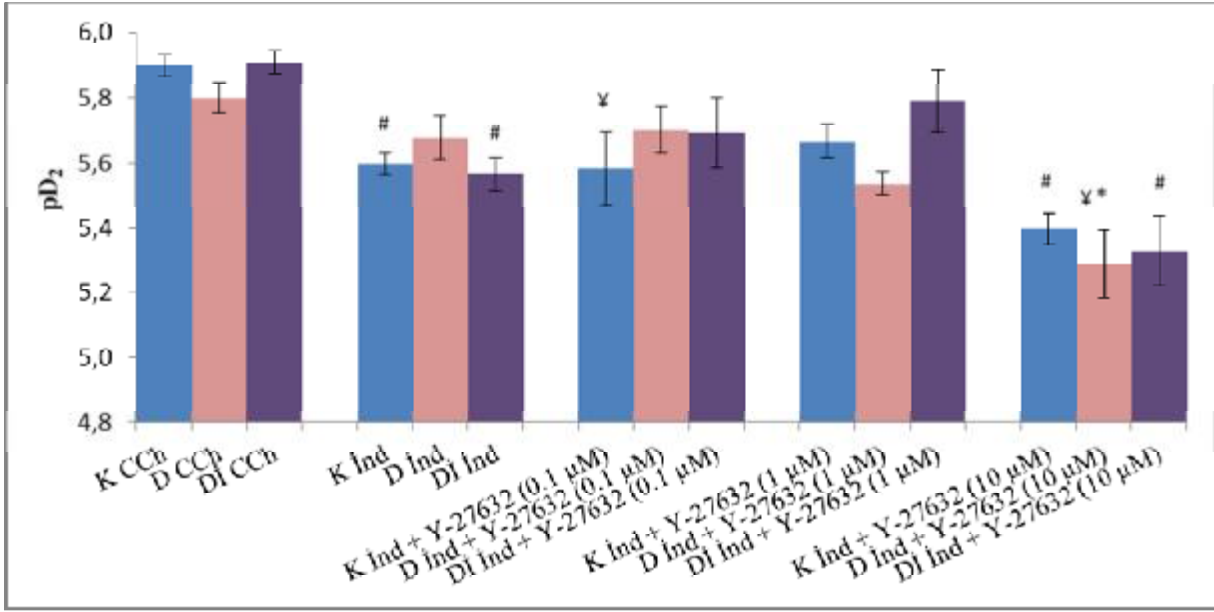
* $p < 0.001$ D İnd + Y-27632 (0.1 μ M)'a göre,

σ $p < 0.05$ D İnd + Y-27632 (1 μ M)'a göre,

& $p < 0.05$ DI İnd + Y-27632 (0.1 μ M)'a göre

6.2.17.b. Tüm Gruplarda İndometazin + Y-27632 Kombinasyonu Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

İndometazin ve indometazin ile birlikte Y-27632 kombinasyonlarının, CCh pD₂ değerlerini düşürdüğü gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 90). Kontrol CCh pD₂ değerlerine göre anlamlılık, kontrol grubunda tek başına indometazin ($p < 0.001$) ve indometazin + Y-27632 (0.1 ve 10 μ M); diyabet grubunda indometazin + Y-27632 (10 μ M); insülin tedavisi verilen diyabet grubunda ise tek başına indometazin ($p < 0.001$) ve indometazin + Y-27632 (10 μ M) varlığında saptandı ($p < 0.05$). CCh pD₂ değerlerinde en fazla azalma, üç grupta da indometazin ile Y-27632'nin yüksek konsantrasyonun (10 μ M) kombinasyonunda gözlemlendi ($p < 0.01$).



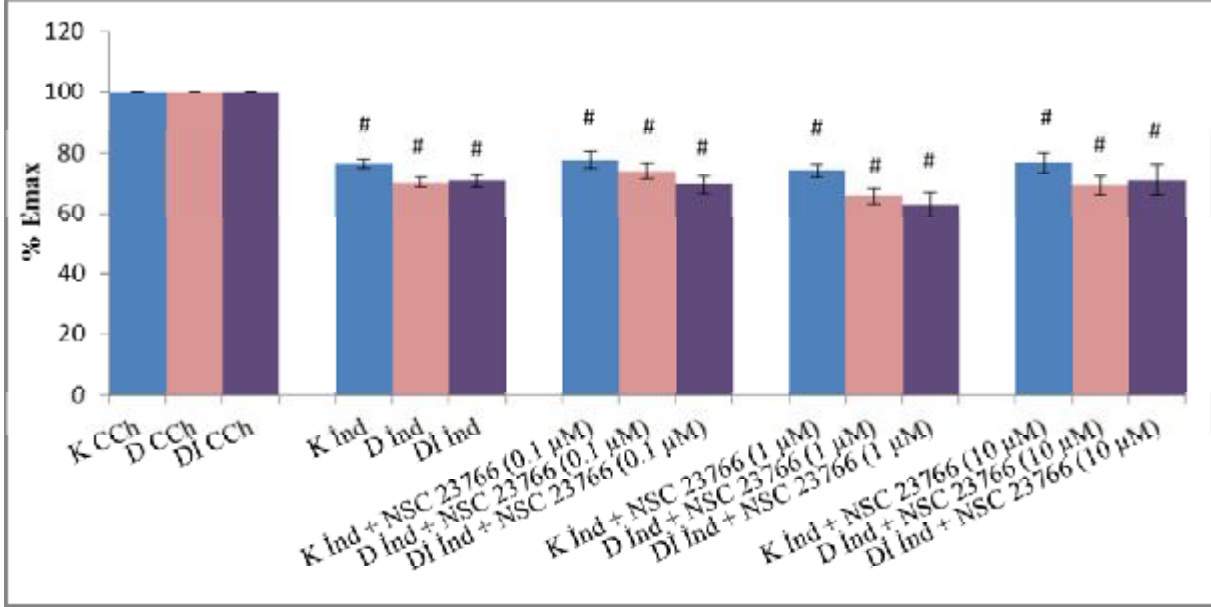
Şekil 90. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 kombinasyonu varlığında CCh pD₂ değerleri

$p < 0.001$, ¥ $p < 0.01$ grup içi CCh'lerine göre,

* $p < 0.05$ D İnd'e göre

6.2.17.c. Tüm Gruplarda İndometazin + NSC 23766 Varlığında CCh Emax Değerlerinin Karşılaştırılması

İndometazin + NSC 23766 varlığında, tüm gruplarda CCh Emax değerleri anlamlı olarak azaldı ($p<0.001$, Şekil 91). CCh Emax değerlerinde en fazla azalma (%37), insülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazin + NSC 23766 (1 μ M) varlığında gözlemlendi. İndometazin + NSC 23766 (10 μ M) varlığında insülin tedavisi verilen diyabet grubunda CCh kasılma yanıtları, diyabet grubundan daha fazla idi, ancak anlamlı bir fark bulunmadı. İnsülin tedavisinin, diyabet grubunda NSC 23766'nın yaptığı inhibisyonları düzeltmediği görüldü. İndometazin + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında, tüm gruplarda dozdan bağımsız inhibisyon saptandı.

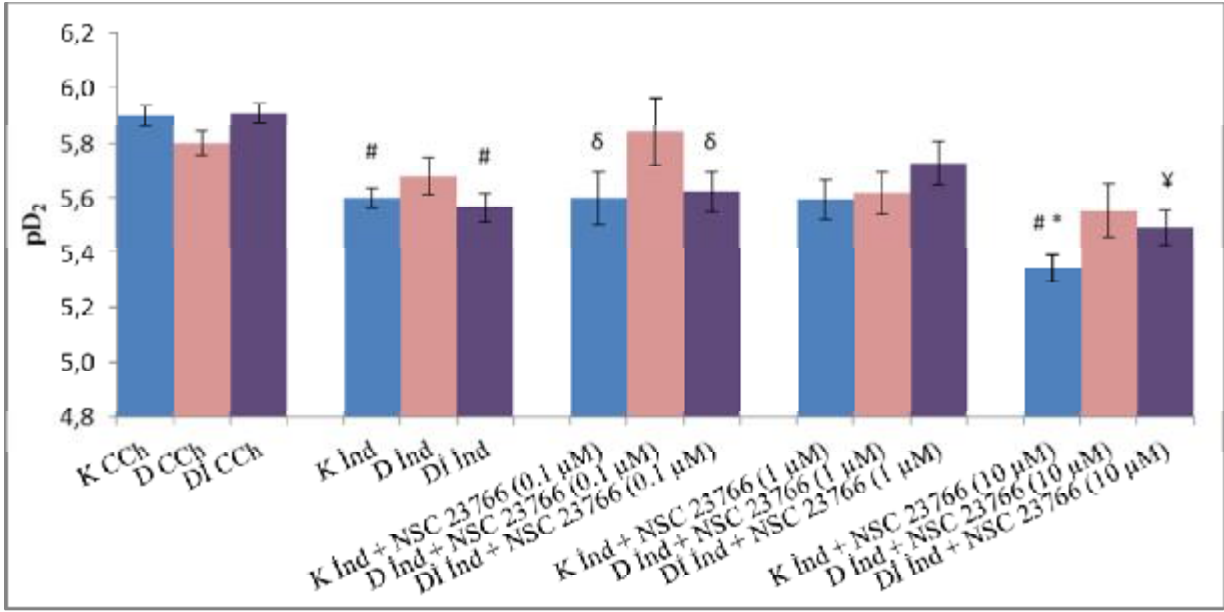


Şekil 91. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

$p<0.001$ grup içi CCh'lerine göre

6.2.17.d. Tüm Gruplarda İndometazin + NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

İndometazin ve indometazin ile birlikte NSC 23766 kombinasyonunun, CCh pD₂ değerlerini düşürdüğü gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 92). Kontrol CCh pD₂ değerlerine göre anlamlılık, kontrol ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında, tek başına indometazin ($p < 0.001$) ve indometazin + NSC 23766 (0.1 ve 10 μ M) varlığında saptandı ($p < 0.05$). CCh pD₂ değerlerinde en fazla azalma, üç grupta da indometazin ile NSC 23766'nın yüksek konsantrasyonun (10 μ M) kombinasyonunda gözlemlendi ancak istatistiksel anlamlılık sadece kontrol ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında bulundu ($p < 0.01$).



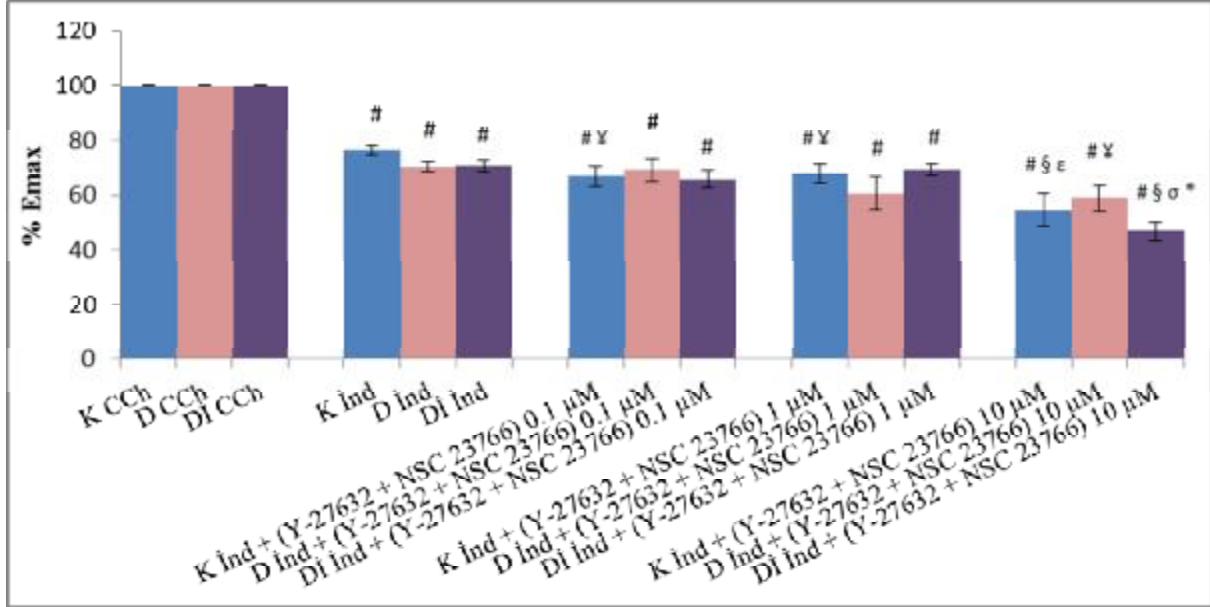
Şekil 92. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 kombinasyonu varlığında CCh pD₂ değerleri

$p < 0.001$, ¥ $p < 0.01$, δ $p < 0.05$ grup içi CCh'lerine göre,

* $p < 0.05$ K İnd'e göre

6.2.17.e. Tüm Gruplarda İndometazin + Y-27632 + NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh Emax Değerlerinin Karşılaştırılması

İndometazin + Y-27632 + NSC 23766 varlığında, tüm gruplarda CCh Emax değerleri anlamlı olarak azaldı ($p < 0.001$, Şekil 93). CCh Emax değerlerinde en fazla azalma, tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 μ M) varlığında gözlemlendi. İndometazin + Y-27632 + NSC 23766 (1 μ M) varlığında insülin tedavisi verilen diyabet grubundaki CCh kasılma yanıtları, diyabet grubundan daha fazla idi, ancak anlamlı bir fark bulunmadı. İnsülin tedavisinin, diyabet grubunda Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun yaptığı inhibisyonları düzeltmediği görüldü. İndometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M) varlığında, tüm gruplarda dozdan bağımsız inhibisyon saptandı.



Şekil 93. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

$p < 0.001$ grup içi CCh'lerine göre,

§ $p < 0.001$, ¥ $p < 0.05$ grup içi İnd'lerine göre,

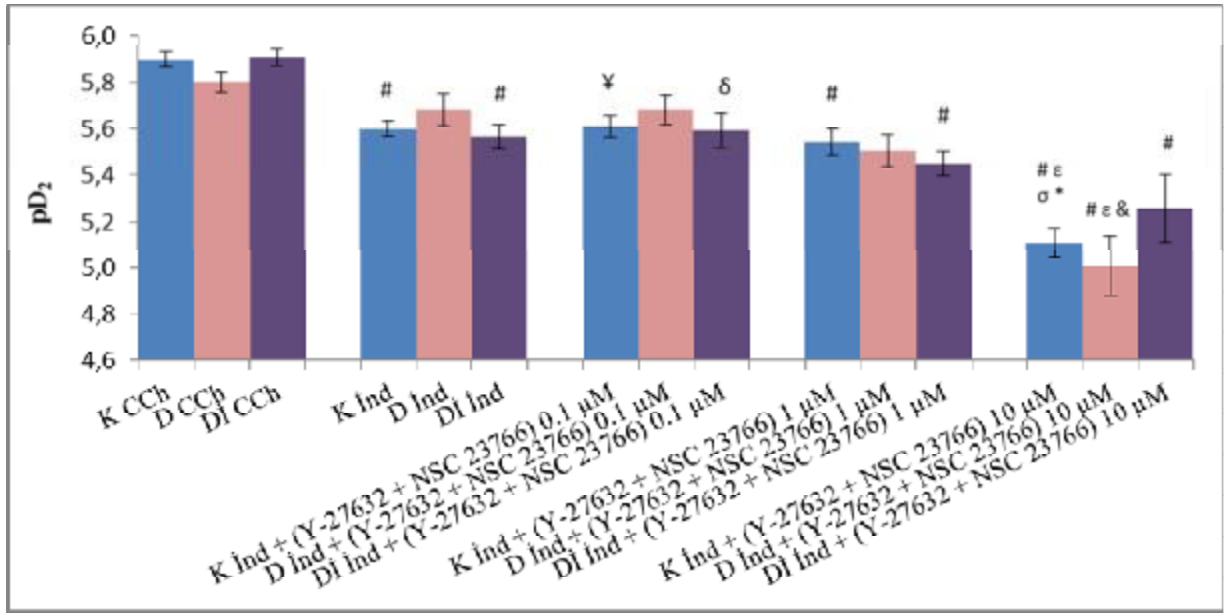
ε $p < 0.05$ D İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 μ M'a göre,

σ $p < 0.01$ Dİ İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 ve 1 μ M'a göre,

* $p < 0.05$ D İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 10 μ M'a göre

6.2.17.f. Tüm Gruplarda İndometazin + Y-27632 + NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında CCh pD₂ Değerlerinin Karşılaştırılması

İndometazin ve indometazin ile birlikte + Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunlarının, CCh pD₂ değerlerini düşürdüğü gözlemlendi ($p < 0.001$, Şekil 94). Kontrol CCh pD₂ değerlerine göre anlamlılık, kontrol ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında tek başına indometazin ($p < 0.001$) ve indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1, 1 ve 10 μ M); diyabet grubunda indometazin + Y-27632 (10 μ M) varlığında saptandı ($p < 0.05$). CCh pD₂ değerlerinde en fazla azalma, üç grupta da indometazin ile NSC 23766'nın yüksek konsantrasyonun (10 μ M) kombinasyonunda gözlemlendi ($p < 0.01$).



Şekil 94. Tüm gruplarda indometazin+ Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında CCh pD₂ değerleri

$p < 0.001$, ¥ $p < 0.01$, δ $p < 0.05$ grup içi CCh'lerine göre,

ε $p < 0.001$ grup içi İnd'lerine göre,

σ $p < 0.001$ K İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μ M'a göre,

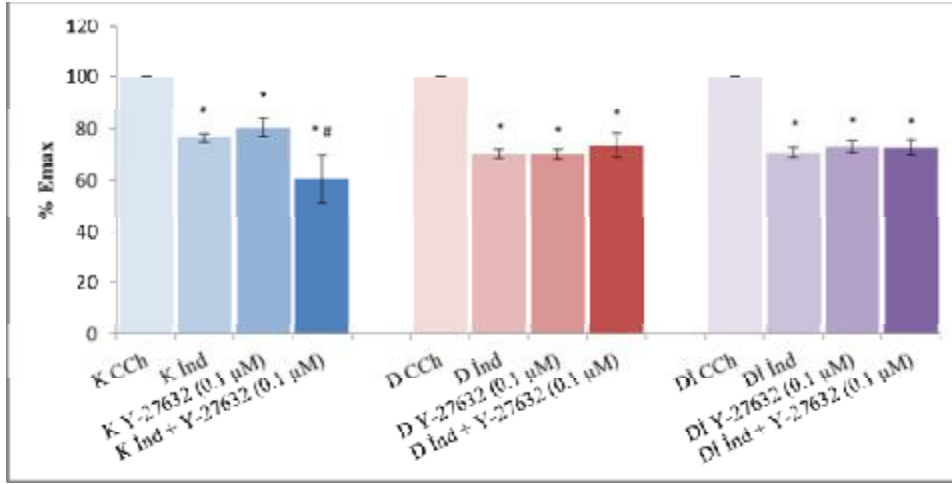
* $p < 0.01$ K İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 1 μ M'a göre,

& $p < 0.05$ D İnd + (Y-27632 + NSC 23766) 0.1 μ M'a göre

6.2.18. Tüm Gruplarda İndometazin'in, Y-27632 Varlığında Elde Edilen CCh Emax ve pD₂ Değerlerine Etkisi

6.2.18.a. İndometazin'in, Y-27632 (0.1 µM) Varlığında Elde Edilen CCh Emax Değerlerine Etkisi

Kontrol grubunda indometazinin, Y-27632'nin 0.1 µM konsantrasyonundaki etkisini anlamlı olarak arttırdığı bulundu (p<0.001). Diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında ise indometazinin, Y-27632'nin etkisini değiştirmedığı gözlemlendi (Şekil 95).

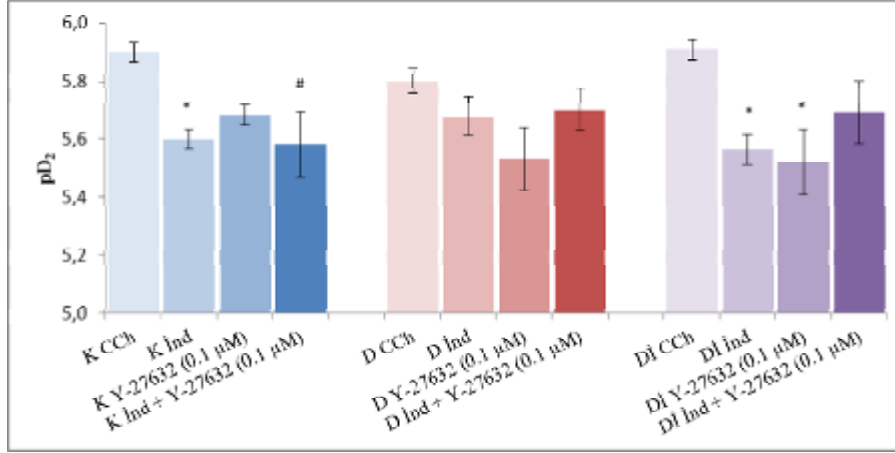


Şekil 95. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (0.1 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

* p<0.001 grup içi CCh'lerine göre, # p<0.001 K İnd'e göre

6.2.18.b. İndometazin'in, Y-27632 (0.1 μ M) Varlığında Elde Edilen CCh pD_2 Değerlerine Etkisi

Kontrol grubunda indometazinin, Y-27632'nin 0.1 μ M konsantrasyonundaki CCh pD_2 değerini istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte azalttığı; diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında ise indometazinin, Y-27632 varlığında elde edilen CCh pD_2 değerini istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte arttırdığı gözlemlendi (Şekil 96).

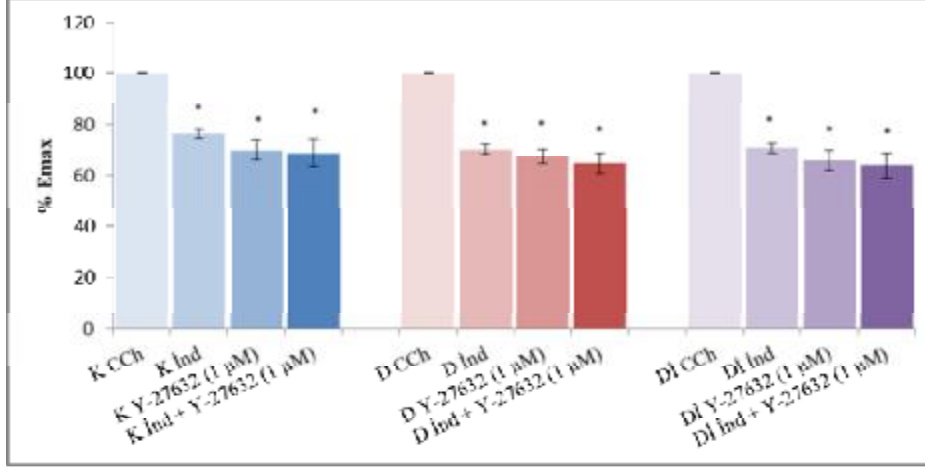


Şekil 96. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (0.1 μ M) kombinasyonu varlığında CCh pD_2 değerleri

* $p < 0.001$, # $p < 0.01$ grup içi CCh'lerine göre

6.2.18.c. İndometazin'in, Y-27632 (1 μ M) Varlığında Elde Edilen CCh Emax Değerlerine Etkisi

İndometazin, Y-27632'nin 1 μ M konsantrasyonundaki etkisini tüm deney gruplarında değiştirmedığı gözlemlendi (Şekil 97).

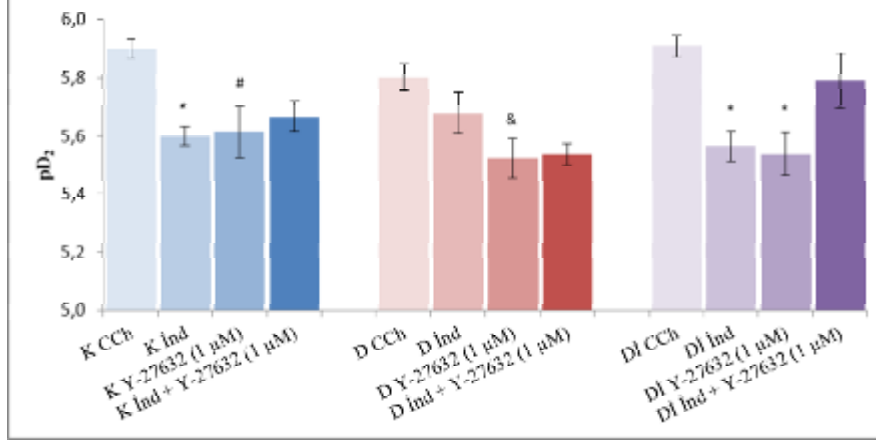


Şekil 97. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (1 μ M) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

* $p < 0.001$ grup içi CCh'lerine göre

6.2.18.d. İndometazin'in, Y-27632 (1 μ M) Varlığında Elde Edilen CCh pD_2 Değerlerine Etkisi

Diyabet grubunda indometazinin, Y-27632'nin 1 μ M konsantrasyonundaki CCh pD_2 değerini değiştirmediyi; kontrol ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında ise indometazinin, Y-27632 varlığında elde edilen CCh pD_2 değerini istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte arttırdığı gözlemlendi (Şekil 98).

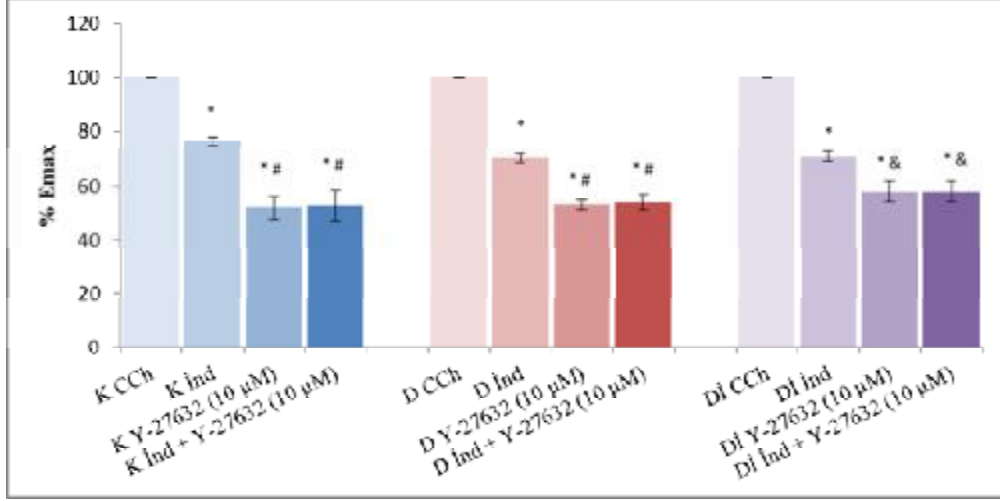


Şekil 98. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (1 μ M) kombinasyonu varlığında CCh pD_2 değerleri

* $p < 0.001$, # $p < 0.01$, & $p < 0.05$ grup içi CCh'lerine göre

6.2.18.e. İndometazin'in, Y-27632 (10 µM) Varlığında Elde Edilen CCh Emax Değerlerine Etkisi

Kontrol, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında, indometazinin Y-27632'nin 10 µM konsantrasyonundaki etkisini değiştirmediği gözlemlendi (şekil 99).



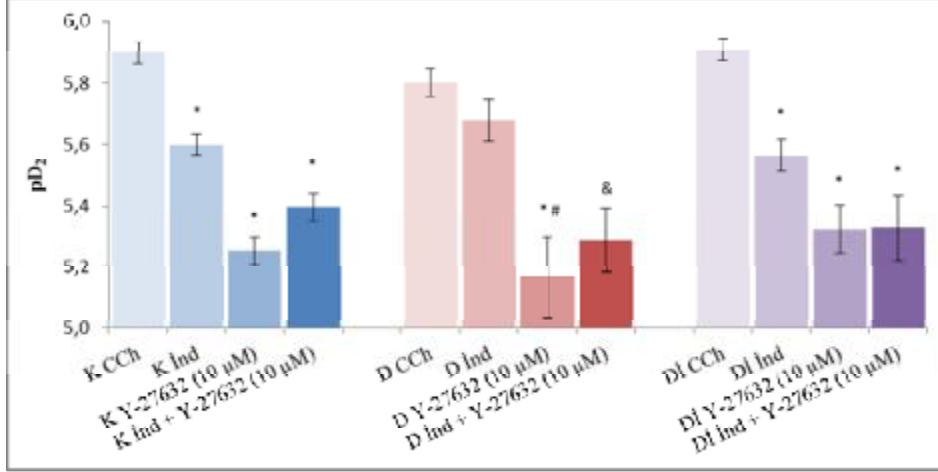
şekil 99. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (10 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

* $p < 0.001$ grup içi CCh'lerine göre,

$p < 0.001$, & $p < 0.01$ grup içi İnd'lerine göre

6.2.18.f. İndometazin'in, Y-27632 (10 µM) Varlığında Elde Edilen CCh pD₂ Değerlerine Etkisi

İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazinin, Y-27632'nin 10 µM konsantrasyonundaki CCh pD₂ değerini değiştirmediyi; diyabet ve kontrol gruplarında ise indometazinin, Y-27632 varlığında elde edilen CCh pD₂ değerini istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte arttırdığı gözlemlendi (Şekil 100).



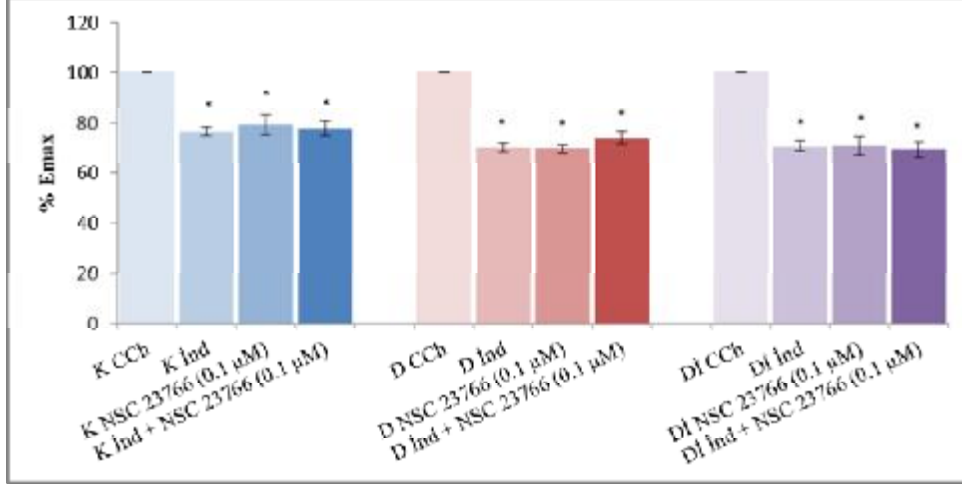
Şekil 100. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 (10 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD₂ değerleri

* p<0.001, & p<0.01 grup içi CCh'lerine göre, # p<0.05 D İnd'e göre

6.2.19. Tüm Gruplarda İndometazin'in, NSC 23766 Varlığında Elde Edilen CCh Emax ve pD₂ Değerlerine Etkisi

6.2.19.a. İndometazin'in, NSC 23766 (0.1 µM) Varlığında Elde Edilen CCh Emax Değerlerine Etkisi

Kontrol, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında, indometazinin NSC 23766'nın 0.1 µM konsantrasyonundaki etkisini değiştirmedığı gözlemlendi (Şekil 101).

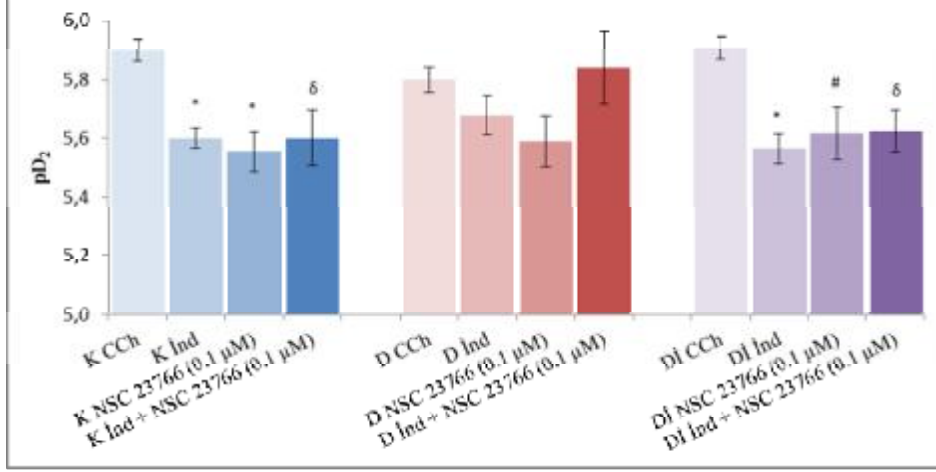


Şekil 101. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (0.1 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

* p<0.001 grup içi CCh'lerine göre

6.2.19.b. İndometazin'in, NSC 23766 (0.1 μ M) Varlığında Elde Edilen CCh pD_2 Değerlerine Etkisi

İndometazinin NSC 23766'nın 0.1 μ M konsantrasyonunda elde edilen CCh pD_2 değerini, kontrol ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında değiştirmediyi; diyabet grubunda ise istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte arttırdığı gözlemlendi (Şekil 102).

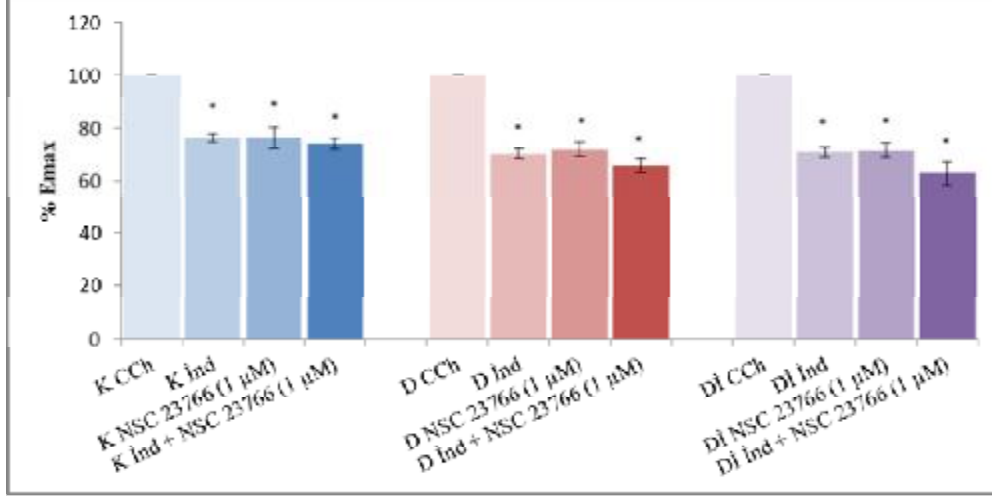


Şekil 102. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (0.1 μ M) kombinasyonu varlığında CCh pD_2 değerleri

* $p < 0.001$, # $p < 0.01$, δ $p < 0.05$ grup içi CCh'lerine göre

6.2.19.c. İndometazin'in, NSC 23766 (1 µM) Varlığında Elde Edilen CCh Emax Değerlerine Etkisi

Diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında indometazin, NSC 23766'nın 1 µM konsantrasyonundaki etkisini istatistik anlamlılık olmamakla birlikte arttırdığı saptandı (Şekil 103).

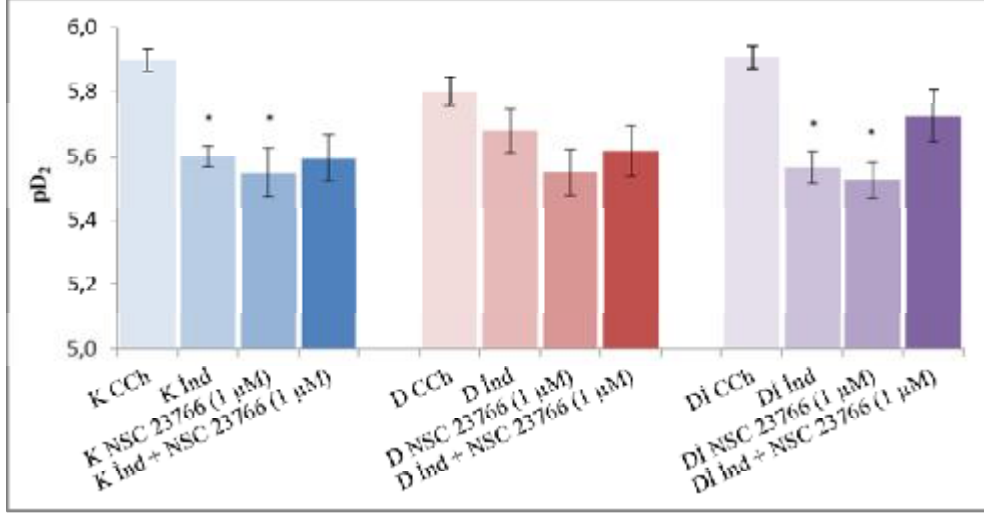


Şekil 103. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (1 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

* p<0.001 grup içi CCh'lerine göre

6.2.19.d. İndometazin'in, NSC 23766 (1 μ M) Varlığında Elde Edilen CCh pD_2 Değerlerine Etkisi

İndometazinin, NSC 23766'nın 1 μ M konsantrasyonundaki CCh pD_2 değerini tüm gruplarda, istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte arttırdığı gözlemlendi (Şekil 104).

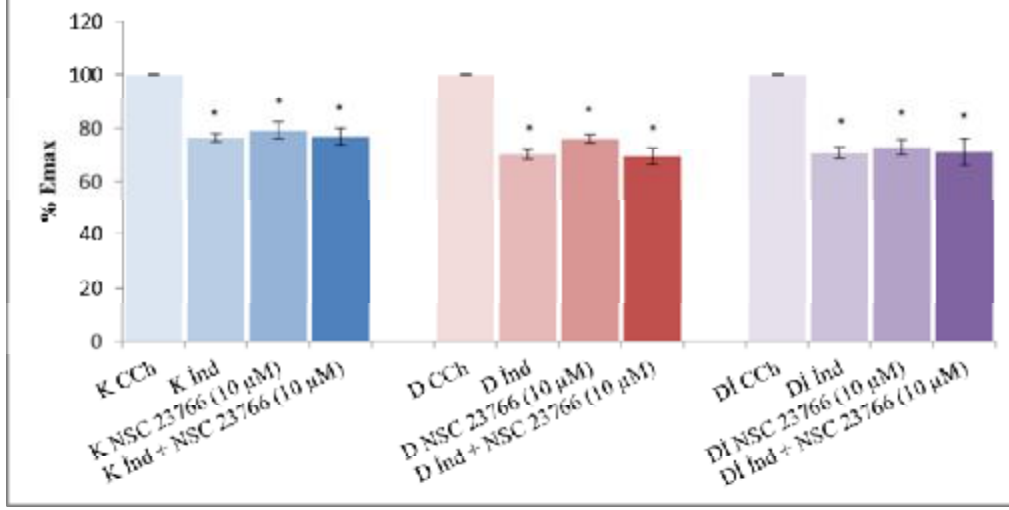


Şekil 104. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (1 μ M) kombinasyonu varlığında CCh pD_2 değerleri

* $p < 0.001$ grup içi CCh'lerine göre

6.2.19.e. İndometazin'in, NSC 23766 (10 µM) Varlığında Elde Edilen CCh Emax Değerlerine Etkisi

Diyabet grubunda indometazinin, NSC 23766'nın 10 µM konsantrasyonundaki etkisini istatistik anlamlılık olmamakla birlikte arttırdığı, diğer gruplarda ise NSC 23766'nın etkisini değiştirmedığı gözlemlendi (Şekil 105).

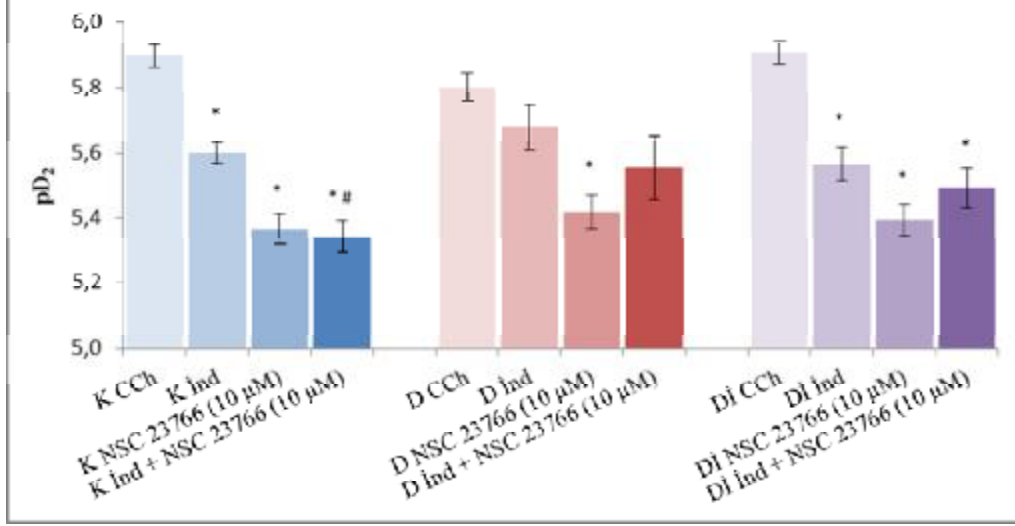


Şekil 105. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

* p<0.001 grup içi CCh'lerine göre

6.2.19.f. İndometazin'in, NSC 23766 (10 µM) Varlığında Elde Edilen CCh pD₂ Değerlerine Etkisi

Kontrol grubunda indometazinin, NSC 23766'nın 10 µM konsantrasyonundaki CCh pD₂ değerini değiştirmediği, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında ise CCh pD₂ değerini istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte arttırdığı gözlemlendi (Şekil 106).



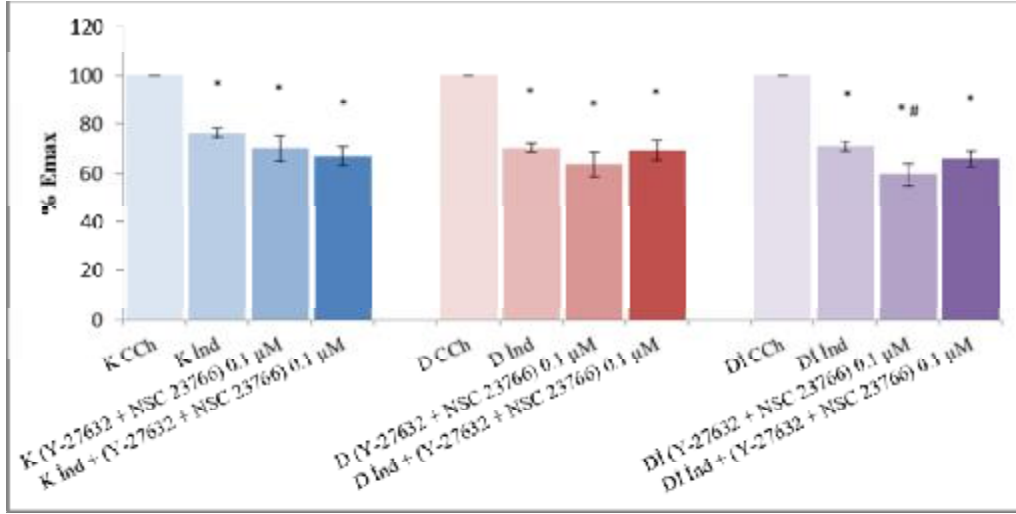
Şekil 106. Tüm gruplarda indometazin + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD₂ değerleri

* p<0.001 grup içi CCh'lerine göre, # p<0.05 K İnd'e göre

6.2.20. Tüm Gruplarda İndometazin'in, Y-27632 + NSC 23766 Kombinasyonu Varlığında Elde Edilen CCh Emax ve pD₂ Değerlerine Etkisi

6.2.20.a. İndometazin'in, Y-27632 + NSC 23766 (0.1 µM) Kombinasyonu Varlığında Elde Edilen CCh Emax Değerlerine Etkisi

Y-27632 + NSC 23766 (0.1 µM) ile indometazin'in üçlü kombinasyonunun, CCh kasılma yanıtlarında yaptığı inhibisyonların, üç deney grubunda da tek başına indometazin veya Y-27632 + NSC 23766 (0.1 µM) varlığında elde edilen inhibisyonlardan farklı olmadığı gözlemlendi (Şekil 107).



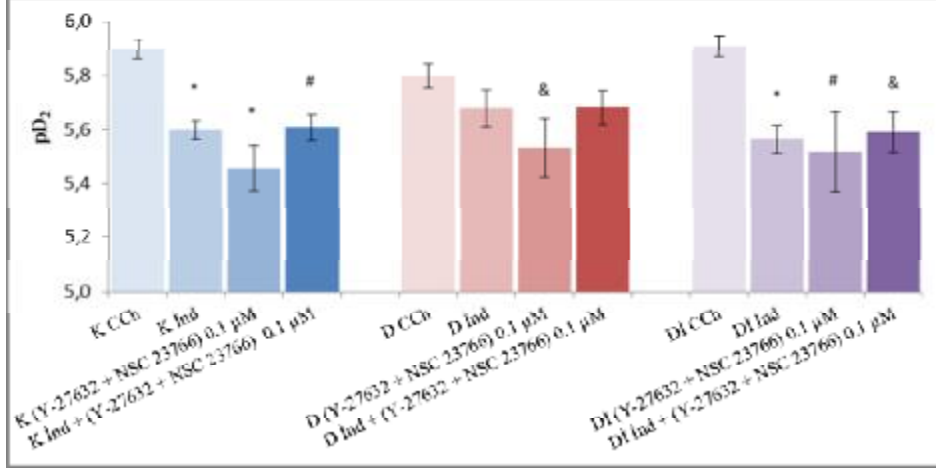
Şekil 107. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

* p<0.001 grup içi CCh'lerine göre,

p<0.01 Dİ İnd'e göre

6.2.20.b. İndometazin'in, Y-27632 + NSC 23766 (0.1 μ M) Kombinasyonu Varlığında Elde Edilen CCh pD_2 Değerlerine Etkisi

Küçük GTPaz inhibitörlerinin 0.1 μ M'lık kombinasyonu ile indometazinin üçlü kombinasyonunun CCh pD_2 değerlerinde yaptığı inhibitör etki karşılaştırıldığında; üç grupta da, indometazinin CCh pD_2 değerlerini istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte arttırdığı gözlemlendi (Şekil 108).

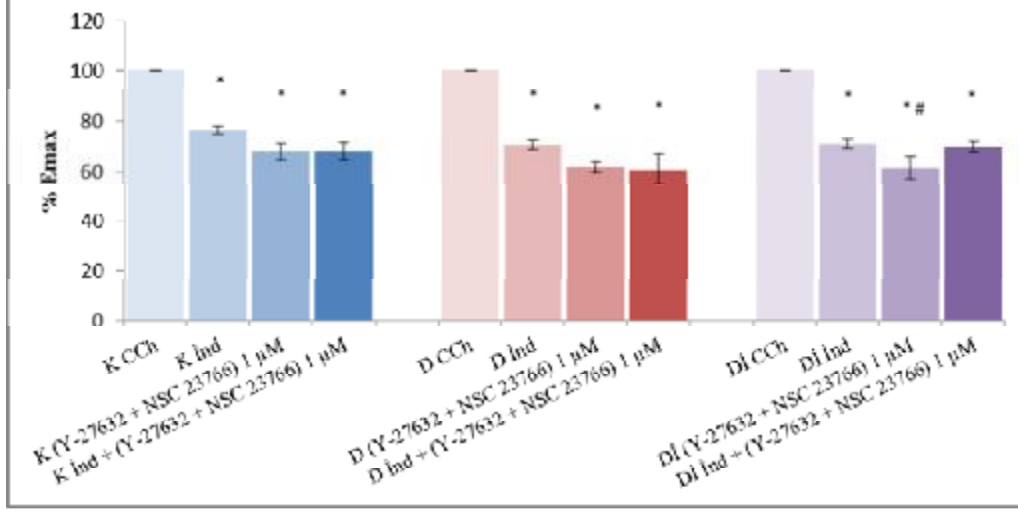


Şekil 108. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (0.1 μ M) kombinasyonu varlığında CCh pD_2 değerleri

* $p < 0.001$, # $p < 0.01$, & $p < 0.05$ grup içi CCh'lerine göre

6.2.20.c. İndometazin'in, Y-27632 + NSC 23766 (1 µM) Kombinasyonu Varlığında Elde Edilen CCh Emax Değerlerine Etkisi

Küçük GTPaz inhibitörlerinin 1 µM'lık kombinasyonu ile indometazinin üçlü kombinasyonunun yaptığı inhibitör etki karşılaştırıldığında, üç grupta da indometazinin Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonunun etkisini değiştirmedığı gözlemlendi (Şekil 109).



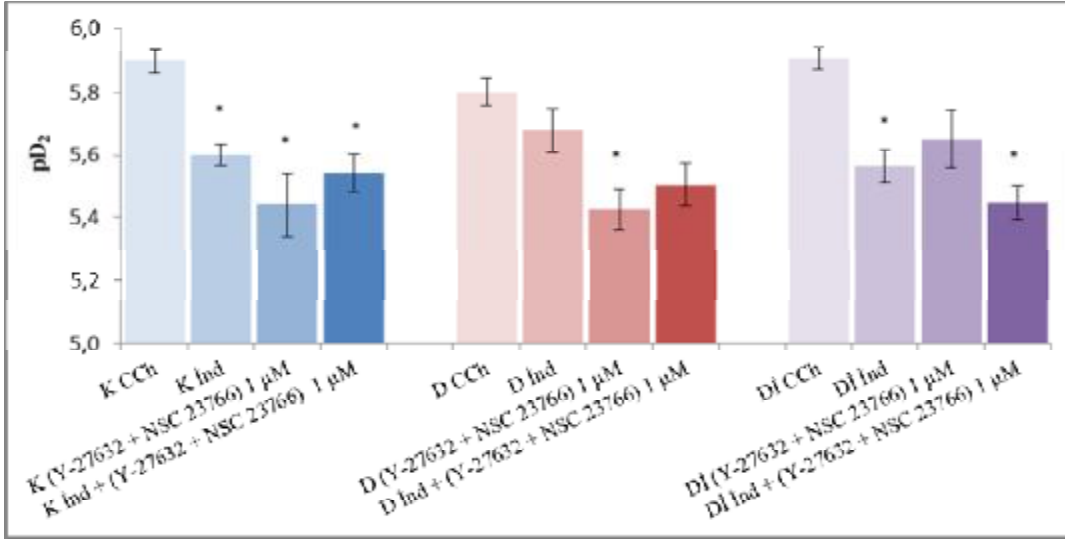
Şekil 109. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (1 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

* p<0.001 grup içi CCh'lerine göre,

p<0.05 Dİ İnd'e göre

6.2.20.d. İndometazin'in, Y-27632 + NSC 23766 (1 µM) Kombinasyonu Varlığında Elde Edilen CCh pD₂ Değerlerine Etkisi

Küçük GTPaz inhibitörlerinin 1 µM'lık kombinasyonu ile indometazinin üçlü kombinasyonunun CCh pD₂ değerlerinde yaptığı inhibitör etki karşılaştırıldığında; insülin tedavisi verilen diyabet grubunda indometazinin, Y-27632 + NSC 23766 (1 µM) kombinasyonu varlığında elde edilen CCh pD₂ değerini istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte düşürdüğü; kontrol ve diyabet gruplarında ise istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte arttırdığı gözlemlendi (Şekil 110).

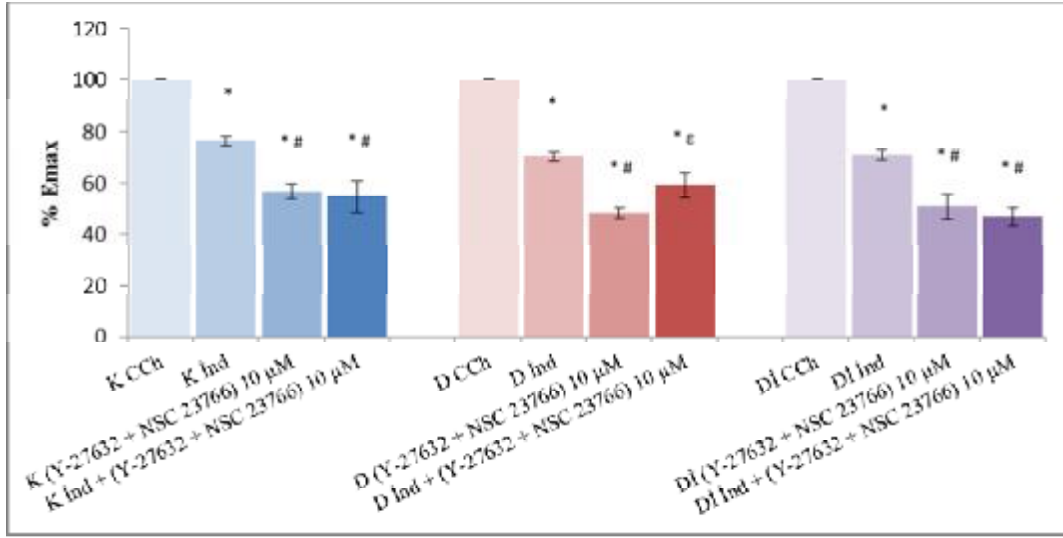


Şekil 110. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (1 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD₂ değerleri

* p<0.001, # p<0.05 grup içi CCh'lerine göre

6.2.20.e. İndometazin'in, Y-27632 + NSC 23766 (10 µM) Kombinasyonu Varlığında Elde Edilen CCh Emax Değerlerine Etkisi

Küçük GTPaz inhibitörlerinin 10 µM'lık kombinasyonu ile indometazinin üçlü kombinasyonun yaptığı inhibitör etkinin, diyabet grubunda tek başına indometazinin yaptığı inhibisyonu arttırdığı, ancak Y-27632 + NSC 23766 kombinasyonu varlığında elde edilen inhibisyonu arttırmadığı gözlemlendi. Üçlü kombinasyonlarda kontrol ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında ise değişiklik saptanmadı (Şekil 111).



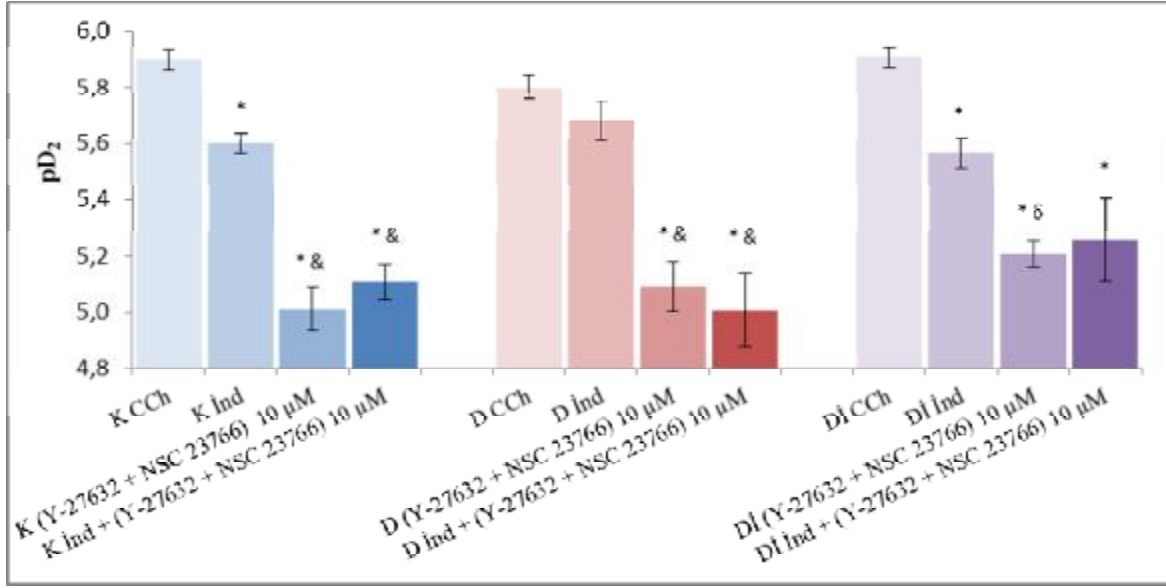
Şekil 111. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonu varlığında % CCh Emax değerleri

* p<0.001 grup içi CCh'lerine göre,

p<0.001, ε p<0.05 grup içi İnd'lerine göre

6.2.20.f. İndometazin'in, Y-27632 + NSC 23766 (10 µM) Kombinasyonu Varlığında Elde Edilen CCh pD₂ Değerlerine Etkisi

Küçük GTPaz inhibitörlerinin 10 µM'lık kombinasyonu ile indometazinin üçlü kombinasyonunun CCh pD₂ değerlerinde yaptığı inhibitör etki karşılaştırıldığında; diyabet grubunda indometazinin, Y-27632 + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonunu varlığında elde edilen CCh pD₂ değerini istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte düşürdüğü; kontrol ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte arttırdığı gözlemlendi (Şekil 112).



Şekil 112. Tüm gruplarda indometazin + Y-27632 + NSC 23766 (10 µM) kombinasyonu varlığında CCh pD₂ değerleri

* p<0.001, # p<0.05 grup içi CCh'lerine göre,

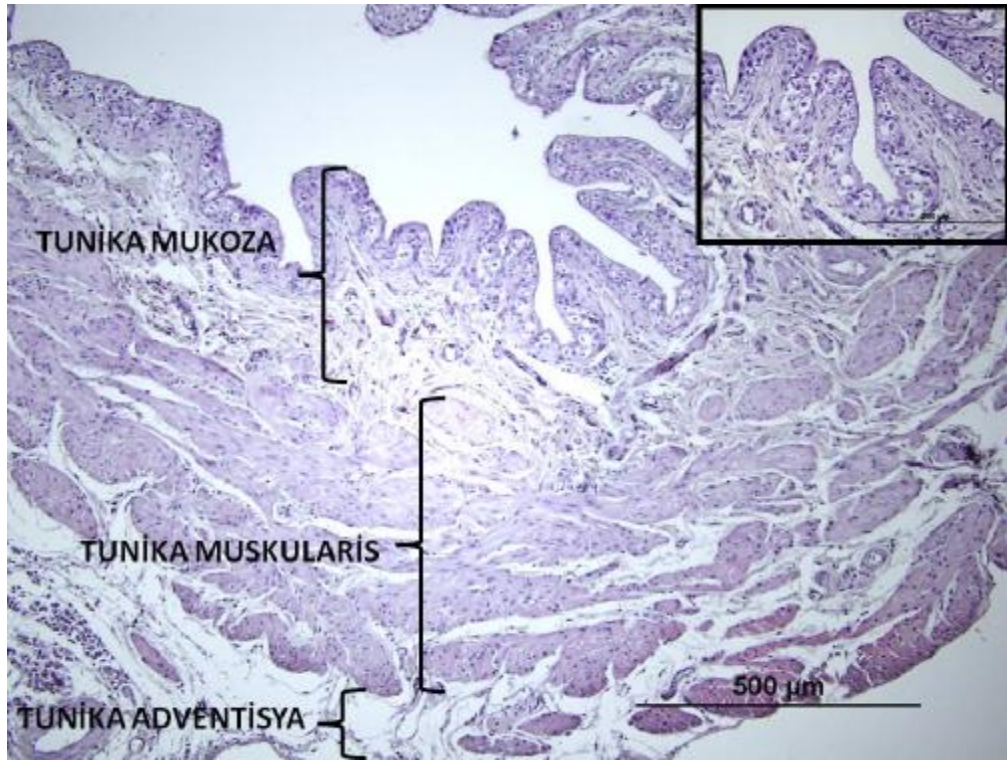
& p<0.001, δ p<0.05 grup içi İnd'lerine göre

6.3. Histopatolojik ve İmmunhistokimyasal İncelemeler

Histolojik incelemelerde kontrol, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet grupları için 8'er sıçandan elde edilen mesaneye ait doku örnekleri kullanıldı.

6.3.1. Işık Mikroskopik Bulgular

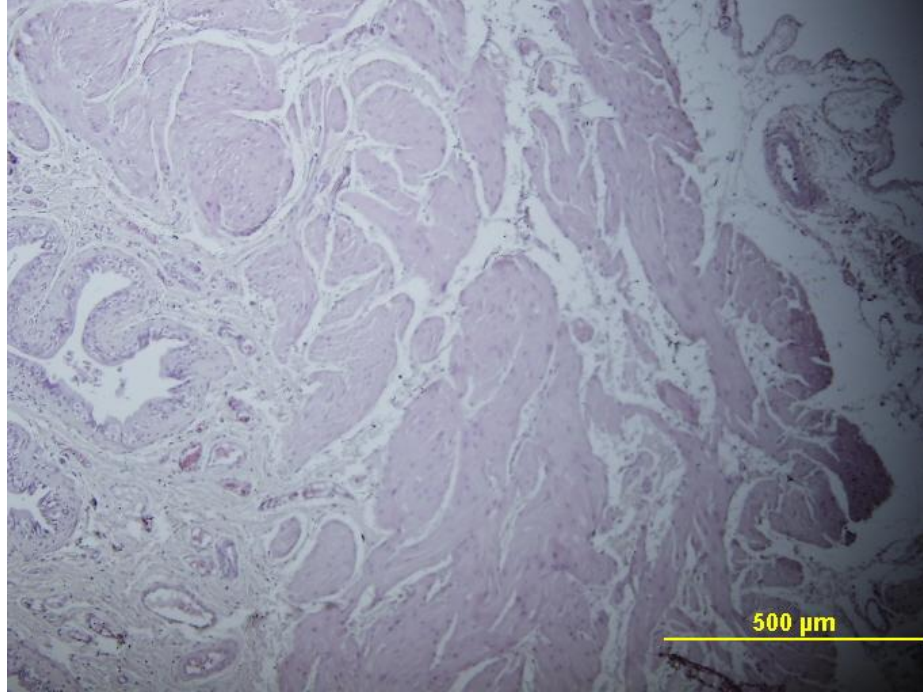
Mesane dokusunun hematoksilin-eozin (H&E) boyalı kesitlerinin mikroskopik incelenmesinde, her üç gruba ait dokular, histolojik olarak tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisyadan (seroza) oluşmaktaydı. Tunika mukoza tabakasında, transizyonel (değişici) epitelden oluşan lamina epitelyalis ve onu destekleyen lamina propria gözlenmekteydi. Tunika mukoza tabakası içte longitudinal, ortada sirküler ve dışta longitudinal olmak üzere üç kas tabakasından oluşuyordu. Kas tabakası dışta ise tunika adventisya tabakası ile devam etmekteydi (Resim 2).



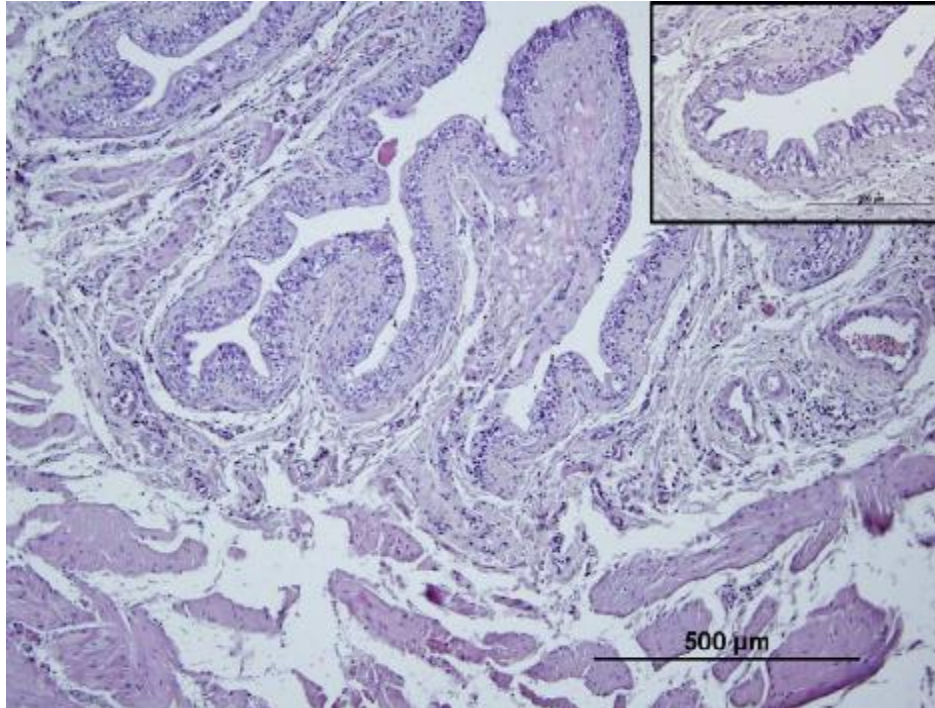
Resim 2. Kontrol grubunda mesane duvarının tam kat histolojik görünümü
(H&E; x40 ve H&E; x100 küçük resim)

Histolojik incelemede diyabet grubunda mesane dokusunu oluşturan epitel ve lamina propria tabakalarında farklılık gözlenmezken, tunika muskularis tabakasında kas fibrillerinin kontrol grubuna göre düzensiz olduğu gözlemlendi (Resim 3-4). İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda (Resim 5-6) tunika muskularis tabakası diyabet grubu ile benzer özellikteydi.

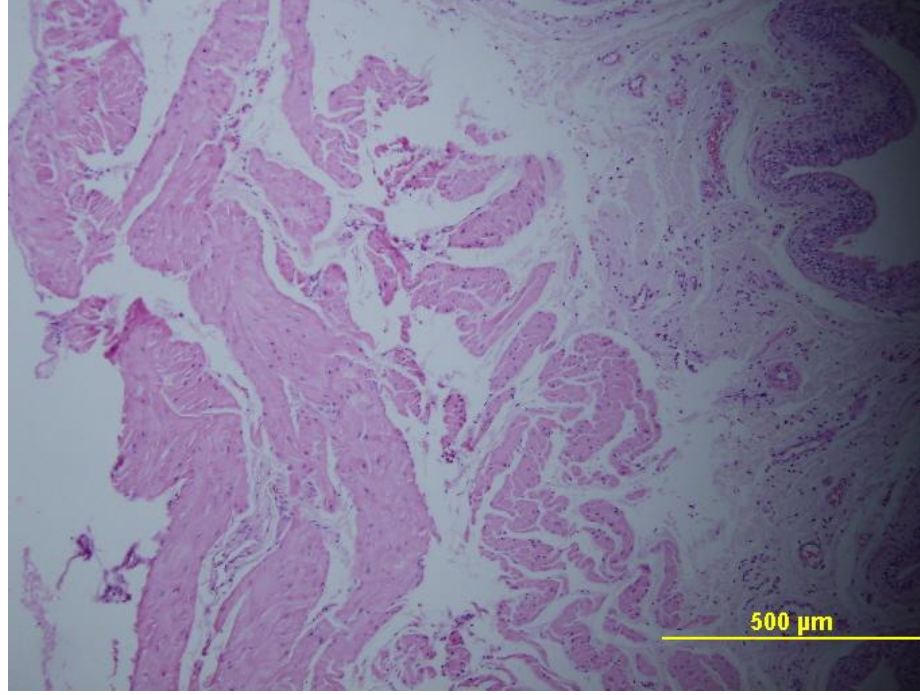
Histomorfometrik ölçümlerde mesane duvar kalınlığı kontrol grubunda $937.68 \pm 59.29 \mu\text{m}$, diyabet grubunda $1365.73 \pm 42.71 \mu\text{m}$, insülin tedavisi verilen diyabet grubunda ise $1280.34 \pm 32.22 \mu\text{m}$ olarak gözlemlendi. Diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarının mesane duvar kalınlıkları kontrol grubuna göre sırasıyla 1.5 ve 1.4 kat artmış bulundu ($p < 0.000$). Diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarının mesane duvar kalınlıkları arasında fark gözlenmedi ($p > 0.05$).



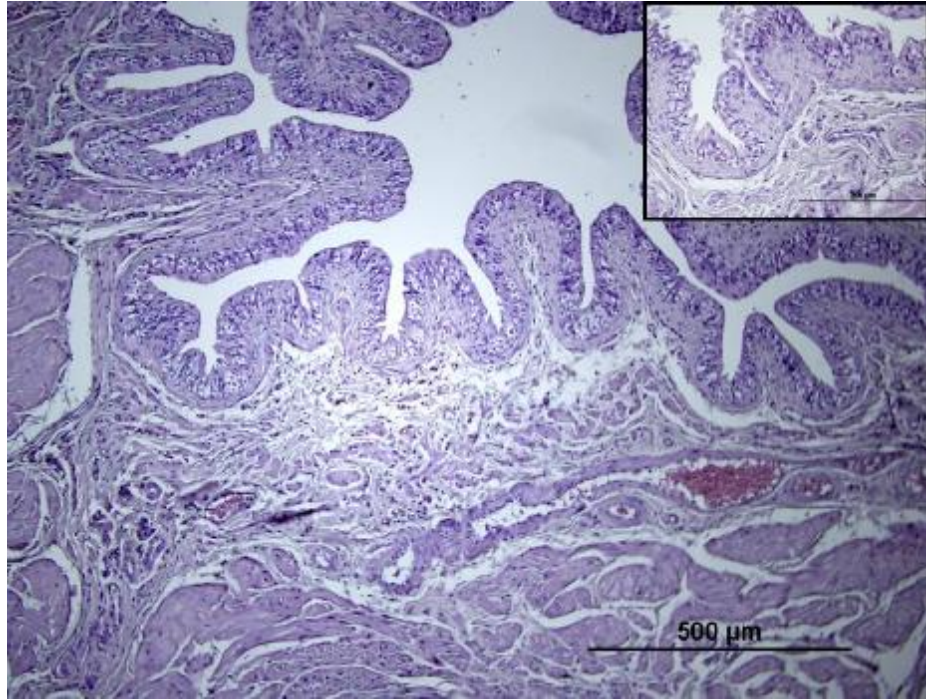
Resim 3. Diyabet grubunda mesane duvarının tam kat histolojik görünümü
(H&E; x40)



Resim 4. Diyabet grubunda mesane duvarının histolojik görünümü
(H&E; x40 ve H&E; x100)



Resim 5. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda mesane duvarının tam kat histolojik görünümü
(H&E; x40)



Resim 6. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda mesane duvarının histolojik görünümü
(H&E; x40 ve H&E; x100)

6.3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

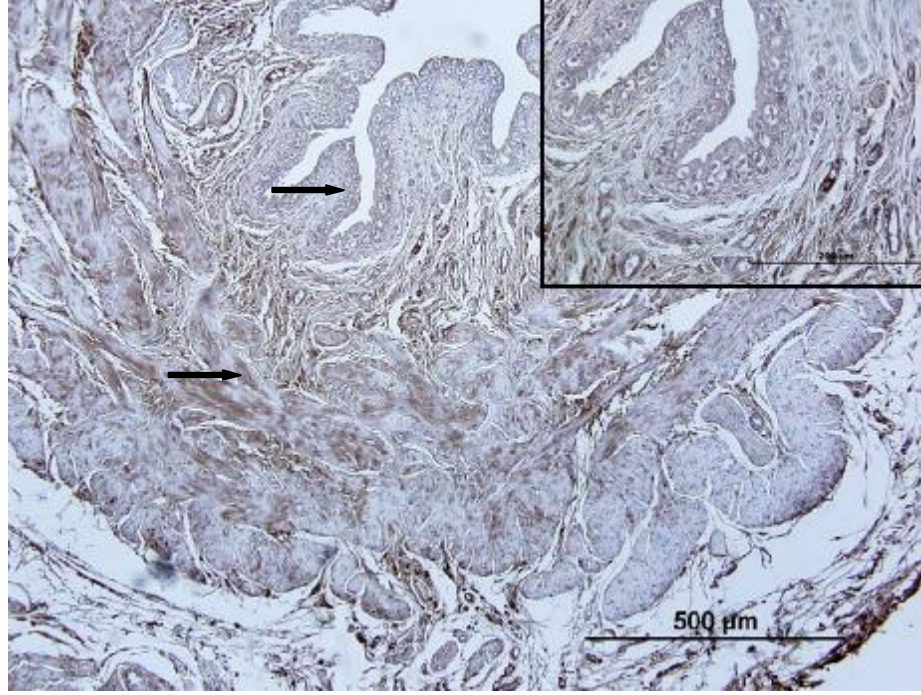
Çalışma gruplarına ait dokularda, mesane duvarında immunohistokimyasal olarak RhoA ve Rac1 ekspresyonu (boyanması) değerlendirildi. RhoA ve Rac1 ile pozitif (kahverengi) boyanmada epitel, lamina propria ve muskularis tabakaları arasında ve aynı tabaka içerisinde farklılık olup olmadığını incelendi. Bu incelemede, sonuçları nümerik olarak belirleyebilmek için sistematik alan sayımı ve semikantitatif değerlendirme yapıldı. Deneklere ait kesitler hazırlanırken her bir dokuda 10 kesit atlayarak alınan toplam beş kesit elde edildi. Mikroskopik incelemede her deneğe ait doku kesitinde her üç tabakada rastgele seçilen beş büyük büyütme alanında RhoA ve Rac1 için boyanma şiddeti ve yaygınlığı değerlendirildi ve puanlandı. Sayım kör olarak iki histolog tarafından yapıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı.

6.3.2.1 RhoA İmmunreaktivitesinin Değerlendirilmesi

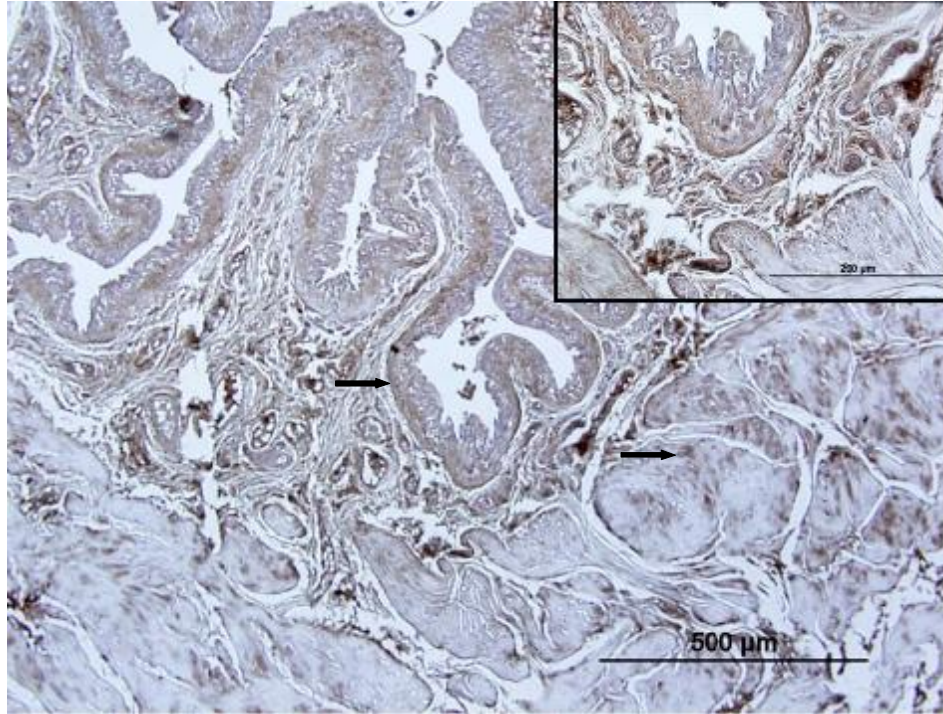
İmmunhistokimyasal yöntem ile RhoA ekspresyonunun, diyabet grubunda epitel tabakasında artış gösterdiği ancak bu artışın anlamlı olmadığı görüldü. Kas tabakasında RhoA ekspresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$, Tablo 2, Resim 7-9, oklar immun pozitif boyanmaları göstermektedir)

Tablo 2. Gruplararası RhoA immunreaktivitesinin semikantitatif olarak değerlendirmesi

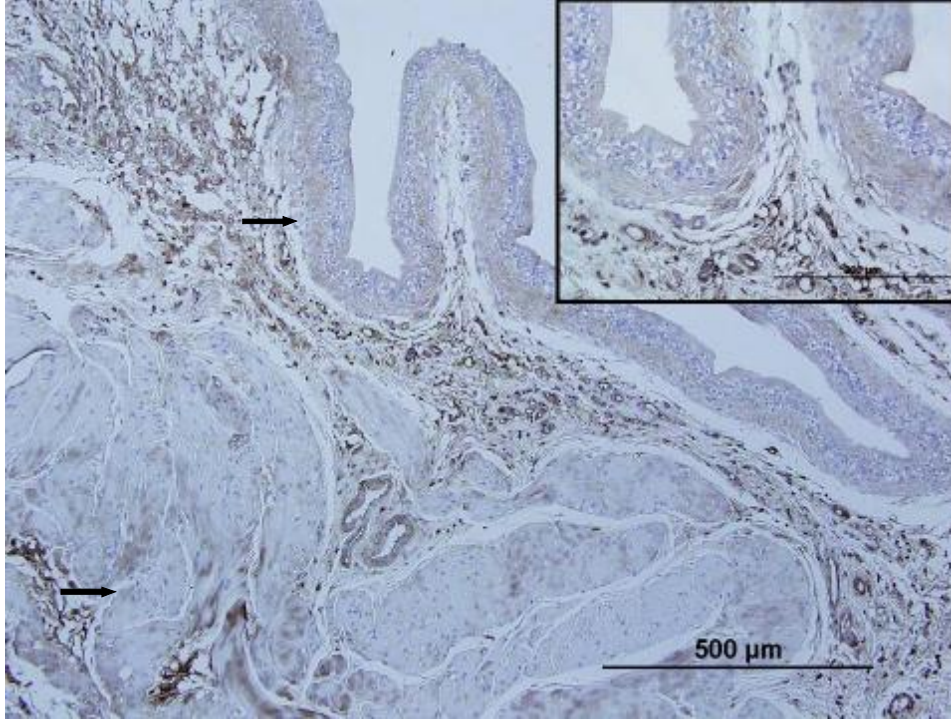
(Ort±SEM)	Epitel	Lamina Propria	Tunika Muskularis
K	1.40± 0.13	1.80±0.11	1.80±0.17
D	1.67± 0.13	1.95±0.11	2.19±0.13
Dİ	1.45±0.11	1,85±0.11	1.90±0.12



Resim 7. Kontrol grubunda immunohistokimyasal incelemede RhoA ekspresyonu
(H&E; x40 ve H&E; x100)



Resim 8. Diyabet grubunda immunohistokimyasal incelemede RhoA ekspresyonu
(H&E; x40 ve H&E; x100)



Resim 9. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda immunohistokimyasal incelemede RhoA ekspresyonu
(H&E; x40 ve H&E; x100)

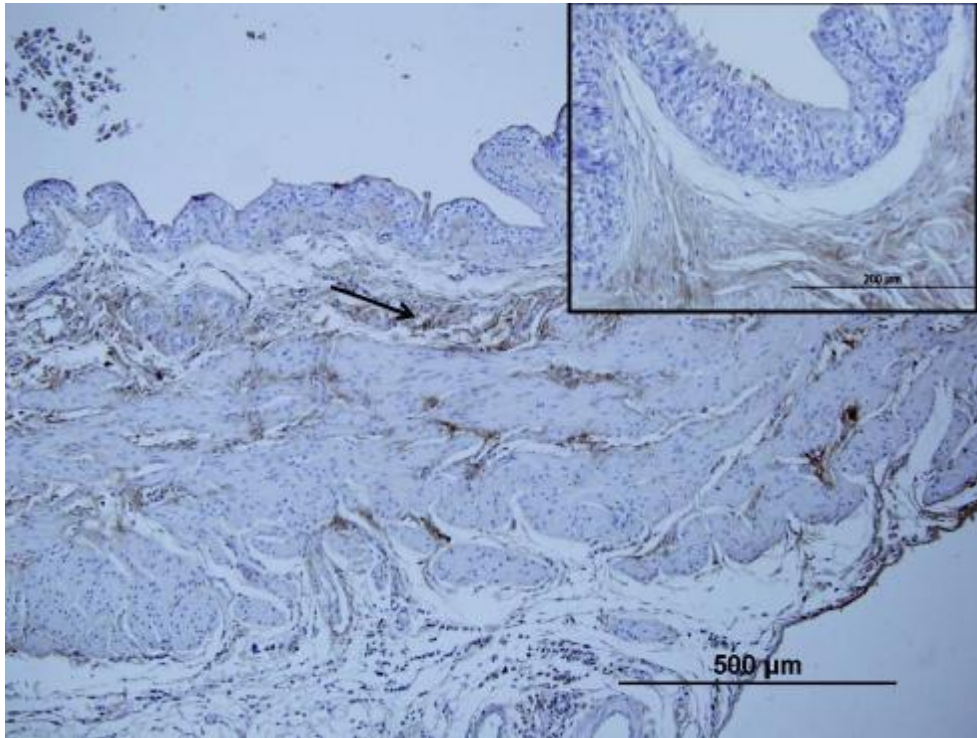
6.3.2.2 Rac1 İmmunreaktivitesinin Değerlendirilmesi

İmmunohistokimyasal incelemede Rac1 ekspresyonunda, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında, kontrol grubuna göre tüm tabakalarda; diyabet grubunda, insülin tedavisi verilen diyabet grubuna göre lamina propria ve tunika muskularis tabakalarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p<0.05$, oklar immun pozitif boyanmaları göstermektedir, Tablo 3, Resim 10-12).

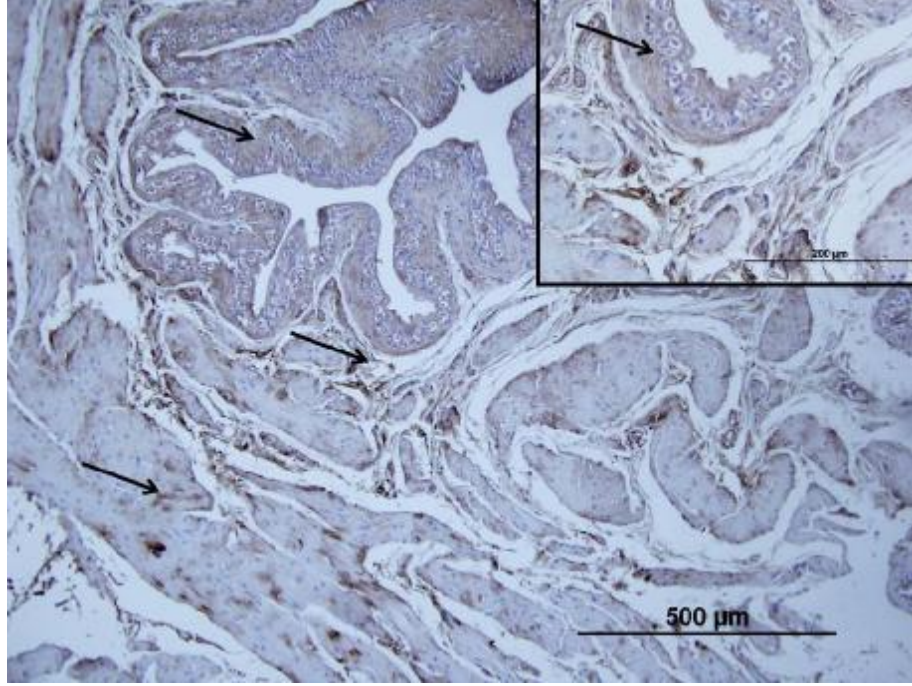
Tablo 3. Gruplararası Rac1 immünreaktivitesinin semikantitatif olarak değerlendirilmesi

Ort±SEM	Epitel	Lamina Propria	Tunika Muskularis
K	0.16±0.08	0.36±0.10	0.24±0.09
D	0.73±0.11 *	1.40±0.12 *	1.33±0.11 *
Dİ	0.57±0.09 *	0.70±0.10 * #	0.77±0.11 * #

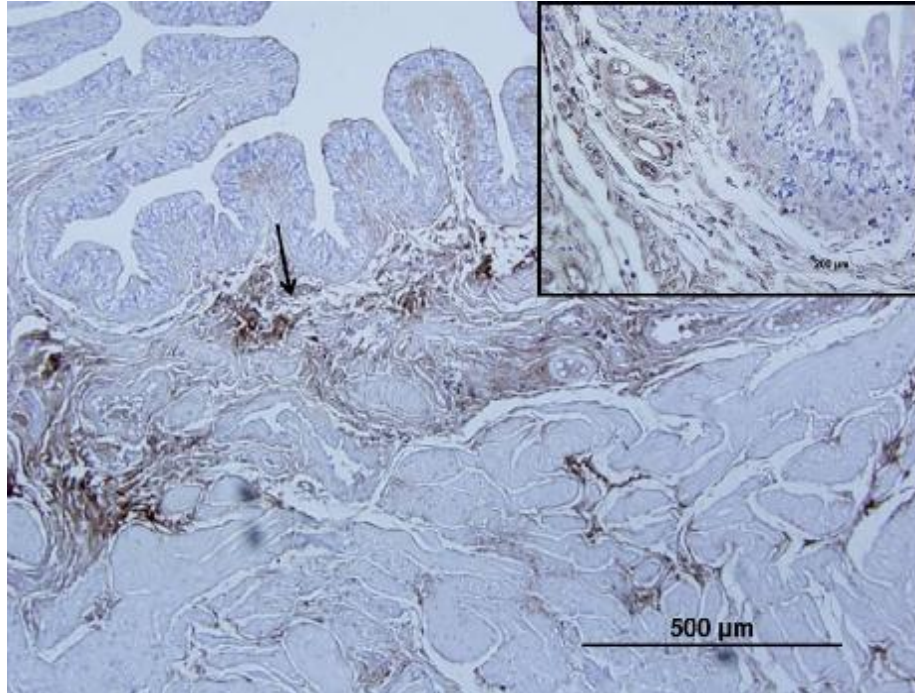
* $p<0.05$ K grubuna göre, # $p<0.05$ D grubuna göre



Resim 10. Kontrol grubunda immunohistokimyasal incelemede Rac1 ekspresyonu (H&E; x40 ve H&E; x100)



Resim 11. Diyabet grubunda immunohistokimyasal incelemede Rac1 ekspresyonu
(H&E; x40 ve H&E; x100)



Resim 12. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda immunohistokimyasal incelemede Rac1
ekspresyonu
(H&E; x40 ve H&E; x100)

7. TARTIŞMA

Diyabetes mellitus (DM) tüm dünyada en sık rastlanan endokrin hastalıktır. Diyabetik hastaların %80'inde, hayatı tehdit etmeyen ancak yaşam kalitesini bozan diyabetik işeme disfonksiyonu görülmektedir (1). Buna rağmen bu hastalığın gelişim süreci ve ürolojik komplikasyonların başlangıcı ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Bu bilgi yetersizliği, diyabetik işeme disfonksiyonlu hastalarda yeni ve etkili korunma ve/veya tedavi seçeneklerinin gelişimini kısıtlamaktadır (2).

Diyabette görülen komplikasyonlara neden olan bağımsız risk faktörlerinden biri hiperglisemidir. Hipergliseminin neden olduğu değişikliklerden biri de diürezi artırarak mesane hipertrofisine neden olmasıdır. Hem diyabetik hastalarda hem de diyabetik hayvan modellerinde mesane hipertrofisi gösterilmiştir. STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, kontrol grubuna göre vücut ağırlıklarının anlamlı olarak azaldığı, kan glukoz değerlerinin ve mesane ağırlıklarının anlamlı olarak arttığı pek çok çalışmada bildirilmiştir (13, 19, 129). Çalışmamızda diyabetik grupta daha önce bildirilen çalışmalar ile uyumlu olarak, sıçanların kan şekeri düzeylerinin arttığını, vücut ağırlıklarının azaldığını ve mesane ağırlıklarının arttığını gözledik. Tip I diyabetik sıçan modellerinde, insülin tedavisinin, kan glukoz değerlerini normale döndürdüğü ancak mesane hipertrofisini düzeltmediği (248-251) gösterilmiştir. İnsülin tedavisi uyguladığımız diyabetik grupta, kan şekeri düzeylerinin düştüğü, vücut ağırlıklarında diyabete bağlı beklenen azalmanın düzeldiği ancak mesane ağırlığındaki artışın değişmediğini saptadık.

Diyabete bağlı mesane disfonksiyonunun patogenezi multifaktöriyeldir. Bu faktörlerden biri de detrusor düz kas fonksiyonundaki değişikliklerdir. Kaplan ve ark. (1995), en sık görülen ürodinamik bulgunun, detrusor aşırı aktivitesi (%48) olduğunu; bunu azalmış detrusor kontraktilesi (%30) ve bozulmuş kompliyansın (%15) izlediğini bildirmişlerdir (106). Çalışmamızda mesane detrusor düz kas fonksiyonlarında diyabete bağlı olarak gelişen değişiklikler, organ banyosu deneyleri ile test edildi. Organ banyosuna asılan mesane detrusor kas şeritlerinde KCl'e bağlı kasılma yanıtlarının, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu saptandı. STZ ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde, detrusor kasa uygulanan farklı konsantrasyonlardaki KCl'ün, diyabetik mesanelerde kontrole göre daha güçlü kasılma yanıtları oluşturduğu pek çok

çalışmada gösterilmiştir (118, 252, 253). Bazı çalışmalarda ise STZ ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde, KCl kasılma yanıtlarında, kontrol ve diyabet grupları arasında fark bulunmadığı bildirilmiştir (129, 254). Başka çalışmalarda da alloxan ile indüklenen diyabetik tavşan izole mesane striplerinde, kontrole göre KCl kasılma yanıtlarının düştüğü (149, 255) veya değişmediği (256) bildirilmiştir. Ancak bu çalışmalar incelendiğinde; denenen KCl konsantrasyonun (30 mM) çok düşük olduğu (129) veya diyabet süresinin kısa (dört hafta) olduğu (254) ya da tavşan gibi farklı bir deney hayvanı ve alloxan indüksiyonu gibi farklı bir diyabet modelinin (149, 255, 256) kullanıldığı görülmüştür. Bizim diyabet grubunda elde ettiğimiz KCl kasılma yanıtlarımızın, STZ ile indüklenmiş sıçan modellerindeki sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Detrusor düz kasındaki aşırı aktivitenin, düz kastaki muskarinik reseptör dansitesinin artmasına bağlı olduğunu bildiren birçok çalışma bulunmaktadır. STZ ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde de muskarinik uyarıya mesane duyarlılığı ve maksimum kasılma yanıtlarının arttığı bildirilmektedir. Diyabetik sıçanlarda muskarinik reseptör dansitesinin (12, 122) ve IP₃ üretiminin arttığı (123) gösterilmiştir. Diyabetik sıçanlarda STZ ile diyabet indüksiyonundan iki hafta sonra, hem detrusor kasta hem de ürotelyumda M₂ ve M₃ reseptör ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir (124-126).

Yenilmez ve ark. (2006), sıçanlarda STZ ile diyabet indüksiyonundan sekiz hafta sonra yaptıkları izole detrusor kas organ banyosu çalışmasında, CCh kasılma yanıtlarının diyabetik grupta, kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı bildirmiştir (252). Daneshgari ve ark. (2006), STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda yaptığı çalışmada, STZ enjeksiyonundan altı ve dokuz hafta sonra diyabetik grupta kontrole göre, CCh yanıtlarında sırası ile %65 ve %73 artış olduğunu bildirmişlerdir (118). STZ ile indüklenen diyabet modelinde, diyabetik mesanelerde, aynı haftadaki kontrollerine göre ACh kasılma yanıtlarının daha fazla olduğu gösterilmiştir (253, 257). Bu çalışmalarda muskarinik agonistlere (CCh veya ACh) verilen yanıtlardaki artışın, genel olarak diyabetik sıçanların mesanesinde M₃ muskarinik reseptörlerin artmasına ve hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunun ve/veya duyarlılığın artmasına bağlı olduğu bildirilmiştir (258, 259).

Çalışmamızda, kümülatif dozlarda uygulanan CCh'ün, tüm gruplarda doza bağımlı kasılma yanıtları oluşturduğunu; diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında, CCh kasılma yanıtları ve Emax değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını saptadık. Sonuçlarımızın diyabetik sıçanlarda, muskarinik agonistlere kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre arttığını gösteren birçok çalışma ile uyumlu olduğu görülmektedir (118, 248, 252, 253, 257).

Latifpour ve ark. (1989), sekiz haftalık STZ ile indüklenen sıçan detrusor kasında kontrole göre muskarinik agonistlere (CCh, ACh ve betanekol) kasılma yanıtının arttığını ancak EC₅₀ değerlerinin kontrol ve diyabetik grupta benzer olduğunu bildirmiştir (260). Bizim çalışmamızda da CCh Emax değerleri, diyabetik grupta artmış olmasına rağmen CCh pD₂ değerleri tüm gruplarda birbirine yakın bulundu. Gruplar arasında CCh'ün etki gücü açısından fark bulunmaması, daha önce yapılmış diğer çalışmalar ile uyumluydu (259, 260).

Diyabette muskarinik agonist aracılı kasılma yanıtlarının artmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Kubota ve ark. (2003), STZ ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde, tek doz uyguladıkları CCh'ün oluşturduğu kasılma yanıtlarında (g), kontrol ve diyabet grupları arasında fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Diyabetik kasta muskarinik agonistlere yanıt olarak artan kasılma yanıtlarının kümülatif denenen agonistlerin yüksek konsantrasyonlarında daha belirgin olduğu ve bu çalışmada kullandıkları tek doz CCh'ün konsantrasyonunun (0.6 µM) düşük olması nedeniyle kontrol ve diyabet gruplarında kasılma yanıtların aynı olduğunu açıklamışlardır (129). Alloksan ile indüklenen diyabetik tavşan izole mesane striplerinde yapılan çalışmalarda, CCh (255, 256) ve betanekol (149) kasılma yanıtlarının, diyabetik grupta kontrol grubuna göre azaldığı bildirilmiştir. Bu çalışmalarda farklı gibi gözükten sonuçların, CCh'ün tek ve düşük doz denenmesi ya da tavşan gibi farklı türdeki diyabetik hayvanların kullanılması nedeniyle olabileceği görülmektedir.

M₃ muskarinik reseptörler G_{q/11} ile kenetli reseptörler olduğundan aktive edildiklerinde hücre içinde IP₃ ve diaçilgliserol miktarları artmakta ve bunun sonucunda hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunda artış olmakta ve düz kas kasılması oluşmaktadır. Bu nedenle muskarinik reseptörlerin aktive ettiği reseptör sonrası olaylar ve sinyal ileti molekülleri, diyabette görülen mesane disfonksiyonunu açıklamak için üzerinde çalışılan alanlardır. Mimata ve ark. (1995),

STZ ile indüklenen diyabetik ve sükröz içirilerek diürezin arttırıldığı sıçanlarda yaptıkları ve mesanelerinde muskarinik reseptör aracılı fosfatidilinozitol (PI) metabolizmasını araştırdıkları çalışmada; gruplar arasında [3H]-myo-inositol uptake'inde farklılık görmez iken, diyabetik mesanelerde myoinositolün PI ile birleşmesinin anlamlı olarak arttığını ve CCh ile indüklenen PI üretiminin diyabetik mesanelerde daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Muskarinik reseptör agonisti ile uyarılan kasılmadaki artışın, sadece diyabetik mesanede muskarinik reseptörlerin upregüle olması ile değil, ayrıca myoinositolün PI ile birleşmesinin artması ile de açıklanabileceğini ileri sürmüşlerdir (259). Waring ve ark. (2000), STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda CCh ile kasılma uyarıldıktan sonra, kasılma yanıtını ve hücre içi $[Ca^{2+}]$ düzeylerini ölçmüşler ve diyabetik grupta kontrole göre kasılmada artış olduğunu ancak bu artışa $[Ca^{2+}]$ artışının eşlik etmediği bildirmişlerdir. Bu nedenle de diyabette kasılma yanıtındaki artışın, Ca^{2+} konsantrasyonundaki artışa değil, Ca^{2+} 'a artmış duyarlılığa bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (13). Ancak Nobe ve ark. (2009), tip II diyabetik ob/ob fare detrusor kas striplerinde, CCh kasılma yanıtlarının ve Emax değerlerinin kontrole göre arttığını ve bu artışın diyabetik grupta, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu artışı ile korele olmakla birlikte, Rho kinaz inhibitörü ile inhibe edilmesi nedeniyle, diyabetik mesane kasılmasında kalsiyum sensitizasyonundaki artışın daha belirleyici olduğunu bildirmişlerdir (182).

Rho/Rho kinaz yolağı, düz kas kasılması ve özellikle de kalsiyumu sensitizasyonundan sorumlu olması nedeniyle düz kas disfonksiyonu bulunan çeşitli hastalıklarda oldukça dikkat çeken konulardan biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda detrusor düz kas disfonksiyonunda RhoA'nın rolünün olduğu ve Rho kinaz inhibitörlerinin detrusor düz kas disfonksiyonunda etkili olabileceği ileri sürülmüştür (17, 182). Diyabetik hayvanların mesane dışı çeşitli dokularında Rho/Rho kinaz sinyalinin arttığı bilinmektedir (134-136). Diyabetik mesane düz kasında Rho kinaz ekspresyonlarının kontrole göre daha fazla olduğu, alloksan ile indüklenen tip I diyabetik tavşanların detrusor kaslarında gösterilmiştir (17). Aynı çalışmada Rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin MLC fosforilasyon düzeyini düşürdüğü ve betanekol ile kastrılan detrusor düz kas striplerinde kas gevşemesine neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca diyabetik mesanede Rho kinaz β (ROCK β) izoformunun mRNA ve protein ekspresyonu düzeylerinin sırası ile on ve iki kat arttığını bildirmişlerdir (17). Sonuç olarak, düz kasın yüksek glukoz koşullarına adaptasyonunda Rho kinazın önemli rol oynayabileceğini; diyabete

bağlı detrusor kasılmasında ve mesane disfonksiyonunda Rho kinaz aracılı Ca^{2+} sensitizasyonunun rolünün olabileceğini ileri sürülmüştür (17).

Diyabetik sıçanlarda Rho kinaz inhibitörünün, detrusor kasılmasını diyabetik grupta, kontrol grubuna göre daha fazla inhibe ettiği, dolayısıyla diyabetik mesane detrusor kasılmasında Rho/Rho kinaz yolağının daha etkili olduğu ve bu sonucun da Rho kinaz ekspresyonunun detrusor düz kasında artmış olduğunu bildiren diğer çalışmalarla (17) uyumlu olduğu bildirilmiştir (133). İn vitro ve in vivo çalışmalardan elde edilen bu sonuçlara göre, Rho kinaz inhibitörlerinin gelecekte, mesane disfonksiyonlarının tedavisinde ve/veya önlenmesinde kullanılabileceği ileri sürülmektedir (35, 133, 261). Çalışmamızda diyabet grubunda Rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin, CCh kasılma yanıtlarını tüm konsantrasyonlarda anlamlı ve doza bağımlı olarak inhibe ettiğini saptadık. Diyabet grubunda CCh Emax ve pD_2 değerlerinde gözlenen düşmenin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha fazla olduğunu gözledik. CCh Emax değerlerinde diyabette kontrole göre daha fazla inhibisyon görülmesi, diyabette Rho/Rho kinaz yolağının etkinliğinin artmış olmasına bağlanabilir. Çalışmamızda Rho kinaz inhibitörü Y-27632 varlığında, diyabetik mesane detrusor kasında CCh kasılma yanıtlarında görülen değişikliklerin, daha önce yapılmış çalışmalar ile uyumlu olduğu dikkate alınırsa, STZ ile indüklenen diyabetik sıçan mesane kasılma yanıtlarındaki artışa neden olan faktörlerden birinin kalsiyum sensitizasyonu olduğu söylenebilir.

Diyabete bağlı komplikasyonlara neden olan faktörlerden biri de oksidatif stresin artmasıdır. Küçük GTPaz Rac1'in ROS üretiminde ve dolayısıyla ROS'ne bağlı olarak gelişen komplikasyonlarda ve hastalıklarda rolü olduğu düşünülmektedir. Rac1, NADPH oksidaz enziminin bir subüniti olarak ROS oluşumunu arttırdığından, artmış hücre içi serbest radikallere bağlı olarak, hücre büyümesi, göçü, transformasyonu ve apoptozis gibi pek çok hücreyel olayda rol oynamaktadır (230, 231). Rac1'in kardiyovasküler sistemde, böbrek ve hematopoetik hücrelerdeki rollerini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır (235-236). Rac1'in diyabetik vasküler komplikasyonlarda rolü olabileceği ve damarlarda Rac1 ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir (262, 263). Rac1 ayrıca düz kas kasılmalarında rolü olan bir sinyal ileti molekülüdür (264, 265). Dokudan dokuya fark göstermekle birlikte bazı dokularda gevşetici bazı dokularda kasıcı etki gösterir (235, 264, 265). Organ banyosuna

asılan diyabetik aort şeritlerinde Rac1 inhibitörü NSC23766'nın, asetilkolin gevşeme yanıtlarını inhibe ettiği bildirilmiştir (266). Diyabetik farelerde Rac1 aracılı NADPH oksidaz aktivasyonunun, kardiyomyositlerde (231) ve intestinal epitelyal hücrelerde (232) apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. Ancak Rac1'in mesane detrusor kası veya ürotelyumundaki ekspresyonları ve mesane fonksiyonlarındaki rolü ile ilgili olarak bulunan tek çalışma diyabetik fare mesanesinde Rac1'in efektör makromolekülü olan Pak1 ekspresyonunun ve oksidatif stresin arttığını bildiren bir çalışmadır ve bu çalışmada da Rac1'in mesane fonksiyonlarındaki rolü çalışılmamıştır (18).

Çalışmamızda diyabet grubunda Rac1 inhibitörü NSC 23766, CCh kasılma yanıtlarını tüm konsantrasyonlarda anlamlı ve düşük dozda daha fazla olacak şekilde inhibe etti. Diyabet grubunda CCh Emax değerlerinde gözlenen düşmenin, kontrol grubundan daha fazla olduğu görülse de sadece düşük dozda (0.1 μ M) iki grup arasında anlamlı fark bulundu. Diyabet grubunda CCh pD₂ değerlerinin ise kontrol grubuna göre arttığı ancak iki grup arasında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi. Fare aort şeritlerinde ve diyabetik sıçan aort şeritlerinde Rac1 inhibitörü NSC 23766'nın ACh'in yaptığı gevşeme yanıtını inhibe ettiği bildirilmiştir (235, 266). Bizim çalışmamızda da Rac1 inhibitörü NSC 23766, hem kontrol hem de diyabetik grupta CCh kasılma yanıtlarını inhibe etti, ancak bu inhibisyon doza bağımlı değildi. Bu yönüyle çalışmamız, mesane düz kas fonksiyonlarında Rac1'in rolünü gösteren ve aynı zamanda diyabetik hayvanlarda daha fazla etki görülmesi nedeniyle diyabete bağlı mesane disfonksiyonunda rolü olabileceğini gösteren ilk çalışmadır.

Küçük GTPaz'lar RhoA ve Rac1 arasında bir denge olduğu ve çoğu zaman zıt yönde fonksiyon gösterdikleri bilinmektedir. Özellikle damar endotelinden NO sentez ve salınımında Rac1 arttırıcı etki yaparken (235, 267, 268). RhoA'nın inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir (269). ROCK1'in Rac1 ve RhoA aktivitesi üzerinde dikotom etkisi olduğu da gösterilmiştir (270). ROCK1'in prostat kanser hücre hatlarında (PC-3), Rac1-GEF Tiam1 fonksiyonunu baskılayarak, Rac1 aktivitesini düşürdüğü bildirilmiştir (270). Aynı çalışmada, ROCK1 inhibitörü fasudil veya ROCK siRNA ile Rho/Rho kinaz yolağının suprese edilmesinin Rac1 aktivasyonunu arttırdığı, aynı şekilde NSC 23766 ile Rac1'in inhibe edilmesinin Rho aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (270).

Buradan yola çıkarak, diyabetik mesanede tek başına Rho/Rho kinaz yolağı ile ilgili çalışmalar bulunmasına rağmen, Rac1 ile ilgili çalışma olmaması ve RhoA/Rac1 aktiviteleri arasındaki dengenin mesanede hangi yönde (aynı/zıt) olduğunun bilinmemesi nedeniyle, diyabetik mesanede Rho ve Rac1 inhibitörlerini kombine uygulayarak etkilerini araştırdık. Organ banyosunda ekimolar konsantrasyonlarda kombine edilen inhibitörlerin düşük (0.1 μ M) ve orta (1 μ M) konsantrasyonlarında, kontrol grubunda CCh kasılma yanıtlarında yaptığı inhibisyonun, tek başlarına yaptıkları inhibisyonlardan daha fazla olduğunu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını saptadık. Yüksek dozda kombine edilen inhibitörlerin (10 μ M) neden olduğu inhibisyonun, tek başına Rac1 inhibitörünün yaptığı inhibisyonlardan anlamlı olarak daha fazla olduğunu ancak tek başına Rho kinaz inhibitörünün yaptığı inhibisyonlardan daha az inhibisyona neden olduğunu gözledik. Bu sonuç çelişkili gözükmeyle birlikte Rac1'in tek başına yaptığı inhibisyonun paternine bakıldığında zıt bir şekilde yüksek dozda yaptığı inhibisyonun en düşük seviyede olduğu ve dolayısıyla Rho kinaz inhibitörü ile kombine edildiğinde bu inhibisyonun artması doğaldır. Y-27632'nin doza bağımlı inhibisyon yaptığı ve en fazla inhibisyonu en yüksek dozda yaptığı göz önüne alındığında, Rac1 inhibitörünün bu inhibisyonu daha fazla arttırmaması da doğaldır. Bu sonuçlara dayanarak kontrol grubu mesane kasılmalarında, küçük GTPaz'ların rolü olduğu ve RhoA ve Rac1'in aynı yönde aktivite göstererek mesane düz kas kasılmalarında işlev gördüğü ve birbirlerinin etkisini arttırdığı sonucuna vardık. Bu bulgular da mesane düz kas kasılmasında fizyolojik olarak küçük GTPaz'ların aynı yönde etki göstererek detrusor düz kas kasılmasını arttırdığını gösteren ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir.

Diyabet grubunda ise ekimolar konsantrasyonlarda kombine edilen inhibitörlerin, CCh kasılma yanıtlarında yaptığı inhibisyonun, tek başlarına yaptıkları inhibisyonlardan daha fazla olduğu gözlemlendi. Kombine inhibitör varlığında gözlenen inhibitör etki daha fazla olmasına rağmen, tek başına Y-27632'nin yaptığı inhibitör etki ile arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak orta ve yüksek dozlarda kombine edilen inhibitörlerin, aynı dozdaki Rac1 inhibitörüne göre anlamlı olarak daha fazla inhibisyon yaptığı gözlemlendi. Bu sonuçlara bakıldığında kontrol grubunda sadece yüksek doz kombinasyon ile yüksek doz Rac1 inhibitörü arasında anlamlı fark görülürken, diyabetik grupta orta ve yüksek dozlarda kombinasyonlar ile Rac1 inhibitörü arasında anlamlı fark gözlenmesi, diyabette mesane kasılmalarında küçük GTPaz'ların

rolünün artmış olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bu bulgular, diyabetik sıçanlarda da mesane düz kas kasılmasında RhoA ve Rac1'in aynı yönde etki yaptıklarını göstermektedir.

Kombine GTPaz inhibitörlerinin CCh pD₂ değerleri üzerine etkisi kontrol, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında değerlendirildiğinde, gruplar arasında fark olmadığı ve ayrıca kombine inhibitör varlığında elde edilen pD₂ değerlerinin, tek başına inhibitör varlığında elde edilen pD₂ değerleriyle farklı olmadığı saptandı. Kombine küçük GTPaz inhibitörlerinin, diyabette kontrole göre daha fazla inhibisyon yapması etkililik açısından birbirlerinin etkisini arttırdığını göstermektedir. Ancak gruplar arasında pD₂ değerleri açısından fark olmaması, küçük GTPaz inhibitörlerinin kombine edilmesinin etki gücünü arttırmadığını düşündürmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalarla, insülin tedavisinin hem glisemik kontrolü düzelterek hem de tip I ve tip II diyabette uzun dönem komplikasyonları azaltarak yararlı olduğu gösterilmiştir. Diyabetli hastalarda optimal bir glisemik kontrolün retinopati, nöropati, nefropati ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik komplikasyonları geciktirebileceği veya önleyebileceği bilinmektedir. Yoğun insülin tedavisinin, komplikasyonları azaltmada daha etkili olduğu bildirilmektedir (271). Bir çalışmada kan şekerinin sıkı kontrolü sayesinde diyabet ile ilişkili kalp krizi ve inmelerin %50 oranında azaldığı bildirilmiştir (272). Diyabetik hastalarda gösterilen yararlı etkilerine benzer şekilde insülin tedavisinin diyabetik hayvan modellerinde de diyabete bağlı komplikasyonları geciktirdiği ya da önlediği bildirilmektedir. Düşük doz insülin infüzyonunun antiinflamatuvar, antiaterosklerotik ve ROS'ni azaltıcı etkisi olduğu ve bunları da olasılıkla hipoglisemik etkileri aracılı oluşturduğu bildirilmektedir (20, 273). Ayrıca diyabetik sıçanlarda korpus kavernosumda ve damarlarda insülin tedavisinin anlamlı olarak lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (20). İnsülin tedavisinin diyabetik sıçanlarda endotelial hücrelerde NO yapımını arttırarak ACh'in indüklediği gevşeme yanıtını düzelttiği bildirilmiştir (20, 274). Kronik insülin tedavisinin STZ ile indüklenen diyabetik hayvan modellerinde mezenterik arterlerde ve aort ringlerinde endoteliuma bağlı relaksasyonu önlediği (20, 275, 276) ve sıçan aort dokularında agonist ile indüklenen kasılma yanıtlarındaki azalmayı önlediği gösterilmiştir (277). Paskaloglu ve ark. (2004), diyabetik aort ve korpus kavernozum dokularında yaptıkları çalışmada insülin

tedavisinin fenilefrinin yaptığı kasıcı etkilerdeki azalmayı tamamen düzelttiği ancak ACh'e verilen gevşeme yanıtlarındaki bozukluğu düzeltemediğini bildirmişlerdir (278).

İnsülin tedavisinin gerek diyabetik hastalarda gerekse diyabetik hayvan modellerinde diyabete bağlı mesane disfonksiyonu üzerindeki etkilerine dair çok az çalışmaya rastlanmıştır. Diyabetik hastalarda mesane disfonksiyonunun tedavisi için önce metabolik kontrol sonra diğer tedaviler önerilmektedir (159). İnsülin tedavisi verilen diyabetik sıçanlarda, mesanede diyabete bağlı olarak gelişen muskarinik reseptör dansitesindeki artışın, insülin tedavisi ile önlediği veya düzeltildiği bildirilmiştir (248, 279). Diyabetik farelerde, uzun süreli insülin tedavisinin mesane fonksiyonlarındaki değişikliklerin çoğunu (mesane kapasitesi ve kompliyansında artma, idrar volümü ve rezidü volümde artma gibi) geriye döndürdüğü bildirilmiştir (19). Bizim çalışmamızda ise insülin tedavisi uygulanan diyabet grubunun KCl ve CCh yanıtlarının, diyabet grubu ile benzer olduğu ve kontrol grubundan daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu sonuç, insülinin muskarinik reseptör dansitesindeki artışı önlediğini bildiren çalışmalar ile çelişkili gözükse de Kobayashi ve ark. (1999), diyabetik aort kasılmalarında KCl kasılma yanıtlarındaki değişikliğin düşük doz insülin tedavisi (10 U/kg) ile değişmediği, ancak yüksek doz insülin (50 U/kg) ile geriye döndürüldüğünü bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda uygulanan insülin dozunun (6 U/kg) düşük olması, kasılma yanıtları üzerinde düzeltici ya da iyileştirici etki görülmemesinin nedeni olabilir (277).

Rho kinaz aktivasyonunun Zucker obez sıçanların aortalarında, insüline dirençli sıçanların renal korteksinde ve STZ ile indüklenen diyabetik sıçanların kalp, mesane ve penil dokularında artmış olduğu gösterilmiştir (280). ROCK izoformlarının insülin sinyal yolağına ve glukoz metabolizmasına katıldığı, hücre hatlarında gösterilmiştir (281). İnsülin direnci olan tip II diyabetli obez hastalarda ROCK1 aktivitesinin azaldığı, insülin tedavisinin iskelet kaslarında ROCK1 aktivitesini arttırdığı ve ROCK1'i hedefleyen tedavi modalitelerinin obezite ve tip II diyabet tedavisinde yeni yaklaşımlar olabileceği bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada insülin tedavisinin diğer dokularda ROCK aktivasyonunu etkileyip etkilemediği çalışılmamıştır (282). Diyabetik sıçanlarda oral Rho kinaz inhibitörünün kronik olarak uygulanmasıyla korpus kavernosumda apoptozisin baskılandığı ve erektile disfonksiyonun düzeltildiği ve bu etkinin insülin tedavisi ile kıyaslandığında daha fazla olduğu bildirilmiştir (283). Diyabete bağlı mesane disfonksiyonunda insülin tedavisinin RhoA/Rho kinaz yolağını

nasıl etkilediğine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda insülin tedavisi verilen diyabet grubunda Rho kinaz inhibitörü Y-27632, CCh kasılma yanıtlarını tüm konsantrasyonlarda anlamlı ve doza bağımlı olarak inhibe etti. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda CCh Emax ve pD_2 değerlerinde gözlenen düşme, diyabet grubu ile karşılaştırıldığında aralarında fark olmadığı gözlemlendi. Aynı şekilde insülin tedavisi verilen diyabet grubunda, Rac1 inhibitörü varlığında CCh kasılma yanıtlarında, CCh Emax ve pD_2 değerlerinde elde edilen değişiklikler ile tedavi verilmeyen diyabetik gruptaki değişiklikler benzerdi ve insülin tedavisi düzeltici ya da önleyici bir etki göstermedi. Bu sonuçlar da insülin tedavisinin diyabete bağlı mesane disfonksiyonunda Rho/Rho kinaz yolağı ve/veya Rac1 yolağında gözlenen artmış aktivite üzerine etkisi olmadığını düşündürdü.

Mesane ürotelyumunun sadece pasif bariyer görevi görmediği, ürotelyumda çeşitli reseptörlerin eksprese olduğu ve nörotransmitter salınımında görev aldığı; bu etkileriyle detrusor kasın kasılmasında aktif rol oynadığı bilinmektedir. Diyabette mesanede sadece düz kas kasılmasında değil ürotelyal fonksiyonlarda da anormallikler olduğu bulunmuş ve ürotelyum disfonksiyonu tanımlanmıştır. Ürotelyumdan salınan faktörlerden biri de prostaglandinlerdir (4). Prostaglandinlerin izole detrusor kasta kasılmaya neden olduğu bilinmektedir (284, 285). Fizyolojik koşullarda salınan PG'lerin ($PGF_{2\alpha}$ ve PGE_2) hem düz kas üzerine direkt etkileri hem de duyuşal sinirler üzerindeki lokal etkileriyle mesane fonksiyonlarını etkiledikleri (22) ancak diyabet gibi patolojik koşullarda sentezlerinin artmasına bağlı olarak mesanede hiperaktiviteye ve düz kas kasılmasında spazma neden oldukları bildirilmektedir (23, 24). Ayrıca aşırı aktif mesane tedavisinde prostaglandin sentezini inhibe eden NSAİİ'lerin bu kasılmaları inhibe edici etkisinden faydaniılmaktadır (4). İndometazin, ketoprofen ve aspirin gibi antiinflamatuar ilaçların normal ve sistitli mesane üzerine etkileri araştırılmıştır (286). Kullanılan bu NSAİİ'lerin PG düzeyindeki artışı inhibe ettiği ve primer enürezisin tedavisinde plasebodan daha etkili olduğu gösterilmiştir (287). Batislam ve ark. (1995), primer nokturnal enürezisli 78 hastada yaptıkları bir çalışmada diklofenak sodyumun tedavide etkili olduğunu bildirmişlerdir (288). Bugün için NSAİİ'lerin detrusor kas kasılmasındaki etkileri tam olarak bilinmemekle birlikte muskarinik reseptörlerinin fosfolipaz A_2 'yi aktive ederek COX aktivasyonuna neden olabileceği ve NSAİİ'lerin bunu önleyerek etki gösterdikleri düşünülmektedir (284, 285).

Diyabette mesane epitelinde PG üretimindeki artışın, diyabetle ilişkili olarak inflamasyonun artmasına veya duysal ve motor sinir uçlarını etkileyen diyabetik nöropatiye karşı kompanse edici mekanizmaların gelişmesine bağlı olabileceği bildirilmektedir (166). Diyabette veya diyabetik olmayan hayvan modellerinde, NSAİİ'lerin detrusor kası inhibe etmedeki rollerinin tartışmalı olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar indometazinin detrusor düz kas kasılmalarını etkilemediğini bildirirken (93, 96, 289); bazı araştırmacılar da kas kasılmalarını inhibe ettiğini bildirmektedir (23, 166). Çalışmamızda indometazinin detrusor düz kas kasılmalarını inhibe ettiğini bildiren çalışmalar ile uyumlu olarak, tüm gruplarda CCh kasılma yanıtlarını anlamlı olarak inhibe ettiğini saptadık. Diyabetik grupta indometazine bağlı inhibisyonun kontrol grubundan daha fazla olması, diyabette PG'lerin daha fazla salındığı ya da etki gösterdiğini düşündürmektedir. Bu bulgumuz da Pinna ve arkadaşlarının (1992), diyabet gibi patolojik durumlarda PG'lerin üretim ve salınımının arttığı yönündeki bulguları ile desteklenmektedir (23).

PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂ ve TxA₂ gibi prostanooidlerin detrusor düz kas hücrelerinde membranda yerleşmiş olan kendilerine özgü DP, EP, FP, IP ve TP reseptörleri aracılığıyla kasılma yanıtı oluşturdıkları bilinmektedir. EP reseptörlerinin, EP1, EP2, EP3 ve EP4 diye adlandırılan 4 alt tipi bulunmaktadır (4, 26, 290). Bu reseptörlerden EP3'ün Gi proteini ile kenetli olduğu ve aynı zamanda küçük G proteini RhoA aracılığıyla cAMP oluşumunu inhibe ettiği bildirilmektedir (26). PGE₂'nin indüklediği aşırı aktif mesane ve mesane çıkım obstrüksiyonlarında, EP1 reseptörlerinin rolü olduğu pek çok çalışmada bildirilmiş (27, 28) olmakla birlikte, yakın zamanda EP3 geni silinmiş farelerde yapılan bir çalışmada EP3 reseptörlerinin mesanede artmış aktivite bozukluklarındaki fonksiyonel rolleri gösterilmiştir (291). Ayrıca diğer düz kaslarda da (aorta ve hava yolları) PGE₂ ve PGF_{2α} aracılı kasılma yanıtlarının büyük oranda Rho kinaz aktivitesine bağlı olduğu bildirilmektedir (292-294).

Omurilik hasarında ibuprofen gibi NSAİİ'lerin, Rho kinaz aktivitesini baskılayarak tedavi edici etki gösterdiği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (29-30). Ayrıca Rho kinaz inhibitörü fasudil'in sıçanlarda omurilik hasarının tedavisinde etkili olduğu da bulunmuştur (31). Aşırı aktif mesane tedavisinde PG sentezini inhibe eden NSAİİ'lerin kasılmaları inhibe edici etkisinden faydanılmakla birlikte, etkileri tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca küçük GTPaz'larla ilişkisi başka patolojilerde araştırılmış olmasına rağmen, diyabetik mesanede

çalışılmadığı görülmüştür. Biz de çalışmamızda indometazinin mesane detrusor düz kas kasılmaları üzerindeki etkisinin, küçük GTPaz inhibitörleri ile ilişkisini incelemek istedik. Kontrol grubunda indometazinin, Rho kinaz inhibitörünün 0.1 μ M konsantrasyonundaki etkisini arttırdığını saptadık. Diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında ise indometazinin, Rho kinaz inhibitörünün etkisini değiştirmedğini gözledik. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, indometazinin Rho kinaz aktivitesini inhibe edici etki gösterse bile diyabette artmış olan Rho kinaz aktivitesinin, ortamda var olan Rho kinaz inhibitörü ile baskılanmış olması nedeniyle indometazinin daha fazla etki göstermesini önlediği düşünülebilir. Diğer küçük GTPaz inhibitörü olan NSC 23766 varlığında yaptığımız deneylerde; indometazinin, Rac1 inhibitörünün 1 μ M konsantrasyonundaki etkisini diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında; 10 μ M konsantrasyonundaki etkisini ise diyabetik grupta istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte arttırırken, düşük dozda bu etkisinin olmadığını gözledik. Kontrol ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında ise indometazinin, Rac1 inhibitörünün etkisini değiştirmedğini saptadık. Orta ve yüksek dozlarda Rac1 inhibitörü varlığında; diyabetik grupta istatistiksel anlamlılık olmasa da indometazinin Rac1 inhibitörünün etkisini arttırması, bu dozlardaki Rac1 inhibitörünün yeterince kasılmaları inhibe etmemesi nedeniyle indometazinin, Rac1 aktivitesini azaltarak değil de daha çok Rho kinazı suprese edici etkisi nedeniyle kasılmaları daha fazla inhibe ettiğini düşündürmektedir.

İndometazin ve küçük GTPaz inhibitörlerinin üçlü kombinasyonlarının CCh kasılma yanıtlarında yaptığı inhibisyonların, üç deney grubunda da tek başına indometazin veya Rho kinaz inhibitörü + Rac1 inhibitörü kombinasyonu (0.1 ve 1 μ M) varlığında elde edilen inhibisyonlardan farklı olmadığı gözlemlendi. Küçük GTPaz inhibitörlerinin 10 μ M'lık kombinasyonu ile indometazinin üçlü kombinasyonun yaptığı inhibitör etkinin ise diyabet grubunda tek başına indometazinin yaptığı inhibisyonu arttırdığı, ancak Rho kinaz inhibitörü + Rac1 inhibitörü kombinasyonu varlığında elde edilen inhibisyonu arttırmadığı gözlemlendi. Üçlü kombinasyonlarda kontrol ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında ise değişiklik saptanmadı. Bu sonuçlarda diyabette indometazinin, küçük GTPaz inhibitörlerinin etkisinin arttırmadığını ama yüksek konsantrasyonlardaki küçük GTPaz inhibitörlerinin indometazinin etkisini arttırdığını göstermektedir. Bu da diyabette detrusor düz kas disfonksiyonunda küçük GTPazların, prostaglandinlerden daha fazla rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Pinna ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları çalışmada mesane duvarının total kalınlığının diyabet grubunda arttığı bildirilmiştir (166). Liu ve ark. (2005) enine kesitlerde diyabetik grupta mesane lümeninin artış gösterdiğini bildirmiştir. Mesane duvarını oluşturan tunika mukoza ve tunika muskularis tabakalarının total kalınlığı kontrol grubuna göre yaklaşık 1.5 kat arttığı bildirilmiştir (116). Çalışmamızda histomorfometrik ölçümlerde diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarının mesane duvar kalınlıklarının kontrol grubuna sırasıyla 1.5 ve 1.4 kat artmış olduğunu ve daha önce yapılmış çalışmalar ile uyumlu olduğunu saptadık. Diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarının mesane duvar kalınlıkları arasında fark saptamadık. Diyabetik hayvanların mesane dokularında mukoza tabakasındaki lamina propriada hiperemi ve ödem gözleendiği, düz kas fibrillerinin ise düzensiz görünümde olduğu bildirilmiştir (295). Bizim çalışmamızda mesane dokusunu oluşturan epitel ve lamina propria tabakasında gruplar arasında farklılık gözlenmezken, tunika muskularis tabakasında kas fibrillerinin diyabet grubunda, kontrol grubuna göre düzensiz olduğu gözleendi. İnsülin tedavisi verilen diyabet grubunda tunika muskularis tabakası, diyabet grubu ile benzer özellikteydi.

Diyabetik mesanede RhoA ekspresyonunu inceleyen araştırmaya rastlanmamıştır. RhoA'nın efektör molekülü olan Rho kinazın ekspresyonunun ise hem diyabetik hem de diyabetik olmayan hayvanlarda incelendiği görülmüştür. ROCK1 ve ROCK2'nin diyabetik olmayan sıçanların mesane düz kasında yüksek oranda eksprese olduğu bildirilmektedir (186). Chang ve ark. (2006) ise diyabetik tavşan mesanesinde ROK β (ROCK1) ekspresyonunun kontrole göre artmış olduğunu ve Rho kinazın esas olarak düz kas hücrelerinde lokalize olduğunu bildirmişlerdir (17). İnsan mesane dokusunda küçük GTPaz'ların ekspresyonları ise ürotelyal hücreli karsinom (UCC) örneklerinde normal ürotelyuma göre artmış olduğu bulunmuş ve mesanede UCC gelişimi ve ilerlemesinde, RhoA, RhoB, RhoC, Rac1 ve Cdc42 ekspresyonundaki değişikliklerin önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir (240). Bizim çalışmamızda ise immunhistokimyasal yöntem ile RhoA ekspresyonunun, diyabet grubunda epitel tabakasında artış gösterdiği ancak bu artışın anlamlı olmadığı saptandı. Diyabet grubunda kas tabakasında RhoA ekspresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik olmadığı gözleendi. Ancak diyabetik mesanede RhoA ekspresyonunda artış olmamasına rağmen, fonksiyonel organ banyosu çalışmalarımızda Rho kinaz inhibitörü Y-27632 varlığında CCh kasılma yanıtlarında kontrole göre daha fazla inhibisyon gözlememiz, bu

durumun RhoA aktivitesinin ve dolayısıyla efektör molekülü olan Rho kinazın aktivasyonunun artmış olmasına bağlı gibi gözükmektedir. Bu da diyabetik mesanede Rho kinaz ekspresyonunda artış olduğunu bildiren çalışmalar ile uyumludur.

Diyabetik mesanede Rac1 ekspresyonunu inceleyen araştırma da bulunmamaktadır. STZ ile indüklenen diyabetik fare modelinde immunhistokimyasal incelemede, Rac1'in efektör molekülü olan Pak1 ekspresyonlarının diyabette sadece detrusor düz kasta kontrole göre anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (18). Çalışmamızda immunhistokimyasal boyama ile Rac1 ekspresyonları değerlendirildiğinde, diyabet ve insülin tedavisi verilen diyabet gruplarında kontrol grubuna göre tüm tabakalarda; diyabet grubunda insülin tedavisi verilen diyabet grubuna göre lamina propria ve tunika muskularis tabakalarında Rac1 ekspresyonunda anlamlı artış olduğunu saptadık. Bu sonuç, organ banyosunda Rac1 inhibitörü NSC 23766 varlığında CCh kasılma yanıtlarında görülen inhibisyon etkisi ile birlikte değerlendirildiğinde, diyabette Rac1'in ekspresyonunun ve aktivitesinin artmış olduğu ve bunun da diyabete bağlı mesane disfonksiyonunun gelişiminde rolü olabileceğini düşündürmektedir.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak diyabetik sıçan mesane detrusor düz kasında 1) KCl ve CCh gibi agonistlere verilen kasılma yanıtlarındaki değişiklikler 2) Bu değişikliklerin küçük GTPaz'lar RhoA 3) ve Rac1 ile ilişkisi 4) Küçük GTPaz'lar RhoA ve Rac1'in mesane düz kas kasılmalarındaki etkileri ve bu etkilerin aynı yönde veya zıt yönde olup olmadığı 5) İndometazin gibi NSAİİ'lerin detrusor kas kasılma yanıtlarına etkisi 6) İndometazinin RhoA ve 7) Rac1 ile ilişkisi 8) İndometazin, Rhokinaz inhibitörü (Y-27632) ve Rac1 inhibitörü (NSC 23766) üçlü kombinasyonlarının CCh kasılma yanıtlarına etkisi 9) İnsülin tedavisinin CCh kasılma yanıtları üzerine iyileştirici etkisi olup olmadığı fonksiyonel olarak organ banyosu yöntemiyle 10) Diyabete bağlı histolojik değişiklikleri hematoksilen eosin boyamayla 11) RhoA ve 12) Rac1 ekspresyonlarındaki değişiklikleri de immunhistokimyasal boyama ile incelediğimiz bu çalışmada;

1) Diyabet grubunda KCl ve CCh gibi agonistlere kasılma yanıtlarının artmış olduğunu 2) Rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin CCh kasılma yanıtlarını, diyabetik grupta daha fazla olmak üzere tüm gruplarda doza bağımlı olarak inhibe ettiğini 3) Diyabet grubunda Rac1 inhibitörü NSC 23766'nın sadece düşük konsantrasyonunun anlamlı olacak şekilde CCh kasılma yanıtlarını kontrole göre daha fazla inhibe ettiğini 4) Diyabetik grupta küçük GTPaz inhibitörlerinin kombine (Y-27632 + NSC 23766) uygulanması durumunda oluşan inhibitör etkinin, Rho kinaz inhibitörünün (Y-27632) tek başına yaptığı etkiye benzer olduğu ve RhoA ve Rac1'in birbirlerinin etkisini zıt yönde değiştirmediğini 5) Diyabetik grupta indometazine bağlı inhibisyonun kontrol grubundan daha fazla olduğunu ve bunun da diyabette PG'lerin daha fazla salınması ya da etki göstermesine bağlı olabileceğini 6) Diyabette indometazinin, Rho kinazın etkisini değiştirmediği ve bunun olasılıkla kendisinin de Rho kinaz aktivitesini inhibe etmesine bağlı olduğunu 7) Diyabetik grupta indometazinin, orta ve yüksek dozlardaki Rac1 inhibitörünün etkisini istatistiksel anlamlılık olmasa da arttırdığı 8) Diyabetik grupta indometazinin küçük GTPaz inhibitörleri (10 µM) ile üçlü kombinasyonlarının CCh kasılma yanıtlarında yaptığı inhibisyonun indometazinin tek başına yaptığı inhibisyonu arttırdığı ancak küçük GTPaz inhibitörlerinin etkisini değiştirmediği 9) İnsülin tedavisinin ise CCh kasılma yanıtları ve küçük GTPaz inhibitörleri ve indometazin varlığındaki CCh kasılma yanıtları üzerine etkisinin olmadığı ve bunun olasılıkla insülinin düşük dozda uygulanmış olmasına bağlı olabileceği 10) Diyabetik mesanede mesane duvar kalınlığının kontrole göre

1.5 kat artmış olduğunu 11) RhoA ekspresyonlarının diyabetik mesanede kontrole göre artış göstermediğini 12) Rac1 ekspresyonlarının ise diyabetik mesane dokusunun tüm tabakalarında belirgin artış gösterdiğini bulduk.

Sonuç olarak;

Diyabette CCh yanıtlarının ve küçük GTPaz inhibitörlerinin CCh kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisinin artmış olması, kalsiyum sensitizasyonu ve küçük GTPaz'ların diyabette aktivitelerinin artmış olması ile açıklanabilir. Diyabette PG'lerin mesane kasılmalarını arttırıcı etkisi göz önüne alındığında indometazinin diyabetik mesanede etkili olabileceği ancak etkisinin küçük GTPaz inhibitörleri ile kıyaslandığında daha düşük olduğu görülmektedir. İnsülin tedavisinin diyabete bağlı diğer komplikasyonlar üzerinde tedavi edici ya da önleyici etkisi bildirilmiş olmasına rağmen diyabete bağlı mesane disfonksiyonunda in vitro olarak çok da etkili olmadığı görülmektedir. Dolayısıyla bu komplikasyonun tedavisinde ya da önlenmesinde yeni yaklaşımlara ihtiyaç olduğu ve küçük GTPaz inhibitörlerinin bu konuda umut vadettiğini düşünmekteyiz.

9. KAYNAKLAR

1. Daneshgari F, Moore C. Diabetic uropathy. *Semin Nephrol.* 2006;26:182.
2. Gomez CS, Kanagarajah P, Gousse AE. Bladder dysfunction in patients with diabetes. *Curr Urol Rep.* 2011;12(6):419-26.
3. Daneshgari F, Liu G, Birder L ve ark. Diabetic bladder dysfunction: current translational knowledge. *J Urol.* 2009;182(6 Suppl):S18-26.
4. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2004;84(3):935-86.
5. Schneider T, Fetscher C, Krege S ve ark. Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of human urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:1148-1153.
6. Morgan JP, Morgan KG. Stimulus-specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein. *J Physiol.* 1984;351:155-167.
7. Himpens B, Matthijs G, Somlyo AV ve ark. Cytoplasmic free calcium, myosin light chain phosphorylation, and force in phasic and tonic smooth muscle. *J Gen Physiol.* 1988;92:713-729.
8. Somlyo AP, Kitazawa T, Himpens B ve ark. Modulation of Ca²⁺-sensitivity and of the time course of contraction in smooth muscle: a major role of protein phosphatases? *Adv Protein Phosphatases.* 1989;5:181-195.
9. Kitazawa T, Masuo M, Somlyo AP. G Protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:9307-9310.
10. Hirano K. Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci.* 2007;104:109-115.
11. Zhang X, DiSanto ME. Rho-kinase, a common final path of various contractile bladder and ureter stimuli. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(202):543-68.
12. Saito M, Nakamura I, Miyagawa I. Autoradiographic localization of muscarinic receptors in diabetic rat bladder. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi.* 1997;88(10):858-67.
13. Waring JV, Wendt IR. Effects of streptozotocin-induced diabetes mellitus on intracellular calcium and contraction of longitudinal smooth muscle from rat urinary bladder. *J Urol.* 2000;163(1):323-30.

14. Tapon N, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9(1):86-92.
15. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992;70(3):389-99.
16. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(1):42-7.
17. Chang S, Hypolite JA, DiSanto ME ve ark. Increased basal phosphorylation of detrusor smooth muscle myosin in alloxan-induced diabetic rabbit is mediated by upregulation of Rho-kinase beta and CPI-17. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(3):F650-6.
18. Poladia DP, Bauer JA. Oxidant driven signaling pathways during diabetes: role of Rac1 and modulation of protein kinase activity in mouse urinary bladder. *Biochimie.* 2004;86(8):543-51.
19. Daneshgari F, Huang X, Liu G ve ark. Temporal differences in bladder dysfunction caused by diabetes, diuresis, and treated diabetes in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290:R1728.
20. Elçioğlu HK, Kabasakal L, Özkan N ve ark. A study comparing the effects of rosiglitazone and/or insulin treatments on streptozotocin induced diabetic (type I diabetes) rat aorta and cavernous tissues. *Eur J Pharmacol.* 2011;660(2-3):476-84.
21. de Groat WC. The urothelium in overactive bladder: passive bystander or active participant? *Urology.* 2004;64(6 Suppl 1):7-11.
22. Maggi CA. Prostanoids as local modulators of reflex micturition. *Pharmacol Res.* 1992;25(1):13-20.
23. Pinna C, Caratozzolo O, Puglisi L. A possible role for urinary bladder epithelium in bradykinin-induced contraction in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 1992;214(2-3):143-8.
24. Hoyle CH. Non-adrenergic, non-cholinergic control of the urinary bladder. *World J Urol.* 1994;12(5):233-44.
25. Andersson KE. Drug therapy for urinary incontinence. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000;14(2):291-313.
26. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA ve ark. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:661-90.
27. Schröder A, Newgreen D, Andersson KE. Detrusor responses to prostaglandin E2 and bladder outlet obstruction in wild-type and Ep1 receptor knockout mice. *J Urol.* 2004;172(3):1166-70.

28. Lee T, Hedlund P, Newgreen D ve ark. Urodynamic effects of a novel EP(1) receptor antagonist in normal rats and rats with bladder outlet obstruction. *J Urol.* 2007;177(4):1562-7.
29. Fu Q, Hue J, Li S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs promote axon regeneration via RhoA inhibition. *J Neurosci.* 2007;27(15):4154-64.
30. Wang X, Budel S, Baughman K ve ark. Ibuprofen enhances recovery from spinal cord injury by limiting tissue loss and stimulating axonal growth. *J Neurotrauma.* 2009;26(1):81-95.
31. Chiba Y, Kuroda S, Shichinohe H ve ark. Synergistic effects of bone marrow stromal cells and a Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil on axon regeneration in rat spinal cord injury. *Neuropathology.* 2010;30(3):241-50.
32. Ross MH, Pawlina W. *Histology, A Text and Atlas.* China: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins; 2011:738.
33. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş (Prof. Dr. Ramazan Yılmaz, Çeviri).* Ankara: Palme Yayıncılık; 2006:386.
34. SlideShare. <http://www.slideshare.net/1957Hamlet/chapter-20-urinary-system-8713118>
Erişim: 15 Nisan 2012
35. Peters SL, Schmidt M, Michel MC. Rho kinase: a target for treating urinary bladder dysfunction? *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(9):492-7.
36. Sigala S, Mirabella G, Peroni A ve ark. Differential gene expression of cholinergic muscarinic receptor subtypes in male and female normal human urinary bladder. *Urology.* 2002;60:719–725.
37. Tyagi S, Tyagi P, Van-le S ve ark. Qualitative and quantitative expression profile of muscarinic receptors in human urothelium and detrusor. *J Urol.* 2006;176:1673–1678.
38. Mansfield KJ, Liu L, Mitchelson FJ ve ark. Muscarinic receptor subtypes in human bladder detrusor and mucosa, studied by radioligand binding and quantitative competitive RT-PCR: changes in ageing. *Br J Pharmacol.* 2005;144:1089–1099.
39. Wang P, Luthin GR, Ruggieri MR. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;273 959–966.

40. Hegde SS, Choppin A, Bonhaus D ve ark. Functional role of M2 and M3 muscarinic receptors in the urinary bladder of rats in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1997;120:1409–1418.
41. Chess-Williams R, Chapple CR, Yamanishi T ve ark. The minor population of M3-receptors mediate contraction of human detrusor muscle in vitro. *J Auton Pharmacol.* 2001;21(5-6):243-8.
42. Fetscher C, Fleischman M, Schmidt M ve ark. M(3) muscarinic receptors mediate contraction of human urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 2002;136(5):641-3.
43. Matsui M, Motomura D, Fujikawa T ve ark. Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci.* 2002;22(24):10627-32.
44. Ehlert FJ, Griffin MT, Abe DM ve ark. The M2 muscarinic receptor mediates contraction through indirect mechanisms in mouse urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313(1):368-78.
45. Igawa Y, Zhang X, Nishizawa O ve ark. Cystometric findings in mice lacking muscarinic M2 or M3 receptors. *J Urol.* 2004;172(6 Pt 1):2460-4.
46. Hegde SS. Muscarinic receptors in the bladder: from basic research to therapeutics. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 2:S80-7.
47. Frazier EP, Peters SL, Braverman AS ve ark. Signal transduction underlying the control of urinary bladder smooth muscle tone by muscarinic receptors and beta-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008;377(4-6):449-62.
48. Yamanishi T, Chapple CR, Yasuda K ve ark. The role of M 2 -muscarinic receptors in mediating contraction of the pig urinary bladder in vitro. *Br J Pharmacol.* 2000;131:1482–1488.
49. Somogyi GT, Tanowitz M, de Groat WC. M1 muscarinic receptor-mediated facilitation of acetylcholine release in the rat urinary bladder. *J Physiol.* 1994;480 (Pt 1):81-9.
50. Tobin G, Sjögren C. In vivo and in vitro effects of muscarinic receptor antagonists on contractions and release of [3H]acetylcholine in the rabbit urinary bladder. *Eur J Pharmacol.* 1995;281(1):1-8.
51. D'Agostino G, Bolognesi ML, Lucchelli A ve ark. Prejunctional muscarinic inhibitory control of acetylcholine release in the human isolated detrusor: involvement of the M4 receptor subtype. *Br J Pharmacol.* 2000;129(3):493-500.

52. Jeremy JY, Mikhailidis DP, Dandona P. The rat urinary bladder produces prostacyclin as well as other prostaglandins. *Prostaglandins Leukot Med.* 1984;16(2):235-48.
53. Fovaeus M, Fujiwara M, Högestätt ED ve ark. A non-nitroergic smooth muscle relaxant factor released from rat urinary bladder by muscarinic receptor stimulation. *J Urol.* 1999;161(2):649-53.
54. Hawthorn MH, Chapple CR, Cock M ve ark. Urothelium-derived inhibitory factor(s) influences on detrusor muscle contractility in vitro. *Br J Pharmacol.* 2000;129(3):416-9.
55. Elneil S, Skepper JN, Kidd EJ ve ark. Distribution of P2X1 and P2X3 receptors in the rat and human urinary bladder. *Pharmacology.* 2001;63:120–128.
56. Michel MC. β -Adrenergic Receptor Subtypes in the Urinary Tract. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(202):307-18.
57. Frazier EP, Peters SLM, Braverman AS ve ark. Signal transduction underlying control of urinary bladder smooth muscle tone by muscarinic receptors and β -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2008;377:449–462.
58. Takemoto J, Masumiya H, Nunoki K ve ark. Potentiation of potassium currents by β -adrenoceptor agonists in human urinary bladder smooth muscle cells: a possible electrical mechanism of relaxation. *Pharmacology.* 2008;81:251–258.
59. Brown SM, Bentcheva-Petkova LM ve ark. β -Adrenergic relaxation of mouse urinary bladder smooth muscle in the absence of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} -channel. *Am J Physiol.* 2008;295:F1149–F1157.
60. Hristov KL, Cui X, Brown SM ve ark. Stimulation of β_3 -adrenoceptor relaxes rat urinary bladder smooth muscle via activation of the large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Am J Physiol.* 2008;295:C1344–C1353.
61. Drake MJ, Mills IW, Gillespie JI. Model of peripheral autonomous modules and a myovesical plexus in normal and overactive bladder function. *Lancet.* 2001;358(9279):401-3.
62. Dixon J and Gosling JA. Ultrastructure of smooth muscle cells in the urinary system. In: *Ultrastructure of Smooth Muscle*, edited by Motta PM. London: Kluwer Academic, 1990, p. 153–169.
63. Bozler E. Action potentials and conduction of excitation in muscle. *Biol Symp.* 1941;3:95-109.

64. Brink PR. Gap junctions in vascular smooth muscle. *Acta Physiol Scand*. 1998;164(4):349-56.
65. Somlyo AP, Somlyo AV. Vascular smooth muscle. I. Normal structure, pathology, biochemistry, and biophysics. *Pharmacol Rev*. 1968;20:197–272.
66. Horiuti K, Somlyo AV, Goldman YE ve ark. Kinetics of contraction initiated by flash photolysis of caged adenosine triphosphate in tonic and phasic smooth muscles. *J Gen Physiol*. 1989;94(4):769-81.
67. Bond M, Somlyo AV. Dense bodies and actin polarity in vertebrate smooth muscle. *J Cell Biol*. 1982;95(2 Pt 1):403-13.
68. Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1496(1):3-22.
69. Adelstein RS, Sellers JR. Myosin structure and function. In: *Biochemistry of Smooth Muscle*, edited by Bárány M. New York: Academic, 1996, p. 3–19.
70. Arner A, Malmqvist U. Cross-bridge cycling in smooth muscle: a short review. *Acta Physiol Scand*. 1998;164:363–372.
71. Itoh T, Kuriyama H, Suzuki H. Excitation-contraction coupling in smooth muscle cells of the guinea-pig mesenteric artery. *J Physiol*. 1981;321:513-535.
72. Suematsu E, Hirata M, Sasaguri T ve ark. Roles of Ca²⁺ on the inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced release of Ca²⁺ from saponin-permeabilized single cells of the porcine coronary artery. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1985;82:645-649.
73. Endo M, Iino M, Kobayashi T ve ark. Control of calcium release in smooth muscle cells. *Prog Clin Biol Res*. 1990;327:193-204.
74. Adelstein RS, Eisenberg E. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Annu Rev Biochem*. 1980;49:921-956.
75. Okamoto Y, Sekine T. Light chain phosphorylation alters the N terminal structure of gizzard myosin heavy chain in an ATP dependent manner. *J Biochem*. 1981;89:697-700.
76. Chacko S. Effects of phosphorylation, calcium ion, and tropomyosin on actin-activated adenosine 50-triphosphatase activity of mammalian smooth muscle myosin. *Biochemistry*. 1981;20:702-707.
77. Khalil R, Lodge N, Saida K ve ark. Mechanism of calcium activation in vascular smooth muscle. *J Hypertens Suppl*. 1987;5:S5-15.

78. Litten RZ, Suba EA, Roth BL. Effects of a phorbol ester on rat aortic contraction and calcium influx in the presence and absence of BAY k 8644. *Eur J Pharmacol.* 1987;144:185–191.
79. Christ G, Wingard C. Calcium sensitization as a pharmacological target in vascular smoothmuscle regulation. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005;6:920-933.
80. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K ve ark. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 KDa ser/thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* 1996;15:1885–1893.
81. Leung T, Manser E, Tan L ve ark. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem.* 1995;270:29051-29054.
82. Amano M, Ito M, Kimura K ve ark. Phosphorylation and activation of myosin by rho-associated kinase (rho-kinase). *J Biol Chem.* 1996;271:20246–20249.
83. Birder LA, Kanai AJ, Cruz F ve ark. Is the urothelium intelligent? *Neurourol Urodyn.* 2010;29(4):598-602.
84. Birder LA, Nakamura Y, Kiss S ve ark. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci* 2002;5:856–60.
85. Chess-Williams R. Muscarinic receptors of the urinary bladder: Detrusor, urothelial and prejunctional. *Autonon Autonoid Pharmacol* 2002;22:133–45.
86. Burton TJ, Cooper DM, Dunning-Davies B ve ark. Aldosterone stimulates active Na⁺ transport in rabbit urinary bladder by both genomic and non-genomic processes. *Eur J Pharmacol* 2005;510:181–6.
87. Beckel JM, KanaiAJ, Lee SJ ve ark. Expression of functional nicotinic acetylcholine receptors in rat urinary bladder epithelial cells. *Am J Physiol* 2006;290:F103–10.
88. YuW, Zarharia LC, Jackson EK ve ark. Adenosine receptor expression and function in bladder uroepithelium. *Am J Physiol* 2006;291:C254–65.
89. Sui GP, Wu C, Fry CH. Characterization of the purinergic receptor subtype on guinea-pig suburothelial myofibroblasts. *BJU Int* 2006;97:1327–31.
90. Chopra B, Gever J, Barrick SR ve ark. Expression and function of rat urothelial P2Y receptors. *Am J Physiol* 2008;294:F821–9.

91. Saban MR, Backer J, Backer MV ve ark. VEGF receptors and neuropilins are expressed in the urothelial and neuronal cells in normal mouse urinary bladder and are upregulated in inflammation. *Am J Physiol* 2008;295:F60–72.
92. Birder LA, Ruggieri M, Takeda M ve ark. How does the urothelium affect bladder function in health and disease?: ICI-RS 2011. *Neurourol Urodyn.* 2012;31(3):293-299.
93. Koşan M, Hafez G, Oztürk B ve ark. Effect of urothelium on bladder contractility in diabetic rats. *Int J Urol.* 2005;12(7):677-82.
94. Santoso AG, Sonarno IA, Arsad NA ve ark. The role of the urothelium and ATP in mediating detrusor smooth muscle contractility. *Urology.* 2010;76(5):1267.e7-12.
95. Saban R, Keith IM, Nielsen KT ve ark. In vitro effects of bladder mucosa and an enkephalinase inhibitor on tachykinin induced contractility of the dog bladder. *J Urol.* 1992;147(3):750-5.
96. Chaiyaprasithi B, Mang CF, Kilbinger H ve ark. Inhibition of human detrusor contraction by a urothelium derived factor. *J Urol.* 2003;170(5):1897-900.
97. Braverman AS, Lebed B, Linder M ve ark. M₂ mediated contractions of human bladder from organ donors is associated with an increase in urothelial muscarinic receptors. *Neurourol Urodyn.* 2007;26(1):63-70.
98. Centers for Disease Control and Prevention. 2011. Atlanta, G.: National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2011.
99. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15(7):539-53.
100. Buse JB, Polonsky KS, Burant JF. Tip 2 Diabetes Mellitus. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS (Eds.). *Williams Textbook of Endocrinology.* 10th ed. 2003:1427-1484.
101. Daneshgari F, Leiter EH, Liu G ve ark. Animal models of diabetic uropathy. *J Urol.* 2009;182:S8.
102. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 2005;22:359-370.
103. Mordes JP, Desemone J, Rossini AA. The BB rat. *Diabetes Metab Rev.* 1987;3:725.

104. Shinohara M, Masuyama T, Shoda T ve ark. A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications. *Int J Exp Diabetes Res.* 2000;1:89.
105. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med.* 1976;119:85.
106. Kaplan SA, Te AE, Blaivas JG. Urodynamic findings in patients with diabetic cystopathy. *J Urol.* 1995;153:342.
107. Golbidi S, Laher I. Bladder dysfunction in diabetes mellitus. *Front Pharmacol.* 2010;1:136.
108. Lifford KL, Curhan GC, Hu FB ve ark. Type 2 diabetes mellitus and risk of developing urinary incontinence. *J Am Geriatr Soc.* 2005;53:1851.
109. Lee WC, Wu HP, Tai TY ve ark. Effects of diabetes on female voiding behavior. *J Urol.* 2004;172:989.
110. Kebapci N, Yenilmez A, Efe B ve ark. Bladder dysfunction in type 2 diabetic patients. *Neurourol Urodyn.* 2007;26(6):814-9.
111. Andersen JT, Bradley WE. Abnormalities of bladder innervation in diabetes mellitus. *Urology.* 1976;7(4):442-8.
112. Faerman I, Glocher L, Celener D ve ark. Autonomic nervous system and diabetes. Histological and histochemical study of the autonomic nerve fibers of the urinary bladder in diabetic patients. *Diabetes.* 1973;22(4):225-37.
113. Frimodt-Møller C. Diabetic cystopathy. A review of the urodynamic and clinical features of neurogenic bladder dysfunction in diabetes mellitus. *Dan Med Bull.* 1978;25(2):49-60.
114. Yoshimura N, Chancellor MB, Andersson KE ve ark. Recent advances in understanding the biology of diabetes-associated bladder complications and novel therapy. *BJU Int.* 2005;95:733.
115. Liu G, Daneshgari F. Alterations in neurogenically mediated contractile responses of urinary bladder in rats with diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288:F1220.
116. Liu G, Daneshgari F. Temporal diabetes- and diuresis-induced remodeling of the urinary bladder in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291(3):R837-43.
117. Christ GJ, Hsieh Y, Zhao W ve ark. Effects of streptozotocin-induced diabetes on bladder and erectile (dys)function in the same rat in vivo. *BJU Int.* 2006;97(5):1076-82.

118. Daneshgari F, Liu G, Imrey PB. Time dependent changes in diabetic cystopathy in rats include compensated and decompensated bladder function. *J Urol.* 2006;176(1):380-6.
119. Saito M, Okada S, Kazuyama E ve ark. Pharmacological properties, functional alterations and gene expression of muscarinic receptors in young and old type 2 Goto-Kakizaki diabetic rat bladders. *J Urol.* 2008;180:2701.
120. Pontari MA, Braverman AS, Ruggieri MR Sr. The M2 muscarinic receptor mediates in vitro bladder contractions from patients with neurogenic bladder dysfunction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(5):R874-80.
121. Stevens LA, Chapple CR, Chess-Williams R. Human idiopathic and neurogenic overactive bladders and the role of M2 muscarinic receptors in contraction. *Eur Urol.* 2007;52(2):531-8.
122. Kanda M, Eto K, Tanabe N ve ark. Effects of ONO-2235, an aldose reductase inhibitor, on muscarinic receptors and contractile response of the urinary bladder in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Jpn J Pharmacol.* 1997;73(3):221-8.
123. Hernández M, García-Sacristán A, Orensanz LM. Muscarinic binding sites of the pig intravesical ureter. *J Auton Pharmacol.* 1995;15(5):351-9.
124. Tong, YC, Chin, WT, Cheng JT. Alterations in urinary bladder M2-muscarinic receptor protein and mRNA in 2-week streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci. Lett.* 1999;277:173–176.
125. Tong YC, Cheng JT, Hsu CT. Alterations of M(2)-muscarinic receptor protein and mRNA expression in the urothelium and muscle layer of the streptozotocin-induced diabetic rat urinary bladder. *Neurosci Lett.* 2006;406(3):216-21.
126. Cheng JT, Yu BC, Tong YC. Changes of M3-muscarinic receptor protein and mRNA expressions in the bladder urothelium and muscle layer of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett.* 2007;423(1):1-5.
127. Pak KJ, Ostrom RS, Matsui M ve ark. Impaired M3 and enhanced M2 muscarinic receptor contractile function in a streptozotocin model of mouse diabetic urinary bladder. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010;381(5):441-54.
128. Sun Y, Chai TC. Role of purinergic signaling in voiding dysfunction. *Curr Bladder Dysfunct Rep.* 2010;5:219.

129. Kubota Y, Nakahara T, Mitani A ve ark. Augmentation of rat urinary bladder relaxation mediated by beta1-adrenoceptors in experimental diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2003;467(1-3):191-5.
130. Poladia DP, Bauer JA. Early cell-specific changes in nitric oxide synthases, reactive nitrogen species formation, and ubiquitinylation during diabetes-related bladder remodeling. *Diabetes Metab Res Rev.* 2003;19:313.
131. Satriano J. Kidney growth, hypertrophy and the unifying mechanism of diabetic complications. *Amino Acids.* 2007;33:331–339.
132. Nobe K, Yamazaki T, Tsumita N ve ark. Glucose-dependent enhancement of diabetic bladder contraction is associated with a rho kinase-regulated protein kinase C pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;328(3):940-50.
133. Ismael HN, Mustafa S, Thulesius O. Effect of diabetes on cooling-induced detrusor muscle contraction: mediation via Rho-kinase activation. *Urology.* 2010;75(4):891-5.
134. Kizub IV, Pavlova OO, Johnson CD ve ark. Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 2010;159(8):1724-31.
135. Didion SP, Lynch CM, Baumbach GL ve ark. Impaired endothelium-dependent responses and enhanced influence of Rho-kinase in cerebral arterioles in type II diabetes. *Stroke.* 2005;36(2):342-7.
136. Xie Z, Gong MC, Su W ve ark. Role of calcium-independent phospholipase A2beta in high glucose-induced activation of RhoA, Rho kinase, and CPI-17 in cultured vascular smooth muscle cells and vascular smooth muscle hypercontractility in diabetic animals. *J Biol Chem.* 2010;285(12):8628-38.
137. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257–67.
138. Ruiz C, Alegria A, Barbera R ve ark. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:99-105.
139. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813–20.

140. Kuroki T, Isshiki K, King GL. Oxidative stress: the lead or supporting actor in the pathogenesis of diabetic complications. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8 Suppl 3):S216-20.
141. Ramasamy R, Oates PJ, Schaefer S. Aldose reductase inhibition protects diabetic and nondiabetic rat hearts from ischemic injury. *Diabetes.* 1997;46:292–300.
142. Jain SK. Superoxide dismutase overexpression and cellular oxidative damage in diabetes. A commentary on “Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress”. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:1187–90.
143. Kirschner-Hermanns R, Daneshgari F, Vahabi B ve ark. Does diabetes mellitus-induced bladder remodeling affect lower urinary tract function?: ICI-RS 2011. *Neurourol Urodyn.* 2012;31(3):359-64.
144. Santini SA, Marra G, Giardina B ve ark. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997;46:1853–8.
145. Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF ve ark. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: A mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9121–6.
146. McVary K. Lower urinary tract symptoms and sexual dysfunction: Epidemiology and pathophysiology. *BJU Int* 2006;97:23–8.
147. Moore CR, Wang R. Pathophysiology and treatment of diabetic erectile dysfunction. *Asian J Androl* 2006;8:675–84.
148. Beshay E, Carrier S. Oxidative stress plays a role in diabetes-induced bladder dysfunction in a rat model. *Urology.* 2004;64(5):1062-7.
149. Changolkar AK, Hypolite JA, Disanto M ve ark. Diabetes induced decrease in detrusor smooth muscle force is associated with oxidative stress and overactivity of aldose reductase. *J Urol.* 2005;173(1):309-13.
150. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405–12.
151. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615–25.

152. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: A possible mechanism for apoptosis with age. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R423–30.
153. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK ve ark. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J* 2002;16:607–9.
154. Fernyhough P, Huang TJ, Verkhratsky A. Mechanism of mitochondrial dysfunction in diabetic sensory neuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 2003;8(4):227-35.
155. Li WJ, Oh SJ. Diabetic cystopathy is associated with PARP/JNK/mitochondrial apoptotic pathway-mediated bladder apoptosis. *Neurourol Urodyn.* 2010;29(7):1332-7.
156. Kanika ND, Chang J, Tong Y ve ark. Oxidative stress status accompanying diabetic bladder cystopathy results in the activation of protein degradation pathways. *BJU Int.* 2011;107(10):1676-84.
157. Ustuner MC, Kabay S, Ozden H ve ark. The protective effects of vitamin E on urinary bladder apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Urology.* 2010;75(4):902-6.
158. Jiang YJ, Gong DX, Liu HB ve ark. Ability of alpha-lipoic acid to reverse the diabetic cystopathy in a rat model. *Acta Pharmacol Sin.* 2008;29(6):713-9.
159. Fedele D. Therapy Insight: sexual and bladder dysfunction associated with diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Urol.* 2005;2(6):282-90; quiz 309.
160. Lee WC, Wu HP, Tai TY ve ark. Investigation of urodynamic characteristics and bladder sensory function in the early stages of diabetic bladder dysfunction in women with type 2 diabetes. *J Urol.* 2009;181:198.
161. Sasaki K, Chancellor MB, Phelan MW ve ark. Diabetic cystopathy correlates with a long-term decrease in nerve growth factor levels in the bladder and lumbosacral dorsal root ganglia. *J Urol.* 2002;168:1259.
162. Hellweg R, Raivich G, Hartung HD ve ark. Axonal transport of endogenous nerve growth factor (NGF) and NGF receptor in experimental diabetic neuropathy. *Exp Neurol.* 1994;130:24.
163. Sasaki K, Chancellor MB, Goins WF ve ark. Gene therapy using replication-defective herpes simplex virus vectors expressing nerve growth factor in a rat model of diabetic cystopathy. *Diabetes.* 2004;53:2723.

164. Saito M, Kinoshita Y, Satoh I ve ark. Ability of cyclohexenonic long-chain fatty alcohol to reverse diabetes-induced cystopathy in the rat. *Eur Urol.* 2007;51:479.
165. Yamaguchi C, Sakakibara R, Uchiyama T ve ark. Overactive bladder in diabetes: a peripheral or central mechanism? *Neurourol Urodyn.* 2007;26:807.
166. Pinna C, Zanardo R, Puglisi L. Prostaglandin-release impairment in the bladder epithelium of streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2000;388:267.
167. Nakanishi K, Kamai T, Mizuno T ve ark. Expression of RhoA mRNA and activated RhoA in urothelium and smooth muscle, and effects of a Rho-kinase inhibitor on contraction of the porcine urinary bladder. *Neurourol Urodyn.* 2009;28:521-528.
168. Tatsumiya K, Yamanishi T, Watanabe M ve ark. Effects of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on contraction of pig bladder tissues with or without urothelium. *Int J Urol.* 2009;16:959-966.
169. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *N Engl J Med.* 2005;353(25): 2643- 2653.
170. Everett J, Kerr D. Changing from porcine to human insulin. *Drugs* 1994;47(2):286-296.
171. Patrick AW, Williams G. Adverse effects of exogenous insulin. Clinical features, management and prevention. *Drug Saf.* 1993;8(6):427-44.
172. Editorial Staff: Insulin, (Management/Treatment Protocol). In: Klasco RK (Ed): DRUGDEX® System. Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado (Vol. 152 expires 6/2012).
173. Lindholm P, Lose G. Terbutaline (Bricanyl) in the treatment of female urge incontinence. *Urol Int.* 1986;41:158–160.
174. Gruneberger A. Treatment of motor urge incontinence with clenbuterol and flavoxate hydrochloride. *Br J Obst Gynaecol.* 1984;91:275–278.
175. Hill SR, Fayyad AM, Jones GR. Diabetes mellitus and female lower urinary tract symptoms: a review. *Neurourol Urodyn.* 2008;27:362.
176. Daniels DH, Powell CR, Braasch MR ve ark. Sacral neuromodulation in diabetic patients: success and complications in the treatment of voiding dysfunction. *Neurourol Urodyn.* 2010;29:578.

177. van Kerrebroeck PE, van Voskuilen AC, Heesakkers JP ve ark. Results of sacral neuromodulation therapy for urinary voiding dysfunction: outcomes of a prospective, worldwide clinical study. *J Urol*. 2007;178:2029.
178. Glomset JA, Farnsworth CC. Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol*. 1994;10:181-205.
179. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. 1991;349(6305):117-27.
180. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001;81(1):153-208.
181. Vogelsgesang M, Pautsch A, Aktories K. C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2007;374(5-6):347-60.
182. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995;81(1):53-62.
183. Seasholtz TM, Brown JH. Rho signaling in vascular diseases. *Mol Interv*. 2004;4(6):348-57.
184. Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell*. 1985;41(1):31-40.
185. Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T ve ark. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett*. 1996;392:189–193.
186. Wiberley A, Chen Z, Hu E ve ark. Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 2003a;138:757–766.
187. Bing W, Chang S, Hypolite JA ve ark. Obstruction-induced changes in urinary bladder smooth muscle contractility: a role for Rho kinase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285:F990–F997.
188. Takahashi R, Nishimura J, Hirano K ve ark. Ca²⁺ sensitization in contraction of human bladder smooth muscle. *J Urol*. 2004;172:748-752.
189. Schwartz M. Rho signalling at a glance. *J Cell Sci*. 2004 Nov 1;117(Pt 23):5457-8.

190. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(1):32-9.
191. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H ve ark. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 1997;389(6654):990-4.
192. Shimokawa H, Hiramori K, Iinuma H ve ark. Anti-anginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;40(5):751-61.
193. Kanda T, Wakino S, Hayashi K ve ark. Effect of fasudil on Rho-kinase and nephropathy in subtotally nephrectomized spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int.* 2003;64(6):2009-19.
194. Nishikimi T, Akimoto K, Wang X ve ark. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates glomerulosclerosis in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens.* 2004;22(9):1787-96.
195. Ishikawa Y, Nishikimi T, Akimoto K ve ark. Long-term administration of rho-kinase inhibitor ameliorates renal damage in malignant hypertensive rats. *Hypertension.* 2006;47(6):1075-83.
196. Jezior JR, Brady JD, Rosenstein DI ve ark. Dependency of detrusor contractions on calcium sensitization and calcium entry through LOE-908-sensitive channels. *Br J Pharmacol.* 2001;134:78-87
197. Ratz PH, Meehl JT, Eddinger TJ. RhoA kinase and protein kinase C participate in regulation of rabbit stomach fundus smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol.* 2002;137:983-992.
198. Braverman AS, Tibb AS, Ruggieri MR Sr. M2 and M3 muscarinic receptor activation of urinary bladder contractile signal transduction. I. Normal rat bladder. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316:869-874.
199. Fleischman M, Schneider T, Fetscher C ve ark. Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. II. Protein kinases. *J Pharmacol Exp. Ther.* 2004;308:54-58.
200. Ekman M, Andersson KE, Arner A. Developmental regulation of nerve and receptor mediated contractions of mammalian urinary bladder smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2006;532:99-106.

201. Durlu-Kandilci NT, Brading AF. Involvement of Rho kinase and protein kinase C in carbachol-induced calcium sensitization in beta-escin skinned rat and guinea-pig bladders. *Br J Pharmacol.* 2006;148:376-384.
202. Roosen A, Wu C, Sui GP ve ark. Synergistic effects in neuromuscular activation and calcium-sensitization in the bladder trigone. *BJU Int.* 2008;101:610-614.
203. Hashitani H, Brading AF, Suzuki H. Correlation between spontaneous electrical, calcium and mechanical activity in detrusor smooth muscle of the guinea-pig bladder. *Br J Pharmacol.* 2004;141(1):183-93.
204. Yu HJ, Chien CT, Lai YJ ve ark. Hypoxia preconditioning attenuates bladder overdistension-induced oxidative injury by up-regulation of Bcl-2 in the rat. *J Physiol.* 2004;554:815-828.
205. Feng J, Ito M, Ichikawa K ve ark. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem.* 1999;274:37385-37390.
206. Kropp BP, Zhang Y, Tomasek JJ ve ark. Characterization of cultured bladder smooth muscle cells: assessment of in vitro contractility. *J Urol.* 1999;162:1779-1784.
207. Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM ve ark. R. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem.* 1989;264(28):16378-82.
208. Bosco EE, Mulloy JC, Zheng Y. Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(3):370-4.
209. Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA ve ark. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science.* 2003;302(5644):445-9.
210. Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20384-8.
211. Frost JA, Xu S, Hutchison MR ve ark. Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol Cell Biol.* 1996;16(7):3707-13.
212. Brown JL, Stowers L, Baer M ve ark. Human Ste20 homologue hPAK1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr Biol.* 1996;6(5):598-605.
213. Guo D, Tan YC, Wang D, Madhusoodanan KS ve ark. A Rac-cGMP signaling pathway. *Cell.* 2007;128(2):341-55.

214. Nagata K, Puls A, Futter C ve ark. The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *EMBO J.* 1998;17(1):149-58.
215. Teramoto H, Coso OA, Miyata H ve ark. Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem.* 1996;271(44):27225-8.
216. Perona R, Montaner S, Saniger L ve ark. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 1997;11(4):463-75.
217. Joneson T, Bar-Sagi D. A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. *J Biol Chem.* 1998;273(29):17991-4.
218. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 2000;87(3):179-83.
219. Bokoch GM. Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 1995;5(3):109-13.
220. Wong HL, Pinontoan R, Hayashi K ve ark. Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell.* 2007;19(12):4022-34.
221. Nowicki PT, Flavahan S, Hassanain H ve ark. Redox signaling of the arteriolar myogenic response. *Circ Res.* 2001;89(2):114-6.
222. Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res.* 1988;195(3):255-71.
223. Downward J. The ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci.* 1990;15(12):469-72.
224. Pervaiz S, Cao J, Chao OS ve ark. Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells. *Oncogene.* 2001;20(43):6263-8.
225. Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci.* 1997;22(9):355-8.
226. Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ. Ras, superoxide and signal transduction. *Biochem Pharmacol.* 1998;55(9):1339-46.
227. Irani K, Xia Y, Zweier JL ve ark. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science.* 1997;275(5306):1649-52.

228. Joneson T, Bar-Sagi D. A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. *J Biol Chem.* 1998;273(29):17991-4.
229. Boehm JE, Chaika OV, Lewis RE. Rac-dependent anti-apoptotic signaling by the insulin receptor cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 1999;274(40):28632-6.
230. Tobar N, Cáceres M, Santibáñez JF ve ark. RAC1 activity and intracellular ROS modulate the migratory potential of MCF-7 cells through a NADPH oxidase and NFkappaB-dependent mechanism. *Cancer Lett.* 2008;267(1):125-32.
231. Shen E, Li Y, Li Y ve ark. Rac1 is required for cardiomyocyte apoptosis during hyperglycemia. *Diabetes.* 2009;58(10):2386-95.
232. Jin S, Ray RM, Johnson LR. TNF-alpha/cycloheximide-induced apoptosis in intestinal epithelial cells requires Rac1-regulated reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;294(4):G928-37.
233. Deshpande SS, Angkeow P, Huang J ve ark. Rac1 inhibits TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 2000;14(12):1705-14.
234. Ozaki M, Haga S, Zhang HQ ve ark. Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon rac1. *Cell Death Differ.* 2003;10(5):508-15.
235. Sawada N, Salomone S, Kim HH ve ark. Regulation of endothelial nitric oxide synthase and postnatal angiogenesis by Rac1. *Circ Res.* 2008;103(4):360-8.
236. Sawada N, Li Y, Liao JK. Novel aspects of the roles of Rac1 GTPase in the cardiovascular system. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(2):116-21.
237. Li T, Fang Y, Yang G ve ark. Effects of the balance in activity of RhoA and Rac1 on the shock-induced biphasic change of vascular reactivity in rats. *Ann Surg.* 2011;253(1):185-93.
238. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55(2):61-75.
239. Street CA, Bryan BA. Rho kinase proteins-pleiotropic modulators of cell survival and apoptosis. *Anticancer Res.* 2011;31(11):3645-57.
240. Volanis D, Zaravinos A, Kadiyska T ve ark. Expression profile of Rho kinases in urinary bladder cancer. *J BUON.* 2011;16(3):511-21.

241. del Peso L, Hernández-Alcoceba R, Embade N ve ark. Rho proteins induce metastatic properties in vivo. *Oncogene*. 1997;15(25):3047-57.
242. Pesce C, Menini S, Pricci F ve ark. Glomerular cell replication and cell loss through apoptosis in experimental diabetes mellitus. *Nephron*. 2002;90(4):484-8.
243. Gumustekin M, Tekmen I, Guneli E ve ark. Short-term melatonin treatment improved diabetic nephropathy but did not affect hemorheological changes in diabetic rats. *Pharmazie*. 2007;62(9):693-8.
244. Menini S, Iacobini C, Oddi G ve ark. Increased glomerular cell (podocyte) apoptosis in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus: role in the development of diabetic glomerular disease. *Diabetologia*. 2007;50(12):2591-9.
245. Sato Y, Feng GG, Huang L ve ark. Enhanced expression of naofen in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats: possible correlation to apoptosis of tubular epithelial cells. *Clin Exp Nephrol*. 2010;14(3):205-12.
246. Gur S, Irat AM. L-carnitine treatment partially restores urinary bladder function of streptozotocin diabetic rats. *Urol Int*. 2008;81(3):340-6.
247. Cardozo AH, Cabrini DA, Campos MM ve ark. Diabetes-induced changes in responsiveness of rat bladder and vas deferens to peptides in vitro: susceptibility to reversal by insulin. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002;80(4):334-40.
248. Latifpour J, Gousse A, Yoshida M ve ark. Effect of insulin and dietary myoinositol on muscarinic receptor alterations in diabetic rat bladder. *J Urol*. 1992;147(3):760-3.
249. Longhurst PA, Kauer J, Levin RM. The ability of insulin treatment to reverse or prevent the changes in urinary bladder function caused by streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Gen Pharmacol*. 1991;22(2):305-11.
250. Yono M, Pouresmail M, Takahashi W ve ark. Effect of insulin treatment on tissue size of the genitourinary tract in BB rats with spontaneously developed and streptozotocin-induced diabetes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2005;372(3):251-5.
251. Christ GJ, Hsieh Y, Zhao W ve ark. Effects of streptozotocin-induced diabetes on bladder and erectile (dys)function in the same rat in vivo. *BJU Int*. 2006;97(5):1076-82.
252. Yenilmez A, Özçifçi M, Aydın Y ve ark. Protective effect of high-dose thiamine (B1) on rat detrusor contractility in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 2006;43(4):103-8.

253. Atalik KE, Okudan N, Gokbel H ve ark. Diabetes mellitus- and cooling-induced bladder contraction: an in vitro study. *J Smooth Muscle Res.* 2010;46(4):175-83.
254. Kodama M, Takimoto Y. Influence of 5-hydroxytryptamine and the effect of a new serotonin receptor antagonist (sarpogrelate) on detrusor smooth muscle of streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. *Int J Urol.* 2000;7(6):231-5.
255. Gupta S, Yang S, Cohen RA ve ark. Altered contractility of urinary bladder in diabetic rabbits: relationship to reduced Na⁺ pump activity. *Am J Physiol.* 1996;271(6 Pt 1):C2045-52.
256. Ichiyanagi N, Tsujii T, Masuda H ve ark. Changed responsiveness of the detrusor in rabbits with alloxan induced hyperglycemia: possible role of 5-hydroxytryptamine for diabetic bladder dysfunction. *J Urol.* 2002;168(1):303-7.
257. Nsabimana AM, Ojewole JA. Diabetes mellitus and responses of the urinary bladder to acetylcholine: an in vitro study. *J Smooth Muscle Res.* 2008;44(3-4):143-50.
258. Giglio D, Tobin G. Muscarinic receptor subtypes in the lower urinary tract. *Pharmacology.* 2009;83(5):259-69.
259. Mimata H, Wheeler MA, Fukumoto Y ve ark. Enhancement of muscarinic receptor-coupled phosphatidyl inositol hydrolysis in diabetic bladder. *Mol Cell Biochem.* 1995;152(1):71-6.
260. Latifpour J, Gousse A, Kondo S ve ark. Effects of experimental diabetes on biochemical and functional characteristics of bladder muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;248(1):81-8.
261. Wrobel A, Adamiak A, Skorupski P ve ark. Rho kinase a new target for pharmacological treatment of an overactive bladder. *Ginekol Pol.* 2008;79:364-369.
262. Vecchione C, Aretini A, Marino G ve ark. Selective Rac-1 inhibition protects from diabetes-induced vascular injury. *Circ Res.* 2006;98(2):218-25.
263. Roscioni SS, Heerspink HJ, de Zeeuw D. Diabetes: ROADMAP: the road to renoprotection? *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(8):427-8.
264. Murthy KS, Zhou H, Grider JR ve ark. Differential signalling by muscarinic receptors in smooth muscle: m2-mediated inactivation of myosin light chain kinase via Gi3, Cdc42/Rac1 and p21-activated kinase 1 pathway, and m3-mediated MLC20 (20 kDa regulatory light chain of myosin II) phosphorylation via Rho-associated kinase/myosin

- phosphatase targeting subunit 1 and protein kinase C/CPI-17 pathway. *Biochem J.* 2003;374(Pt 1):145-55.
265. 14 Somlyo AP, Somlyo AV. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* 2003;83:1325–1358.
 266. Gumustekin M, Arici A, Celiker S ve ark. The role of Rac-1 GTPase on cardiovascular dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rats. PreHT 2011, International Conference on PreHypertension & Cardio Metabolic Syndrome, Abstracts-Posters: 151, February 24-27, 2011, Vienna, Austria.
 267. Kou R, Michel T. Epinephrine regulation of the endothelial nitric-oxide synthase: roles of RAC1 and beta3-adrenergic receptors in endothelial NO signaling. *J Biol Chem.* 2007;282(45):32719-29.
 268. Selvakumar B, Hess DT, Goldschmidt-Clermont PJ ve ark. Co-regulation of constitutive nitric oxide synthases and NADPH oxidase by the small GTPase Rac. *FEBS Lett.* 2008;582(15):2195-202.
 269. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(3):C661-8.
 270. Tang AT, Campbell WB, Nithipatikom K. ROCK1 feedback regulation of the upstream small GTPase RhoA. *Cell Signal.* 2012;24(7):1375-80.
 271. Brunton S. Insulin delivery systems: reducing barriers to insulin therapy and advancing diabetes mellitus treatment. *Am J Med.* 2008;121(6 Suppl):S35-41.
 272. Cleary PA, Orchard TJ, Genuth S ve ark: DCCT/EDIC Research Group. The effect of intensive glycemic treatment on coronary artery calcification in type 1 diabetic participants of the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study. *Diabetes.* 2006;55(12):3556-65.
 273. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 2004;25(1):4-7.
 274. Baron AD, Clark MG. Role of blood flow in the regulation of muscle glucose uptake. *Annu Rev Nutr.* 1997;17:487-99.
 275. Taylor PD, Wickenden AD, Mirrlees DJ ve ark. Endothelial function in the isolated perfused mesentery and aortae of rats with streptozotocin-induced diabetes: effect of

- treatment with the aldose reductase inhibitor, ponalrestat. *Br J Pharmacol.* 1994;111(1):42-8.
276. Heygate KM, Lawrence IG, Bennett MA ve ark. Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1995;116(8):3251-9.
 277. Kobayashi T, Kamata K. Effect of insulin treatment on smooth muscle contractility and endothelium-dependent relaxation in rat aortae from established STZ-induced diabetes. *Br J Pharmacol.* 1999;127(4):835-42.
 278. Paskaloglu K, Sener G, Ayanoğlu-Dülger G. Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol.* 2004;499(3):345-54.
 279. Fukumoto Y, Yoshida M, Weiss RM, Latifpour J. Reversibility of diabetes- and diuresis-induced alterations in rat bladder dome muscarinic receptors. *Diabetes.* 1994;43(6):819-26.
 280. Wingard C, Fulton D, Husain S. Altered penile vascular reactivity and erection in the Zucker obese-diabetic rat. *J Sex Med.* 2007;4(2):348-62; discussion 362-3.
 281. Furukawa N, Ongusaha P, Jahng WJ ve ark. Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. *Cell Metab.* 2005;2(2):119-29.
 282. Chun KH, Choi KD, Lee DH ve ark. In vivo activation of ROCK1 by insulin is impaired in skeletal muscle of humans with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300(3):E536-42.
 283. Li WJ, Park K, Paick JS ve ark. Chronic treatment with an oral rho-kinase inhibitor restores erectile function by suppressing corporal apoptosis in diabetic rats. *J Sex Med.* 2011;8(2):400-10.
 284. Kishii K, Hisayama T, Takayanagi I. Comparison of contractile mechanisms by carbachol and ATP in detrusor strips of rabbit urinary bladder. *Jpn J Pharmacol.* 1992;58(3):219-29.
 285. Nishimura Y, Usui H, Kurahashi K ve ark. Endothelium-dependent contraction induced by acetylcholine in isolated rat renal arteries. *Eur J Pharmacol.* 1995;275(2):217-21.
 286. Takagi-Matsumoto H, Ng B, Tsukimi Y ve ark. Effects of NSAIDs on bladder function in normal and cystitis rats: a comparison study of aspirin, indomethacin, and ketoprofen. *J Pharmacol Sci.* 2004;95(4):458-65.

287. al-Waili NS. Indomethacin suppository to treat primary nocturnal enuresis: double-blind study. *J Urol*. 1989;142(5):1290-2.
288. Batislam E, Nuhoglu B, Peşkircioğlu L ark. A prostaglandin synthesis inhibitor, diclofenac sodium in the treatment of primary nocturnal enuresis. *Acta Urol Belg*. 1995;63(3):35-8.
289. Schneider T, Hein P, Michel MC. Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. I. Phospholipases and Ca²⁺ sources. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(1):47-53.
290. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1193-226.
291. McCafferty GP, Misajet BA, Laping NJ ve ark. Enhanced bladder capacity and reduced prostaglandin E₂-mediated bladder hyperactivity in EP3 receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(2):F507-14.
292. Ito K, Shimomura E, Iwanaga T ve ark. Essential role of rho kinase in the Ca²⁺ sensitization of prostaglandin F_{2α}-induced contraction of rabbit aortae. *J Physiol*. 2003;546(Pt 3):823-36.
293. Shum WW, Le GY, Jones RL ve ark. Involvement of Rho-kinase in contraction of guinea-pig aorta induced by prostanoid EP3 receptor agonists. *Br J Pharmacol*. 2003;139(8):1449-61.
294. Schaafsma D, Gosens R, Bos IS ve ark. Role of contractile prostaglandins and Rho-kinase in growth factor-induced airway smooth muscle contraction. *Respir Res*. 2005;6:85.
295. Wang XM, Zhang MX, Zhao L ve ark. The Starling mechanism of the urinary bladder contractile function and the influence of hyperglycemia on diabetic rats. *J Diabetes Complications*. 2010;24(2):121-8.