

Sudan kaçınma stresi uygulanmış erkek sıçan mesanesinde oksitosin etkisi: Işık ve elektron mikroskopik inceleme

Esin AK, Esra ÇIKLER DÜLGER, Ahmet Özer ŞEHİRLİ, Şermin TETİK, Rabia PİŞİRİCİLER, Göksel ŞENER, Şule ÇETİNEL

ÖZET

Çalışmamızda, erkek sıçanlara uygulanan bir interstisyel sistit modeli olarak kabul gören sudan kaçınma stresinin (SKS) mesane hasarı üzerine etkisi ve oksitosin hormonunun strese bağlı olarak gelişen interstisyel sistit üzerindeki morfolojik ve biyokimyasal etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda her grupta eşit sayıda (n=6) sıçan olmak üzere 24 adet erkek Wistar sıçan 4 gruba ayrılmıştır: 1 Kontrol grubuna (K) herhangi bir işlem uygulanmamıştır. 2. Kronik stres grubuna (KS) 5 gün 2 saat SKS uygulanmıştır. 3. Oksitosin grubuna (OT) 5 gün subkutan (sc) 5 µg/kg oksitosin uygulanmıştır. 4. Kronik Stres +Oksitosin grubuna (KS+OT) kronik stres boyunca 5µg /kg oksitosin sc uygulanmıştır. Deney sonunda mesane dokusu ışık ve elektron mikroskopunda incelenmiştir. Oksidatif stres, malondialdehit (MDA) ve glutasyon (GSH) ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Sistemik stres; serum kortizol tayini ile ölçülmüştür.

KS grubuna ait ışık mikroskopik incelemelerde ürotelyumda dökülmeler, bağ dokusunda ödem, polimorf nüveli lökosit artışı, damar içi konjesyon ve degranüle mast hücre artışı izlenirken, KS+OT grubunda belirgin bir iyileşme saptanmıştır. Elektron mikroskopik incelemelerde KS grubunda ürotelyum hücrelerinde hasar, glikozaminoglikan tabakasında düzensizlik ve hücreler arası sıkı bağlantılarda açılma izlenirken, KS+OT grubunda hasarın gerilediği görülmüştür. Serum kortizol, doku MDA ve GSH seviyeleri morfolojik bulgularla uyumlu olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamıza ait veriler erkek sıçanlarda SKS'nin sebep olduğu interstisyel sistite bağlı morfolojik ve biyokimyasal hasarın dişi sıçanlar ile benzer derecede oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca oksitosin tedavisinin oluşan bu hasara karşı koruyucu bir etki gösterdiği gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Sudan kaçınma stresi, oksitosin, erkek sıçan, mesane, histokimya.

Esin Ak, Rabia Pişiriciler
Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji BD, İstanbul, Türkiye.

Esra Dülger
Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AbD, İstanbul, Türkiye.

Ahmet Özer Şehirli, Göksel Şener
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AbD, İstanbul, Türkiye.

Şermin Tetik
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya AbD, İstanbul, Türkiye.

Şule Çetinel
Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AbD, İstanbul, Türkiye.

Sorumlu yazar iletişim bilgileri:

Esin Ak
Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji BD, İstanbul, Türkiye.
Tel: 90 212 231 91 20 / 198
Fax : 90 212 246 52 47
GSM: 0506 599 07 82
E-posta: esinbir@yahoo.com

GİRİŞ

Stres; vücudun değişen durumlara adaptasyon sağlayabilmek için vermiş olduğu psikolojik ve fiziksel yanıtlar olarak tanımlanmaktadır. Psikolojik ve fizyolojik stres değişik derecelerde otonomik, endokrin ve davranışsal cevapları ortaya çıkarır. Böylece vücut homeostazı tekrar oluşturulur ve bireyin stres ile baş etmesini sağlar. Vücut homeostazına bir tehdit algılandığında hipotalamik-pütiter-adrenal (HPA) aks aktive olur ve strese karşı bir cevap ortaya çıkar (1). İnsan ve deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda anksiyete ve stresin üriner sistemde interstisyel sistit (İS) gibi fonksiyonel mesane hastalığının ortaya çıkmasına veya şiddetlenmesine sebep olabildiği öne sürülmüştür (2- 4).

İnterstisyel sistit (İS), işeme sıklığı ve aciliyeti, suprapubik ağrı ve yanma ile tanımlanan kronik, enflamatuvar ve steril

bir mesane hastalığı olup çoğunlukla kadınlarda (%90) görülmektedir. Bu hastalığın etyolojisi halen bilinmemekle birlikte enfeksiyon, otoimmünite, ürotelyal disfonksiyon ve glikozaminoglikan (GAG) tabaka bozukluğu, mast hücre infiltrasyonu ve nörojenik mekanizmaları içeren çok sayıda teori ileri sürülmüştür (5-7). İS'de özellikle mast hücreleri ve onların potansiyel rolüne dikkat çekilmektedir (8). Bu patolojide mesane epitelinin yüzeyindeki GAG tabakasında hasar oluşur ve böylece epitelin geçirgenliğinde artış ortaya çıkar (9).

Doğumda ve emzirme olaylarındaki rolü çok iyi bilinen oksitosin (OT), hipotalamusdaki supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerdeki nöronlardan sentezlenir (10, 11). Bu hormonun ve reseptörlerinin ekstra-hipotalamik alanlarda belirlenmesi; bu hormonun stres, sosyal, cinsellik ve annelik davranışları gibi santral fonksiyonlar ile ilişkilendirilmesine neden olmaktadır (10). Oksitosinin HPA aks aktivitesini baskılayarak davranışsal ve stres-azaltıcı etkilere neden olduğu belirtilmiştir (12, 13). Ayrıca, bu hormonun bazı interlökin salınımının inhibisyonuyla immün ve enflamatuvar süreçleri düzenleyerek anti-enflamatuvar etki gösterdiği de ortaya konulmuştur (13, 14). Black ve ark., sistemik OT'nin analjezik ve anksiyolitik etkilerine sahip olduğunu ve stresin sebep olduğu kronik ağrı sendromunda oldukça kullanışlı bir ajan olabileceğini ileri sürmüşlerdir (15).

Literatür incelemesinde kronik strese bağlı İS modellerinde çoğunlukla dişi deney hayvanları kullanılmış olup, stresin erkek cinsiyete ait mesane dokusundaki etkileri üzerinde çok fazla çalışılmamıştır. Bu çalışmada erkek sıçanlara uygulanan sudan kaçınma stresinin (SKS) mesane hasarı üzerine etkisi sorgulanmış ve OT hormonunun strese bağlı gelişen İS üzerindeki morfolojik ve biyokimyasal etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 24 adet erişkin erkek Wistar sıçan (250-300 gr) kullanıldı. Tüm sıçanlar 22±2 °C oda sıcaklığında, %60-70 oranında nemi korunan ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık dönemlere sahip bir ortamda tutuldu. Deney süresince hayvanlar standart pelet sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendiler. Su ve yem kısıtlaması yapılmadı. Çalışmaya Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'undan (84. 2009.mar-12.02.2010) etik kurul onayı alındıktan sonra başlandı.

Stres Yöntemi

Deney öncesindeki bir haftalık alıştırmaya sürecinde hayvanların deney ortamına, araştırmacıya ve rutin

işlemlere alıştırılması için deney hayvanlarına her gün aynı saatte ve aynı araştırmacı tarafından dokunuldu (handling). Bu çalışmada, psikolojik stres (kaygı) modeli olarak uygulanan SKS kullanıldı (16). Bu model için 90 cm çapında 50 cm derinliğinde ılık su (25° C) ile dolu plastik bir konteynırın ortasına 8 x 8 cm boyutlarında, su seviyesinin 1 cm üzerinde kalacak şekilde bir platform yerleştirildi. Deney hayvanları 5 gün boyunca aynı saatte (8:00-10:00) 2 saat olmak koşulu ile bu platformun üzerine bırakıldı.

Deney protokolü

Çalışmaya dahil edilen sıçanlar 4 gruba ayrıldı: 1- Kontrol Grubu (K, n=6): herhangi bir işlem uygulanmadı, 2- Oksitosin Grubu (OT, n= 6): 5 gün subkutan (sc) olarak 5µg/kg oksitosin uygulandı, 3- Kronik Stres Grubu (KS, n= 6): 5 gün boyunca günde 2 saat SKS uygulandı ve 4- Kronik Stres + Oksitosin Grubu (KS+OT, n= 6): 5 gün boyunca günde 2 saat SKS'nin hemen ardından 5µg /kg OT sc. olarak uygulandı. Deney sonunda uygulanan son SKS veya OT enjeksiyonundan 2 saat sonra 12:00-13:00 saatleri arasında dekapite edilen hayvanların mesaneleri histolojik ve biyokimyasal inceleme için çıkartıldı. Serum kortizol seviyesi tayini için intrakardiyak kan örnekleri alındı.

Işık mikroskopik inceleme

Işık mikroskopik inceleme için, %10'luk nötral tamponlu formaldehit içerisinde tespit edilen mesane doku örnekleri yükselen alkol serilerinden geçirilerek (%70, %90, %96, %100) dehidrate edildi. Sonrasında toluende şeffaflaştırıldı ve parafin içine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere mesane genel morfolojisini göstermek amacıyla Hematoksilin - Eozin (H&E) boyası, ürotelyumda GAG tabakasını göstermek amacıyla Periyodik Asit - Schiff (PAS) ve mast hücrelerin gösterilmesi amacıyla 0.5N HCl içinde hazırlanmış %0.5'lik Asitli Toludin Mavis (TM) 3 gün süreyle uygulandı. Tüm kesitler Olympus BX51 (Tokyo, Japonya) ışık mikroskobu ile incelenip dijital kamera (Olympus DP72) ile fotoğraflandı.

Mast hücre sayımı

Mesane mukozasındaki granüllü ve degranüle olmuş mast hücre sayısının belirlenmesi amacıyla kesitlere asitli TM boyaması uygulandı. Sistemik rastgele örnekleme yapılarak toplam olarak 5 kesit (ilk kesit rastgele olmak üzere her 5 kesitten biri) alındı. Bilgisayar görüntüleme yardımıyla her bir kesitte x100 büyütmede rastgele seçilen 10 ayrı alanda (her bir alan 0.0908 mm²) x400 büyütmede

granüllü ve degranüle olmuş mast hücre sayımı yapıldı ve mast hücre yoğunluğu her bir alandaki hücre sayısı olarak ifade edildi (17).

Elektron mikroskopik inceleme

Rutin geçirimli elektron mikroskop (TEM) protokolü

Elektron mikroskopik inceleme için doku örnekleri, fosfat tampon (pH 7.2) ile hazırlanmış %2,5 glutaraldehit içerisinde +4°C'de 4 saat süresince tespit edildikten sonra fosfat tampon (pH 7.2) ile hazırlanmış %1'lik osmiyum tetroksit ile (OsO₄) 1 saat postfiksasyon yapıldı. Yükselen alkol serilerinden geçirildikten sonra epon 812 ile polimerize edildi. Epon bloklarından bakır grid üzerine alınan ince kesitler (60nm) uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandıktan sonra JEOL 1200 EXII TEM (Tokyo, Japonya) ile incelenip TEM'a bağlı dijital kamera (Olympus Morada Soft Imaging System) ile fotoğrafları çekildi.

Rutenyum kırmızısı boyama metodu

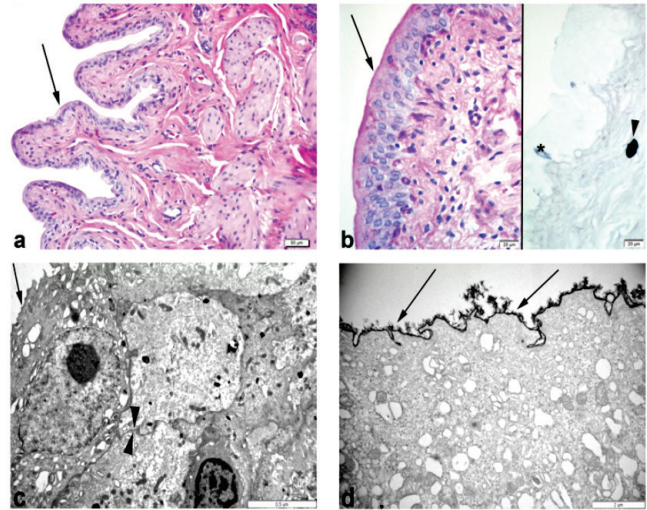
Elektron mikroskopunda mesane ürotelyum glikozaminoglikan tabakasını göstermek için rutenyum kırmızısı (RR) boyama metodu uygulandı (18). Dört saat süresince fosfat tampon ile hazırlanmış % 2,5 glutaraldehit (pH 7.2) ile fikse edilen mesane doku örnekleri, 1:5 oranında hazırlanmış fosfat tampon ile hazırlanmış %1'lik OsO₄ (pH 7.2) ve % 0,0003 stok RR (stok RR: distile su=3:10000) ile 1 saat süresince postfiksasyon yapıldı. Post fiksasyon aşamasından sonra, 1:5 oranında distile su ile hazırlanmış %2'lik uranil asetat ve stok RR içinde bekletilerek boyanmaları sağladı. Dokular, yükselen alkol serilerinden geçirilerek saf epona gömülerek bloklandı. Epon bloklarından bakır grid üzerine alınan ince kesitler (60nm) JEOL 1200 EXII TEM (Tokyo, Japonya) ile incelenip TEM'e bağlı dijital kamera (Olympus Morada Soft Imaging System) ile fotoğrafları çekildi.

Malondialdehit (MDA) ve Glutasyon (GSH) tayini

MDA ve GSH analizi için -20⁰ C'de saklanan mesane doku örnekleri, buz üstünde 150 mM KCl çözeltisiyle ile homojenize edildi. MDA analizi için, tiyobarbitürik asit ile MDA reaksiyonu oluşan renk kompleksinin absorbansı spektrofotometrede 532 nm'de okundu (19). GSH tayini için Ellman çözeltisi spektrofotometrik metod kullanıldı ve absorbansı 412 nm'de okundu (20). Elde edilen sonuçlar nmol MDA/g doku ve µg GSH/g doku olarak ifade edildi.

Serum kortizol tayini

İntrakardiyak olarak alınan kan örneklerinden elde edilen serumlardan Cortisol EIA kit (ADI-901-071, Enzo Life Science, United States) kullanılarak kortizol düzeyleri ölçüldü.



Resim1. K grubu (a): Mesane lümenini çevreleyen düzgün ürotelyum tabakası (ok), (b): düzenli GAG tabakası (ok), mukozada granüllü mast hücresi (ok başı-inset) ve ürotelyum hücrelerine göç eden mast hücre (asteriks-küçük resim), (c):hasarsız ürotelyum yüzey tabakası (ok) normal yapıda görülen hücrelerarası sıkı bağlantılar (ok başı), (d): ürotelyum boyunca kesintisiz olarak dağılım gösteren RR boyanma (ok). (a): H&E boyama; (b): PAS boyama, TM boyama-sağ küçük resim; (c):TEM; (d): TEM, RR boyama.

İstatistiksel Değerlendirme

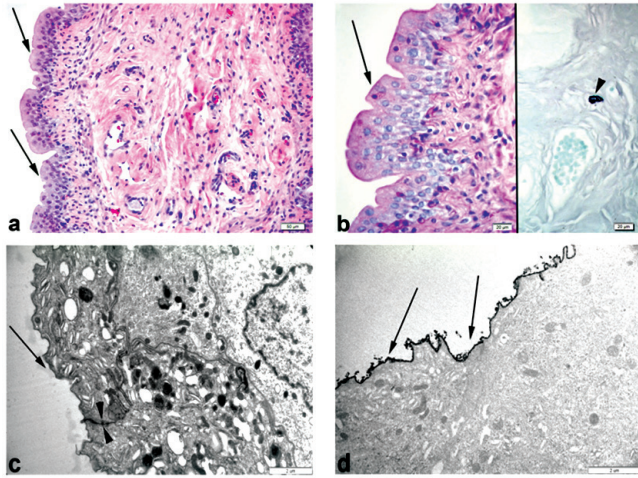
Verilerin analizi için GraphPad Prizm-6 istatistik programı kullanıldı. Sürekli değişkenler ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Veriler normal dağıldığında tek yönlü ANOVA testi sonrasında Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Veriler normal dağılmadığında ise Kruskal-Wallis testi sonrasında Dunn çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. P değerinin 0.05'den küçük olması (p<0.05) durumunda veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

İşık ve Elektron mikroskopik değerlendirme

İşık mikroskopik inceleme sonucunda, K grubuna ait mesane dokusunda ürotelyum tabakasının düzgün ve hasarsız olduğu, GAG tabakasının bütünlüğünü koruduğu ve az sayıda mast hücresi (Res.1.a,b) gözlenmiştir. Ayrıca, bu gruba ait mesane dokusunda düzgün ürotelyum tabakası, düzenli GAG tabakası ve geçirimsiz sıkı bağlantılar (Res.1. c,d) TEM seviyesindeki incelemeler sonucunda tespit edilmiştir.

OT grubuna ait mesane dokusunda ürotelyum tabakasının düzgün ve hasarsız olduğu, GAG tabakasının bütünlüğünü koruduğu ve az sayıda mast hücresi (Res.2.a,b) ışık mikroskopik inceleme sonucunda gözlenmiştir. TEM seviyesindeki incelemeler sonucunda mesane dokusunda



Resim 2. OT grubu (a): düzgün ürotelyum tabakası (ok), **(b):** Mesane lümenini çevreleyen düzenli GAG tabakası (ok) ve damar komşuluğunda görülen granüllü mast hücre (ok başı-küçük resim), **(c):** düzgün yüzeye sahip ürotelyum (ok) ve geçirimsiz sıkı bağlantılar (ok başı), **(d):** ürotelyum boyunca düzenli GAG tabakasının RR boyanması (ok). **(a):** H&E boyama; **(b):** PAS boyama, TM boyama-sağ küçük resim; **(c):** TEM; **(d):** TEM, RR boyama.

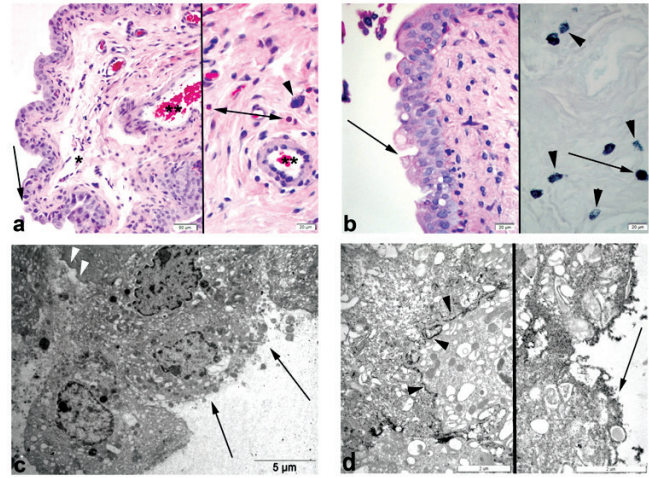
hasarsız ürotelyum ve GAG tabakası ve sıkı bağlantıların geçirimsiz olduğu (Res. 2. c,d) tespit edilmiştir.

KS grubuna ait ışık mikroskopik inceleme sonucunda mesane doku kesitlerinde yoğun ürotelyum hasarı, ürotelyum hücrelerinde vakuolizasyon, düzensiz GAG tabakası, bağ dokusunda ödem, yoğun polimorf nüveli lökositler, damar içi konjesyon ve mast hücre artışı (Res. 3.a,b) saptanmıştır. TEM seviyesindeki incelemeler sonucunda, ürotelyum ve GAG tabakasında bozulmanın yanı sıra sıkı-bağlantıların açılması nedeniyle RR'nin hücreler arası alana sızdığı (Res. 3.c,d) görülmüştür.

KS+OT gruba ait mesane dokusunda, ürotelyum ve GAG tabasında yer yer olmak üzere hafif derecede bozulmanın devam ettiği, polimorf nüveli lökosit yoğunluğunda azalma ve vazokonjesyonun minimal seviyede devam ettiği ve az sayıda mast hücresi (Res.4.a,b) ışık mikroskopik inceleme sonucunda tespit edilmiştir. TEM seviyesindeki inceleme sonucunda ise genel olarak ürotelyumda sıkı-bağlantıların arasında RR geçirgenliğinin kaybolduğu ve düzenli GAG tabakası (Res.4.c,d) izlenmiştir.

Mast hücre sayımına ait sonuçlar

Asitli TM boyaması uygulanan kesitlerdeki mukozal mast hücre sayımına bağlı olarak, granüllü mast hücre sayısının tüm gruplar arasında benzerlik gösterdiği saptanmıştır



Resim 3. KS grubu (a): Mesane lümenini çevreleyen hasarlı ürotelyum hücreleri (ok), bağ dokusunda ödem (asteriks), polimorf nüveli lökositler (çift başlı ok-küçük resim), damar içi konjesyon (çift asteriks) ve damar komşuluğunda granüllü mast hücreleri (ok başı-küçük resim), **(b):** Mesane lümenine dökülmüş ürotelyum hücreleri, hasarlı GAG tabakası (ok), mukozada granüllü (ok) ve degranüle olmuş mast hücreleri (ok başları), **(c):** hasarlı ürotelyum yüzeyinde dökülmüş epitel hücre artıkları (ok) ve sıkı bağlantılarda açılma (ok başı), **(d):** lümen boyunca hasarlı GAG tabakasında kesintili RR boyanması (ok-küçük resim) ve sıkı bağlantıların açılması ile hücreler arasında RR geçişi (ok başı). **(a):** H&E boyama; **(b):** PAS boyama, TM boyama-sağ küçük resim; **(c):** TEM; **(d):** TEM, RR boyama.

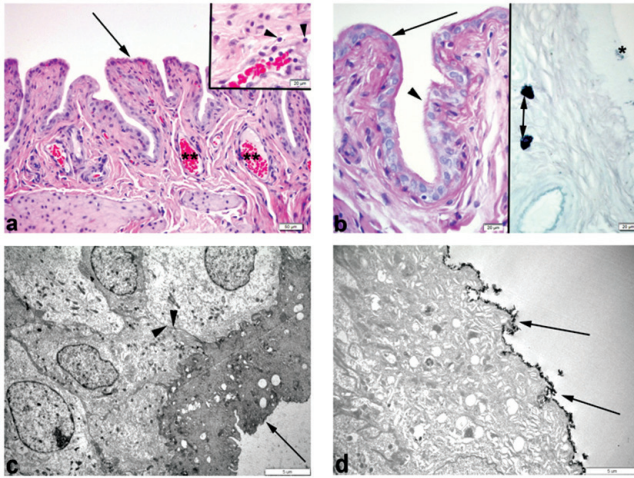
($p > 0.05$). Buna karşılık KS grubuna ait degranüle mast hücre sayısının K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.001$). KS+OT grubuna ait degranüle olmuş mast hücre sayısının OT tedavisine bağlı olarak normal değerlere yaklaştığı gözlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 1).

Serum kortizol, MDA ve GSH seviyelerine ait biyokimyasal sonuçlar

Stresin bir göstergesi olan serum kortizol seviyeleri incelendiğinde; KS grubuna ait kortizol seviyesinin, K ve OT gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenirken ($p < 0.001$), KS+OT grubunda OT tedavisinin istatistiksel olarak anlamlı derecede kortizol seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 2).

Dokudaki hasarın bir göstergesi olan MDA seviyesi incelendiğinde; KS grubuna ait MDA seviyesi, K ve OT gruplarıyla kıyaslandığında oluşan hasara bağlı olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır ($p < 0.001$). Bunun yanı sıra KS+OT grubundaki MDA seviyelerinin KS grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 3).

SKS uygulanan KS grubuna ait mesane dokularındaki MDA seviyesindeki artışına paralel olarak GSH seviyesi K ve OT gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı



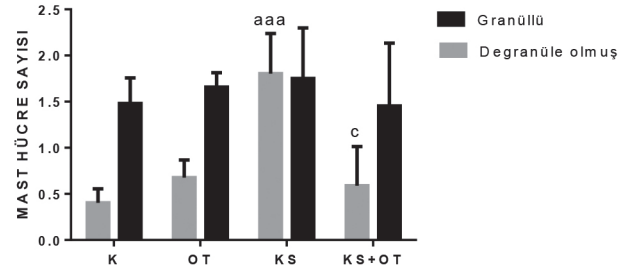
Resim 4. KS+OT grubu (a): Mesane lümenindeki yer yer hasarlı ürotelyum (ok), damar içi konjesyon (asteriks) ve polimorf nüveli lökositler (ok başı-küçük resim), **(b):** Yer yer hasarlı GAG tabakası (ok), granüllü mast hücreleri (çift başlı ok-küçük resim) ve ürotelyum hücrelerine göç eden mast hücresi (asteriks), **(c):** hasarsız ürotelyum ve normal yapıda görülen sıkı bağlantılar (ok başı), **(d):** Ürotelyum boyunca düzgün GAG tabakasının kesintisiz RR boyanması (ok başı). **(a):** H&E boyama; **(b):** PAS boyama, TM boyama-sağ küçük resim; **(c):**TEM; **(d):** TEM, RR boyama.

derecede azalmıştır ($p < 0.01$ ve $p < 0.05$ sırasıyla). OT tedavisine bağlı olarak, KS+OT grubuna ait GSH seviyeleri hasarın onarılmasının bir göstergesi olarak anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4).

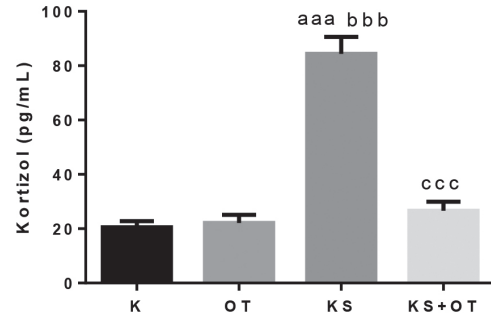
TARTIŞMA

Literatür bilgisine paralel olarak çalışmamızda SKS uygulanan erkek sıçanların mesanelerinde dişi sıçanlara benzer morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gözlenmiştir (17, 21, 22). OT tedavisi sonucunda, SKS'ye bağlı olarak mesane mukozasında polimorf nüveli lökosit ve degranüle olmuş mast hücre sayısında artış tespit edilmiştir. Ayrıca geçirgenliği artmış hücreler arası sıkı bağlantılarda, bütünlüğü bozulmuş ürotelyal hücrelerde ve GAG tabakasında belirgin bir iyileşme gözlenmiştir. Stresin neden olduğu MDA seviyesindeki artışın, GSH seviyesindeki azalmanın ve serum kortizol seviyesindeki artışın, OT uygulaması ile düzeldiği saptanmıştır.

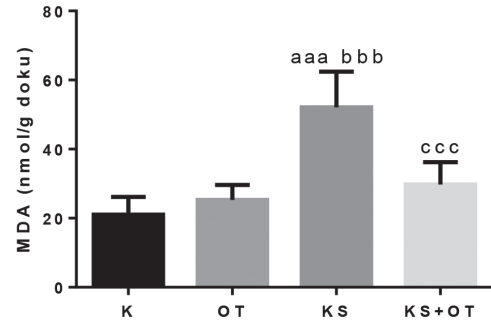
Strese yanıt olarak santral sinir sisteminden kaynaklanan nöral uyarı, adrenal bezlerden stresin bir belirteci olan glukokortikoid salınmasına sebep olur (23). Erkek sıçanlarda yüzme egzersizinin akut ve kronik stres modelleri üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada serum kortizol seviyelerinin stres uygulanmayan gruba kıyasla arttığı saptanmıştır (24). SKS uygulanan grupta serum kortizol



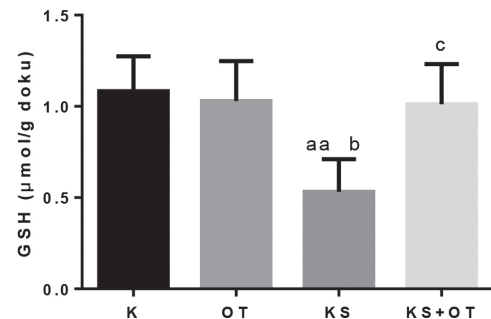
Şekil 1: Tüm gruplara ait her bir 0.0908 mm^2 alandaki ortalama granüllü ve degranüle olmuş mast hücre sayısı. ^{aaa} $p < 0.001$ K grubuna göre, ^c $p < 0.05$ KS grubuna göre karşılaştırmalar.



Şekil 2: Tüm gruplara ait serum kortizol değerleri. ^{aaa} $p < 0.001$ K ve ^{bbb} $p < 0.001$ OT gruplarına göre ve ^{ccc} $p < 0.001$ KS grubuna göre karşılaştırmalar.



Şekil 3: Tüm gruplara ait MDA değerleri. ^{aaa} $p < 0.001$ K ve ^{bbb} $p < 0.001$ OT gruplarına göre, ^{ccc} $p < 0.001$ KS grubuna göre karşılaştırmalar.



Şekil 4: Tüm gruplara ait GSH değerleri. ^{aa} $p < 0.01$ K ve ^b $p < 0.05$ OT gruplarına göre, ^c $p < 0.05$ KS grubuna göre karşılaştırmalar.

seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildiğinden, çalışmamızda kullandığımız kaygı stres modelinin çalışan ve geçerli bir model olduğu gösterilmiştir. Stresin ağırlı bir mesane hastalığı olan İS'in patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı birçok klinik ve deneysel çalışmada gösterilmiştir (3, 4). SKS uygulanmış dişi sıçan mesane dokusuna ait ışık mikroskopik incelemelerde, lamina propriyada polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu, ürotelyum hücrelerinde hasar, GAG tabakasında düzensizlik ve granüllü ve degranüle olmuş mast hücre artışı izlenmiştir (17, 21, 22). Vakuol oluşumu, perinükleolar sisterna dilatasyonu, pleomorfik ve uniform mikrovillus oluşumu ve intersellüler sıkı bağlantılarda belirgin bir dilatasyon elektron mikroskopik seviyesindeki incelemeler ile gösterilmiştir (17). Soğuk hareketsizlik stresi uygulanan dişi sıçanlarda ürotelyum hücrelerinde dejenerasyon, mukozal mast hücre artışı ve kas tabakasındaki sinir lifi hacminde artış saptanmıştır (25). Kronik soğuk streste daha yoğun olmak üzere akut ve kronik soğuk stres ile oluşturulan erkek İS modelinde lamina propriyada nötrofil birikimi, ürotelyumda hasar ve granüllü ve degranüle olmuş mast hücre artışı tespit edilmiştir (26). Erkek sıçanlarda tekrarlanan değişik stres modellerinin uygulanmasının işeme sıklığını, histamin, miyeloperoksidaz (MPO), sinir büyüme faktörü (NGF) ve stromal hücre kökenli faktör 1'i (SDF-1) arttırmasının yanı sıra somatik hassasiyete sebep olduğu gözlenmiştir (27). Yamomota ve ark., SKS uygulanan erkek sıçanlarda İS'e bağlı artan işeme sıklığının siklooksijenaz gen-2 upregülasyon aracılığıyla olabileceğini ileri sürmüşlerdir (28). Bizim çalışmamızda ise mevcut literatür bilgisine paralel olarak, ışık mikroskopik incelemede SKS uygulanan erkek sıçan mesanelerinde ürotelyum hücrelerinde yoğun hasar, lamina propriyada polimorf nüveli lökosit artışı ve ödem, degranüle mast hücre artışı saptanmıştır. Ayrıca elektron mikroskopik seviyede sıkı bağlantıların açılması, ürotelyum hasarı ve GAG tabakasında düzensizlik izlenmiştir. İS patogenezinde önemli olan bu morfolojik kriterlerin çalışmamızda da saptanması erkek cinsteki SKS'nin İS için uygun bir stres modeli olabileceğini düşündürmektedir.

Ürotelyal disfonksiyon, İS etyopatogenezindeki önemli unsurlardan birisidir (5, 7). Mesane epitelini örten GAG tabakası ve hücreler arasındaki sıkı bağlantılar idrar içerisinde bulunan uyarıcı maddelere karşı bir bariyer görevi görmektedir ve bu alanlarda oluşan hasar hastalığın patolojisinde önemli rol oynamaktadır (9, 29, 30). Protamin sülfat uygulanarak İS oluşturulan dişi sıçanlara ait mesane dokusunun TEM düzeyindeki incelemelerinde, GAG tabakasında düzensizlik ve sıkı bağlantılarda görülen

genişlemeler RR boyaması yapılarak saptanmıştır (31). Bu bulgulara paralel olarak SKS uygulanmasıyla oluşan GAG tabakasındaki hasar ve sıkı bağlantılardaki geçirgenlik TEM düzeyinde yapılan RR boyanmasıyla tespit edilmiştir. Hem ürotelyum üzerindeki GAG tabakasındaki bozulma hem de sıkı-bağlantılardaki hasar, bu sıçanlarda gelişen belirgin mesane bariyer fonksiyon bozukluğunu ortaya koymaktadır. Sudan kaçınma stresi uygulanan dişi sıçanlarda, mesane dokusunda degranüle olmuş mast hücreleri daha fazla olmak üzere granüllü ve degranüle olmuş mast hücre sayılarında artış tespit edilmiştir (17, 21, 22). Akut immobilizasyon stresi uygulanan erkek sıçan mesane dokusunda, artmış degranüle olmuş mast hücre sayısının nörotensin reseptör antagonisti (SR48692) uygulandığında azaldığı tespit edilmiştir (32). Bizim çalışmamızda ise KS grubunda degranüle olmuş mast hücre sayısında anlamlı bir artışın izlenmesi stresin erkek sıçanlarda mast hücre aktivasyonunu arttırdığını düşündürmektedir.

Nörohipofizyel sistem dışında bazı ekstrapotalamik beyin alanlarında OT ve reseptörlerinin gösterilmesi, bu hormonun stres ile ilişkilendirilmesine neden olmuştur (10). OT hormonunun anti-stres etkisinin HPA aktivitesini baskılama yolu ile olduğu belirtilmiştir (12, 13). Ayrıca, oksitosinerjik sinir sistemi östrojen gibi dişi streoid hormonları tarafından güçlü bir şekilde kontrol edilmesine rağmen, dişi ve erkeklerde aynı oranda gelişmiştir (33, 34). OT enjeksiyonlarının dişi sıçanlarda kan kortizol seviyesini azalttığı (35), erkek sıçanlarda ise anksiyolitik etki gösterdiği ve sedasyon oluşturduğu belirtilmiştir (36). Çalışmamızda erkek sıçanlara uygulanan strese bağlı artmış kortizol seviyesinin OT tedavisi ile istatistiksel olarak azaldığı tespit edilmiştir. OT tedavisinin serum kortizol seviyesini düşürmesi nedeniyle bu hormonun stres üzerinde azaltıcı etkisi olduğu düşünülmektedir. Black ve arkadaşları, dişi sıçanlarda ağrı ve kaygı stresleri ile oluşturdukları İS modelinde, OT hormonunun mesane ağrısı üzerinde anksiyolitik ve analjezik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (15). Bizim çalışmamızda ise OT hormonunun erkek sıçanlarda İS'in sebep olduğu morfolojik ve biyokimyasal hasarlar üzerinde tedavi edici rolü gözlenmiştir.

OT hormonunun enflamasyon ve oksidatif hasar üzerindeki etkileri çeşitli çalışmalarda sorgulanmıştır. Şentürk ve arkadaşları, mesane iskemisi-reperfüzyon modeline bağlı olarak artan MDA değerinin, histopatolojik skorun, polimorf nüveli lökosit ve mast hücre sayılarının OT tedavisi ile azaldığı ve azalan GSH değerinin arttığı tespit edilmiştir (37). Bizim çalışmamızda ise SKS uygulanmasına bağlı olarak artan polimorf nüveli lökosit ve degranüle mast hücre sayısının, bütünlüğü bozulan ürotelyal hücre ve GAG tabakasının ve geçirgenliği artan sıkı bağlantıların OT

tedavisi ile belirgin olarak iyileştiği gözlenmiştir. OT hormonunun, oksidatif renal (38) ve kolonik hasar (39) ve karaciğer iskemisi reperfüzyon hasarı (40) üzerindeki koruyucu etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiş ve OT'nin sebep olduğu antioksidan etkinin özellikle nötrofiller üzerindeki inhibisyonu vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda, stres grubunda MDA artışı ve GSH düşüşü gözlenirken OT tedavi grubunda belirgin bir iyileşme tespit edilmiştir. Bu bulgular OT tedavisinin SKS'ye bağlı oluşan mesane hasarı üzerindeki antioksidan etkisini göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmamıza ait veriler erkek sıçanlarda SKS'nin sebep olduğu İS'e bağlı morfolojik ve biyokimyasal hasarın dışı sıçanlar ile benzer derecede

olduğunu göstermektedir. Ayrıca OT tedavisinin oluşan bu hasara karşı koruyucu bir etki gösterdiği gözlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarımızda OT'nin tedavi edici rolünün mekanizmasını moleküler düzeyde ortaya konması amaçlanmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından SAG -C-DRP-010710-0213 numaralı proje ile desteklenmiştir. Prof. Dr. Gülnaz Nural Bekiroğlu'na istatistik bölümünde yapmış olduğu katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

The effect of oxytocin on the urinary bladder in male rats exposed to water avoidance stress: Light and electron microscopic investigation

ABSTRACT

We aimed to study the impact of water avoidance stress (WAS) on the bladder tissue of male rats and to reveal the effect of oxytocin on the morphologic and biochemical alterations related to stress induced interstitial cystitis .

Twenty four Wistar male rats were assigned into 4 groups and each included the same number of rats (n=6): 1. Control group (C): had no intervention, 2. Oxytocin group (OXY): recieved 5µg /kg oxytocin sc. for 5 days. 3. Chronic stress group (WAS): rats underwent 2 hours daily WAS for 5 days. 4. Chronic stress+Oxytocin group (WAS+OXY): recieved subcutaneous (sc) 5µg /kg oxytocin during chronic stress. Urinary bladder tissues were examined under light and electron microscopy. Oxidative stress was evaluated by

malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels. Moreover, systemic stress was measured with serum cortisol levels.

In light microscopic analysis of WAS group, desquamation of urothelium, edema in connective tissue, increased number of polymorphonuclear leukocytes and vascular congestion were detected while a prominent healing was observed in WAS+OT group. In electron microscopy, although there were degenerated urothelium, irregularity in glycosaminoglycon layer and a prominent dilatation in intercellular tight junctions in the WAS group, reversal of the injury was detected in the WAS+OT group. Serum levels of cortisole and tissue levels of MDA and GSH were found to be well correlated with the morphological findings.

Our study revealed that WAS induced interstitial cystitis in male rats causes similar morphologic and biochemical alterations in female rats. Additionally, oxytocin exerts a protective effect against this injury.

Key words: water avoidance stress, oxytocin, male rat, urinary bladder, histochemistry,

KAYNAKLAR

1. Tilbrook AJ, Clarke IJ. Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Front Neuroendocrinol* 2006;27: 285-307.
2. Macaulay AJ, Stern RS, Holmes DM, Santon SL. Micturition and the mind: psychological factors in the aetiology and treatment of urinary symptoms in women. *BR Med J* 1987;294:540-3.
3. Baldoni F, Ercolani M, Baldaro B, Trombini G. Stressful events and psychological symptoms in patients with functional urinary disorders. *Percept Mot Skills* 1995;80: 605-6.
4. Robbins M, DeBerry J, Ness T. Chronic psychological stress enhances nociceptive processing in the urinary bladder in high-anxiety rats. *Physiol Behav* 2007;91: 544-50.
5. Toft BR, Nordling J. Recent developments of intravesical therapy of painful bladder syndrome /interstitial cystitis. *Curr Opin Urol* 2007;1: 15-20.
6. Theoharides TC, Pang X, Letourneau R, Sant GR. Ann N Y. Interstitial cystitis: a neuroimmunoendocrine disorder. *Acad Sci* 1998;840: 619-34.
7. Kelada E and Jones E. Interstitial cystitis. *Arch Gynecol Obstet* 2007;275:223-9.
8. Sant GR, Kempuraj D, Marchand JE, and Theoharides TC. The Mast Cell in Interstitial Cystitis: Role in Pathophysiology and Pathogenesis. *Urology* 2007;69: 34-40.

9. Parsons CL. The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/üretthritis. *Urology* 2007;69: 9–16.
10. Argiolas A, Gessa GL. Central Functions of Oxytocin. *Neurosci Biobehav Rev* 1991;15: 217-31.
11. Viero C, Shibuya I, Kitamura N, Verkhatsky A, Fujihara H, Kato A, Ueta Y, Zingg HH, Chvatal A, Sykova E, Dayanithi G. Oxytocin: Crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. *CNS Neurosci Ther* 2010;16: e138-56.
12. Neumann ID. Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog Brain Res* 2002;139: 147–62.
13. Yeğen BC. Oxytocin and hypothalamo-pituitaryadrenal axis. *Marmara Pharma J* 2010;14: 61-6.
14. Ivell R, Russel JA. Oxytocin, Cellular and Molecular Approaches in Medicine and Research. Plenum Press, New York. 1995, p:259-268.
15. Black LV, Ness TJ, Robbins MT. Effects of oxytocin and prolactinon stress-induced bladder hypersensitivity in female rats. *J Pain* 2009;10: 1065-72.
16. Santos J, Benjamin M, Yang PC, Prior T, Perdue MH. Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278: G847-54.
17. Cetinel S, Ercan F, Cikler E, Contuk G, Sener G. Protective effect of melatonin on water avoidance stress induced degeneration of the bladder. *J Urol* 2005;173:267-70.
18. Dixon JS, Holm-Bentzen M, Gilpin CJ, Gosling JA, Bostofte E, Hald T, Larsen S Electron microscopic investigation of the bladder urothelium and glycocalyx in patients with interstitial cystitis. *J Urol* 1986;135:621-5.
19. Beuge JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52: 302–11.
20. Beutler E. Glutathione in red blood cell metabolism. In *A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Stratton, New York, 1975; pp 112-114.
21. Sağlam B, Cikler E, Zeybek A, Cetinel S, Sener G, Ercan F. An aqueous garlic extract alleviates water avoidance stress-induced degeneration of the urinary bladder. *BJU Int* 2006;98:1250-4.
22. Zeybek A, Sağlam B, Cikler E, Cetinel S, Ercan F, Sener G. Taurine ameliorates stress- induced degeneration of the urinary bladder. *Acta Histochem* 2007;109: 208-14.
23. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 2002;53: 865-71.
24. Cakır B, Kasımay O, Kolgazi M, Ersoy Y, Ercan F, Yeğen BC. Stress-induced multiple organ damage in rats is ameliorated by the antioxidant and anxiolytic effects of regular exercise. *Cell Biochem Funct* 2010;28: 469-79.
25. Ercan F, Cetinel S, Erin N, Aydın H, Hürdağ C, Parker T, Parker K, Mayhew T. Volume of nerve fibers in the stress-induced bladder of adult rats following capsaicin treatment. *Urol Int* 2003;71: 393-8.
26. Demir A, Onol FF, Ercan F, Tarcan T. Effect of cold-induced stress on rat bladder tissue contractility and histomorphology. *Neurourol Urodyn* 2007;26: 296-301.
27. Merrill L, Malley S, Vizzard MA. Repeated variate stress in male rats induces increased voiding frequency, somatic sensitivity, and urinary bladder nerve growth factor expression *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013;305: R147-56.
28. Yamamoto Y, Takao T, Nakayama J, Kiuchi H, Okuda H, Fukuhara S, Yoshioka I, Matsuoka Y, Miyagawa Y, Tsujimura A, Nonomura N. Water avoidance stress induces frequency through cyclooxygenase-2 expression: A bladder rat model. *Int J Urol* 2012;19: 155-62.
29. Southgate J, Varley CL, Garthwaite MA, Hinley J, Marsh F, Stahlschmidt J, Trejdosiewicz LK, Eardley I. Differentiation potential of urothelium from patients with benign bladder dysfunction. *BJU Int* 2007;99: 1506-16.
30. Parsons CL, Lilly JD, Stein P. Epithelial dysfunction in nonbacterial cystitis (interstitial cystitis). *J Urol* 1991;145:732-5.
31. Cetinel S, Canilloğlu YE, Cikler E, Sener G, Ercan F. Leukotriene D4 receptor antagonist montelukast alleviates protamine sulphate induced changes in rat urinary bladder. *BJU Int* 2010;107: 1320-5.
32. Alexacos N, Pang X, Boucher W, Cochrane DE, Sant GR, Theoharides TC. Neurotensin mediates rat bladder mast cell degranulation triggered by acute psychological stress. *Urology* 1999;53: 1035-40.
33. Petersson M, Lundeberg T, Uvnäs-Moberg K. Oxytocin enhances the effects of clonidine on blood pressure and locomotor activity in rats. *J Auton Nerv Syst* 1999;78: 49-56.
34. Yamaguchi K, Akaishi T, Negoro H. Effect of estrogen treatment on plasma oxytocin and vasopressin in ovariectomized rats. *Endocrinol Jpn* 1979;26: 197-205.
35. Uvnäs-Moberg K. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinology* 1998;23: 819–35.
36. Uvnäs-Moberg K, Ahlenius S, Hillegaard V, Alster P. High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49: 101–6.
37. Erkanli Senturk G, Erkanli K, Aydın U, Yucel D, Isiksacan N, Ercan F, Arbak S. The protective effect of oxytocin on ischemia/reperfusion injury in rat urinary bladder. *Peptides* 2013;40: 82-8.
38. Bıyıklı NK, Tuğtepe H, Sener G, Veliöğlü-Oğünç A, Cetinel S, Midillioğlu S, Gedik N, Yeğen BC. Oxytocin alleviates oxidative renal injury in pyelonephritic rats via a neutrophil-dependent mechanism. *Peptides* 2006;27: 2249-57.
39. Işeri SO, Sener G, Sağlam B, Gedik N, Ercan F, Yeğen BC. Oxytocin ameliorates oxidative colonic inflammation by a neutrophil-dependent mechanism. *Peptides* 2005;26: 483-91.
40. Düşünceli F, Işeri SO, Ercan F, Gedik N, Yeğen C, Yeğen BC. Oxytocin alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Peptides* 2008;29: 1216-22.