



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MESANE AĞRI SENDROMU/İNTERSİTİYEL SİSTİT HAYVAN
MODELLERİNDE P2X3 RESEPTÖR DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE
P2X3 EKSPRESYONU İLE AĞRI-DAVRANIŞ İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

DR. İBRAHİM ERKUT AVCI

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MESANE AĞRI SENDROMU/İNTERSİTİSYEL SİSTİT HAYVAN
MODELLERİNDE P2X3 RESEPTÖR DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE
P2X3 EKSPRESYONU İLE AĞRI-DAVRANIŞ İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

DR. İBRAHİM ERKUT AVCI

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. CÜNEYD ÖZKÜRKÇÜGİL
ETİK KURUL PROJE NO: KOÜ HADYEK 5/1-2021

2022

İÇİNDEKİLER	Sayfa
TEŞEKKÜR	1
KISALTMALAR DİZELGESİ	2
ÇİZELGELER DİZELGESİ	4
ÇİZİMLER DİZELGESİ	5
GİRİŞ VE AMAÇ	6
GENEL BİLGİLER	10
GEREÇ VE YÖNTEM	44
BULGULAR	58
TARTIŞMA	72
SONUÇ VE ÖNERİLER	80
TÜRKÇE ÖZET	81
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	83
KAYNAKÇA	85

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin her aşamasında her türlü desteği esirgemedi sunan, her türlü zorluğu aşmamda bana güç veren, gelişimimi her yönüyle destekleyen, ilk günden itibaren bana özgüven aşılayan, akademik anlamda kıymetli fikirleriyle bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Cüneyd Özkürkçügil' e yürekten teşekkür ederim. Ayrıca, uzmanlık eğitimi ile birlikte tezimin her aşamasında bana destek olan Doç. Dr. Kerem Teke'ye minnettarlığımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca iyi bir hekim olmam için emeği geçen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, mesleki ve sosyal ufkumun gelişmesinde büyük payları olan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Nazım Mutlu, Prof. Dr. Özdal Dillioğlugil, Prof. Dr. Mustafa Melih Çulha, Doç. Dr. Önder Kara, Doç. Dr. Hasan Yılmaz ve Dr. Öğr. Üyesi Seyfettin Çiftçi' ye sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan onur duyduğum araştırma görevlisi arkadaşlarıma, ayrıca birlikte çalıştığım tüm hemşire ve klinik personeli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın oluşumundaki katkı ve yardımları için Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Murat Kasap ve Prof. Dr. Gürler Akpınar, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Tijen Utkan ve Prof. Dr. Semil Selcen Göçmez, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Büşra Yaprak Bayrak'a sonsuz saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

İzole in vitro doku deneylerinin gerçekleştirilmesinde büyük emeği geçen Arş. Gör. Gülşen Çelebi' ye, Western Blot deneylerinde katkıları için Arş. Gör. Mehmet Sarıhan' a, deneyler sırasında bana yardımcı olan araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. İsa Uluç, Dr. Anıl Dağıdır, Dr. Abdulkadir Bacak ve İbragim Kaldarov' a teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık tez çalışmamı TTU-2021-2689 no'lu araştırma projesi kapsamında maddi açıdan destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca proje kapsamında kullanılacak malzemelerin temininde maddi destek sağlayan AYMED İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti'ne teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bu günlere gelmemde emeğini ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme ve tanıştığımız günden beri her zaman yanımda olan, bana sevgi ve desteği ile güç veren sevgili eşim Dr. İpek İzgin Avcı' ya sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

KISALTMALAR

AAM= Aşırı Aktif Mesane
ACh= Asetilkolin
APF= Anti Proliferatif Faktör
ASIC= Asit Duyarlı İyon Kanalları
ATP= Adenozin trifosfat
AUA= Amerikan Üroloji Derneği
AÜSS= Alt Üriner Sistem Semptomları
BDNF= Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
CGRP= Kalsitonin Gen İlişkili Peptit
CRH= Kortikotropin Salgılatıcı Hormon
CUA= Kanada Üroloji Derneği
CYP= Siklofosfamid
DAA= Detrusor Aşırı Aktivitesi
DETAB= Deneysel Tıp Araştırma Birimi
DKG= Dorsal Kök Ganglionları
DMSO= Dimetil Sülfoksit
EAU= Avrupa Üroloji Derneği
EAU= Elektriksel Alan Uyarısı
ECL= Elektrokemilüminesans
ESSIC= Avrupa İnterstisyel Sistit Çalışma Grubu
EYS= Erken Yaşam Stresi
FDA= *Food and Drug Administration*
GAG= Glikozaminoglikan
GAPDH= Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
H&E= Hematoksilen-Eozin
HGS= Hipogastrik Sinir
HHA= Hipotalamik hipofiz adrenokortikal
ICI= Uluslararası İnkontinans Konsültasyonu
i.p.= İntraperitoneal
İBS= İrritabl Bağırsak Sendromu
İS/MAS= İnterstisyel Sistit/Mesane Ağrı Sendromu

KMS= Sodyum Karboksimetil Selüloz

LPS= Lipopolisakkarit

MAPP-CPP= Kronik Pelvik Ağrı Çalışmasında Multidisipliner Yaklaşım

MSS= Merkezi Sinir Sistemi

NGF= Sinir Büyüme Faktörü

NIDDK= Ulusal Diyabet, Sindirim ve Böbrek Hastalıkları Enstitüsü

NO= Nitrik Oksit

PAG= Periakvaduktal Gri

PDT= Potasyum Duyarlılık Testi

PPS= Pentosan Polisülfat Sodyum

SDS-PAGE= Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SPSS= *Statistical Package for Social Sciences*

TBS-T= Tris tamponu-Tween 20

TNBS= 2,4,6-Trinitrobenzen Sülfonik Asit

Trk= Tirozin Reseptör Kinaz

TRP= Geçici Reseptör Potansiyeli Kanalı

TRPA1= Geçici Reseptör Potansiyeli Ankinin Reseptör-1

TRPV1= Geçici Reseptör Potansiyeli Vanilloid Reseptör-1

TRPV4= Geçici Reseptör Potansiyeli Vanilloid Reseptör-4

TTX= Tetrodotoksin

UPOINT= *Urinary, Psychosocial, Organ specific, Inflammation, Neurological/Systemic, Tenderness*

WAS= Sudan Kaçınma Stresi

WB= *Western Blot*

ÇİZELGELER DİZELGESİ (TABLOLAR LİSTESİ)

	Sayfa
Tablo 2.1. Kanada Üroloji Derneği (<i>CUA</i>) rehberinin önerdiği <i>UPOINT</i> fenotiplendirme sistemine göre çeşitli tedavi yaklaşımları.	15
Tablo 2.2. Sistoskopik bulgulara göre Avrupa İnterstisyel Sistit Çalışma Grubu (<i>ESSIC</i>) sınıflandırması.	16
Tablo 2.3. Avrupa Üroloji Derneği (<i>EAU</i> , 2021) güçlü öneri düzeyli tedavi tavsiyeleri.	21
Tablo 2.4. Amerikan Üroloji Derneği (<i>AUA</i> , 2015) İS/MAS Tedavi Rehberi.	22
Tablo 3.1. Histolojik skora ölçütleri.	55
Tablo 4.1. Grupların deney sonunda ağırlık değişimleri ve mesane ağırlıkları.	58
Tablo 4.2. Açık Alan Testi ve Lokomotor Aktivite sonuçları.	59
Tablo 4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Test sonuçları.	60
Tablo 4.4. Sıcak Plaka ve Kuyruk Çekme Test sonuçları.	61
Tablo 4.5. KCl kasılma yanıtları.	62
Tablo 4.6. Papaverin gevşeme yanıtları.	62
Tablo 4.7. Gruplara ait histolojik skor sonuçları.	67
Tablo 4.8. <i>Western Blot</i> analiz sonuçları.	69

ÇİZİMLER DİZELGESİ (ŞEKİLLER LİSTESİ)

	Sayfa
Şekil 2.1. Alt üriner sistemin efferent yolları.	23
Şekil 2.2. Kontinans ve işeme reflekslerini kontrol eden sinir devreleri.	24
Şekil 2.3. Ürotelyum ilişkili duysal ağ.	26
Şekil 2.4. Ürotelyal yolların özeti.	27
Şekil 2.5. Pürinerjik mekanik duysal transdüksiyonun kuramsal modeli ve TRP kanallarının alt üriner sistem ile ilişkisi.	28
Şekil 2.6. Kronik psikolojik stres kaynaklı alt üriner sistem disfonksiyonu ve altında yatan olası mekanizmaların özeti.	33
Şekil 3.1. P2X3 reseptör antagonisti AF219'un (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, ABD) oral gavaj olarak uygulanması.	45
Şekil 3.2. Sudan Kaçınma Stres (WAS) Protokolü.	46
Şekil 3.3. Lokomotor Aktivite izleme sistemi (May AMS 9701, Commat Ltd., Ankara, Türkiye).	47
Şekil 3.4. Açık Alan Testi.	47
Şekil 3.5. EthoVision XT 11.5 yazılımı (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, ABD).	48
Şekil 3.6. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi keşif bölgeleri.	48
Şekil 3.7. Kuyruk Çekme Test düzeneği (May TF 211-C1, Commat Ltd., Ankara, Türkiye).	49
Şekil 3.8. Kuyruk Çekme Testi.	49
Şekil 3.9. Sıcak Plaka Test Platformu (May AHP 9601, Commat Ltd., Ankara, Türkiye).	50
Şekil 3.10. Sıcak Plaka Testinde sıçan davranışları.	51
Şekil 3.11. Abdominal insizyon ile mesanenin ortaya konması.	51
Şekil 3.12. Mesane dokusunun deneylere hazırlanması.	52
Şekil 3.13. Kocaeli Üniversitesi DETAB - İzole Organ Deney Laboratuvarı. Doku banyosu modüllerine ait görüntü.	53
Şekil 4.1. Sıcak Plaka Testi - Arka Pati Kaldırma (Değişim %) grafikleri.	61
Şekil 4.2. KCl ve Karbakol kasılma yanıt grafikleri.	63
Şekil 4.3. ATP kasılma yanıt grafikleri.	64
Şekil 4.4. Elektriksel Alan Uyarısı yanıt grafikleri.	65
Şekil 4.5. Mesane dokularının makroskopik görüntüsü.	66
Şekil 4.6. Mesane dokularının histopatolojik incelemeye ait mikroskopik görüntüleri, (H&Ex200).	67
Şekil 4.7. Gruplara ait histoloji skorları ve mesane vücut ağırlık oranı (%) ait grafik görüntüleri.	68
Şekil 4.8. P2X3 ve P2X7 pürinerjik reseptör proteinlerin WB analizine ait grafik ve membran bant görüntüleri.	70
Şekil 4.9. Trk-A ve TRPV1 reseptör proteinlerinin WB analizine ait grafik ve membran bant görüntüleri.	71

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Klinik çalışmalar İnterstitiyel Sistit/Mesane Ağrı Sendrom'lu (İS/MAS) hastaların, sağlıklı deneklere göre daha düşük sistometrik hacimlerde mesane dolgunluk hissi, sıkışma hissi ve ağrı algıladığını ortaya koymaktadır.¹ Dolayısıyla bu gözlemler, İS/MAS altında yatan mekanizmalarda temel bir unsur olarak fizyolojik uyaranlara karşı mesane afferent yollarının duyarlılığını işaret etmektedir.^{2,3} Ayrıca İS/MAS hastalarının depresyon ve anksiyete komorbiditesinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve yüksek psikolojik stres seviyeleri ile mesane semptomlarının alevlenmesinin korele olduğu tespit edilmiştir.⁴⁻⁶ Bu nedenle, afferent sinyalin artan yoğunluğunun yanında duygusal afektif durumun modülasyonu da mesane hissi üzerinde güçlü etkilere sahip olabilmektedir. İS/MAS gelişimi temelindeki anahtar kavram, periferik veya merkezi sinir sisteminde, yapısal, sinaptik veya intrinsik değişiklikleri içeren ve bu duyu yollarındaki değişikliklerin aynı zamanda düzenleyicisi olan nöronal ağların kronik duyarlılığıdır.^{7,8}

İS/MAS'ın patofizyolojisini daha iyi anlamak için birçok deneysel hayvan modeli üzerinde çalışılmıştır. Mevcut modellerin çoğunda, intravezikal veya sistemik uygulamalar ile mesanede İS/MAS özellikleri taklit edilmeye çalışılmıştır. Mesane merkezli hayvan modelleri, çeşitli şekillerde indüklenen (Lipopolisakkarit [LPS], Siklofosamid [CYP] gibi) kronik inflamasyon ile ilişkili mesane yapılarındaki patolojik değişiklikleri ve altta yatan mekanizmaları aydınlatmak için önemlidir. Ancak bu modeller İS/MAS hastalarının spesifik epidemiyolojik bulgularını taklit edememekte veya kronik stresin semptom şiddeti üzerindeki bilinen etkisini açıklayamamaktadır. Hastalığının tüm yönlerinin tek bir model tarafından taklit edilemeyeceği açıktır. Her biri bulmacanın bir parçasına katkıda bulunmaktadır. İS/MAS'ın patofizyolojisini anlamak, prognostik faktörleri ve tedavi hedeflerini belirlemek için birden fazla model gereklidir.⁹

Adenozin trifosfat'ın (ATP) parakrin haberleşmeye aracılık ettiği ve alt üriner sistem fizyolojisinde önemli bir rolü olduğu artık iyi bilinmektedir.^{10,11} Mesanenin gerilmesi üzerine ürotelyum ve diğer mukozal hücrelerden salınan ATP, mesane dolumunun lokal olarak algılanmasında duyuşal iletim sisteminin bir bileşeni olarak aracılık eder.¹² ATP'nin topikal olarak uygulandığı çalışmalarda, afferent nöronların sinyalizasyonunu arttırdığı ve algojenik olduğu, yani hücre dışı ATP'nin duyuşal ve nosiseptif bir mediatör olarak görev gördüğü kavramı ortaya çıkmıştır.¹³ Epitelyal hücreler tarafından salınan ATP, doğal ligandı olan iyonotropik P2X3 ve heterotipik P2X2/3 pürinoseptörleri üzerinden hücre içi

Ca²⁺ artışına neden olmaktadır. Bu reseptörlerin duyu nöronları üzerinde gösterilmesi ile ATP'nin hangi mekanizma ile nöral yanıtlara neden olduğu açıklığa kavuşturulabilmiştir.^{14,15}

Kronik mesane inflamasyonunun, hayvan modellerinde ürotelyumdan ATP salınımını ve mesane afferentlerinde pürinerjik sinyalizasyonu^{16,17}, İS/MAS'lı hastalarda ise ürotelyumda hem gerilme aracılı ATP salınımını hem de P2X3 reseptör ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir.^{18,19} Preklinik çalışmalarda muskarinik reseptör aracılı asetilkolinin (ACh), ürotelyal hücrelerden Nitrik Oksit (NO) ve prostanooidlerin yanı sıra ATP salınımını da tetiklediği bilinmektedir.^{20,21} P2X3 ve P2X2/3 reseptörleri sinir terminallerinde, omurilik, beyin ve dorsal kök gangliyonları (DKG) nöronlarında bulunur. Çok sayıda çalışma, birincil duysal nöronlarda ifade edilen P2X3 ve P2X2/3 reseptörlerinin aktivasyonunun kemirgenlerde akut nosiseptif davranışa, hiperaljeziye ve allodiniye katkıda bulunduğunu göstermiştir.²²⁻²⁴ Hasarlı cilt hücreleri tarafından üretilen sitozolik ATP salınımındaki artış, DKG nöronlarında P2X3 reseptörü aracılı tepkileri uyandırabilmektedir.²⁵ P2X2 ve P2X2/3 reseptörleri nakavt farelerden alınan nöronların işlevsel analizi, ATP'ye minimum yanıt vermiş veya hiç yanıt vermemiştir. Bu veriler, duysal ve otonomik ganglion nöronları üzerindeki P2X reseptörlerinin neredeyse sadece P2X2 ve P2X3 reseptör alt birimlerini içerdiğini göstermektedir.^{26,27}

Duysal liflerin spontan aktivitesine ve patolojik aşırı duyarlılığa katkıda bulunan inflamatuvar araçlar, ATP reseptörleri dahil olmak üzere nosiseptörlerin ve iyon kanallarının nöronal ekspresyonunu etkiler.²⁸ Nöropatik ağrı, sinir hasarı, diabetes mellitus, herpes enfeksiyonları veya kanserden sonra gelişebilir ve şiddetli allodini ile karakterizedir. Bu ağrı türü genellikle, nonsteroid antiinflamatuvar ve opioidler gibi tipik ağrı tedavisinde kullanılan ilaçlara dirençlidir. ATP'nin, neredeyse tamamı nosiseptif nöronlarda eksprese edilen P2X3 veya P2X2/3 reseptörleri aktive ederek duysal sinir uçlarını uyardığı iyi bilinmektedir.²⁹ Ayrıca bu reseptörlerin trigeminal gangliyon nöronlarında eksprese edilmeleri migren ve baş ağrısı sürecinin de bir parçası olduklarını göstermiştir.³⁰ Bu nedenlerle, P2X3 ve P2X2/3 reseptör antagonistleri, bir dizi ağrı modelinde, mesane bozukluklarında ve gastrointestinal hastalıklarda potansiyel ilaçlar olarak faydalı olmaktadır.

Doğal ligand ATP'nin modifikasyonu, güçlü fakat seçici olmayan P2X3 reseptör antagonisti TNP-ATP'nin keşfedilmesine yol açmıştır. A-317491 ilk yarışmacı ve seçici

P2X3 reseptör antagonistidir.³¹ Bununla birlikte, polar yapısı nedeniyle zayıf oral biyoyararlanım göstermektedir. Merkezi sinir sistemi (MSS) geçişi de düşüktür. Ardından, diaminopirimidin türevlerinden “Roche” ve “Merck” tarafından oral yararlanımı yüksek ve P2X3 reseptörü için çok seçici bir allosterik antagonist olan AF219 molekülü geliştirilmiştir. P2X3 reseptörlerinin kronik öksürüğe neden olan öksürük refleks duyarlılığında rolü ortaya konmuş, AF219 molekülünün ise etkinliği araştırılmıştır. AF219 molekülünün Japonya tarafından kronik öksürüğü olan hastalar üzerinde kullanımına izin verilirken, FDA (*Food and Drug Administration*) etkinlik ölçümünde ek veriler talep etmiş, “Merck” firması ise en kısa sürede yeni araştırma verilerinin FDA ile paylaşılacağını duyurmuştur.³²

Ağrı ve kronik öksürük üzerine yapılan araştırmalar yanında İS/MAS’da pürinerjik yolağın hedeflendiği araştırmalar da olmuştur. P2X3 reseptör antagonisti olarak ilk nesil moleküllerin kullanıldığı prelinik çalışmalar ile umut vadeden sonuçlar ortaya korsa da bu moleküllerin oral biyoyararlanımının düşük olması İS/MAS tedavisi için yapılan klinik araştırmalarda tercih edilmemesine sebep olmuştur. AF219’un oral biyoyararlanımının yüksek olması, kronik öksürük ve ağrı üzerine prelinik araştırmaların klinik araştırmalar olarak devamlılığını sağlamıştır. Diğer yandan bu araştırma sonuçlarındaki umut vadeden sonuçlar kanıt gösterilerek İS/MAS hastalarında denenmek üzere klinik araştırma onayı alınmıştır. Araştırmacıların İS/MAS’lı hastaların ağrı skorlarında anlamlı düşüş gösteren 2015 yılına ait araştırma sonucu bir bildiri özeti olarak Uluslararası Kontinans Derneği kongresinde (ICS, 2015, Montreal, Kanada) sunulmuştur. Ancak bu çalışmaya ait yayınlanmış bir bilimsel makale bulunmamakla birlikte sonraki yıllarda AF219’un etkinliğini değerlendiren başka bir klinik araştırma da olmamıştır.³³

Bu çalışmada, etiopatolojiyi daha iyi anlayabilmek ve tedavide yeni hedefler belirlemek amacıyla doğrudan mesane epitelinde hasar yapılarak oluşturulan CYP-İS/MAS modelinin yanında, stres ile oluşturulan WAS-İS/MAS modeli de kullanılmıştır. Ayrıca bu tez çalışmasında mesanede daha önce ürotelyum ve duyu nöronları üstünde tanımlanmış P2X3 reseptör ekspresyon düzeyleri, mesane fonksiyonu ve hayvanların nosiseptif tepkilerindeki değişiklikler araştırıldı. Son yıllarda inflamasyon ve ağrı üzerine yapılan araştırmalarda pürinerjik yolların önemi ortaya konmuştur. Kanseri ağrısı ve migren üzerine, pürinerjik ağrı yolağını hedefleyen ilaç tedavilerinin etkinliği daha önce kanıtlanmıştır.³² Ancak herhangi bir prelinik İS/MAS modelinde, mesane epitelinde

oldukça yaygın bulunan P2X3 reseptörünün seçici antagonisti olan AF219 daha önce kullanılmamıştır. Bu çalışmada, AF219, hem CYP- hem de WAS-İS/MAS modellerinde kullanılmış, daha önceki bir osteoartrit ağrı modeli ile aynı doz ve yöntem uygulanmıştır. ³⁴ Yeni nesil bu ilacın tedavi dozunda etkinliği, iki farklı deneysel İS/MAS modelinde ilk kez bu prelinik çalışmada ele alınmıştır. Elde edilen sonuçlar hem patofizyoloji hem de tedavi için bizlere önemli ipuçları vermektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnterstisyel Sistit / Mesane Ağrı Sendromu

İnterstisyel Sistit/Mesane Ağrı Sendromu (İS/MAS) 19. yüzyıldan beri bilinen ancak patofizyolojisinde karanlık noktalar bulunan mesanenin non-bakteriyel inflamatuvar bir hastalığıdır. Ayrıca İS, ilk kez Skene (1887) tarafından tanımlanmıştır. Tedaviye dirençli, kırmızı kanamalı alanlar (Hunner lezyonu), 1915 yılında Hunner tarafından tarif edilmiştir.³⁵ İS/MAS kronik pelvik ağrısı sendromları arasında değerlendirilmektedir ancak terminolojik tanımı için görüş birliği bulunmamaktadır.³⁶ İS/MAS dışında, ağrılı mesane sendromu (AMS), interstisyel sistit (İS) ve AMS/İS gibi tanımlar dikkati çekmektedir. Son yıllarda İS/MAS, mesane ile ilişkili ağrı, basınç ve rahatsızlık hissi başta olmak üzere en az bir idrar şikayeti (gece ya da gündüz sık idrara çıkma gibi) olması durumu olarak tanımlanmıştır.³⁷ Kesin tanımı ulusal ve uluslararası kılavuzlar arasında farklılık gösterse de genellikle baskı veya rahatsızlık olarak tanımlanan ağrı, ayırt edici semptom olmaya devam etmektedir.

2.1.1. Epidemiyoloji ve Prevalans

Kadınlarda prevalans 18,1/100.000 olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte her iki cinsten görülen prevalans 10,6/100.000'dir.³⁸ Olguların %10'u erkektir, 18 yaş üstü kadınlarda prevalans %2,7-6,5 arasında bulunmuştur.³⁹ Son çalışmalarda, prevalans %0,06-30 aralığındadır. Hastalık, çocukluk çağında çok nadir görülmektedir. Yaşam kalitesi çalışmaları hastaların normal popülasyona oranla 6 kat daha fazla sağlık problemiyle karşılaştıklarını göstermektedir. Ayrıca, kadınlarda 10 kat daha fazla yatkınlık olmasına rağmen cinsiyet ve ırksal farklılık görülmemektedir.⁴⁰

2.1.2. Birlikte Görülen Hastalıklar

İS/MAS'lı hastalarda en sık görülen bir diğer problem alerjidir (>%40). İrritabl bağırsak sendromu (İBS, %30), fibromiyalji, kronik yorgunluk sendromu, vulvodini, panik, migren, temporomandibular eklem hastalığı ve astım da bu hastalarda sık görülmektedir. İS/MAS ile sistemik lupus eritematozus, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, fokal vulvitis ve sjögren sendromuyla arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur.³⁷ Kadın hastalarda disparoni, cinsel istek ve orgazm sayısında azalma gibi seksüel disfonksiyon da görülebilir.⁴¹ Premalign kabul edilmemektedir ve diabetes mellitus ile arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir.

2.1.3. Etiyoloji

İS/MAS, multifaktöriyel etiyojisi olan bir semptom kompleksidir. Patogenez hakkında birçok kuram olmasına rağmen klinik pratikte kanıtlanan çok az bilgi vardır. Altta yatan mekanizmalardan ayrıca bahsedilecektir.

2.1.4. Patoloji

İS/MAS teşhisinde patolojinin yeri, diğer muhtemel tanıların dışlanmasıdır. Karsinom, *karsinoma in situ*, eozinofilik sistit, tüberküloz sistiti ve diğer spesifik doku teşhisiyle birlikte olan durumlar mutlaka dışlanmalıdır.

İS/MAS'ın patolojik bulguları sabit değildir, yapılan biyopsilerde çok fazla varyasyonlar gözlenebilirken, zaman içinde aynı hastadan alınan biyopsi örneklerinde bile değişiklikler tespit edilmiştir. Her ne kadar detrusor/mukoza mast hücre oranı ve sinir lifi proliferasyonu ile algoritma oluşturulmaya çalışılsa da mast hücre sayısının ayırıcı tanıda yeri yoktur. Hunner lezyonu olan olgularda şiddetli inflamasyonun eşlik ettiği ürotelyal erozyon gösterilmiştir ⁴². Çalışmalarda İS/MAS'lı hastalarda şiddetli epitelyal bozulma, ülserasyon ve submukozal enflamasyon olsa da bu bulguların hiç birisi patognomik değildir ³⁵.

2.1.5. Tanı

Avrupa Üroloji Derneği (EAU) tedavi kılavuzuna göre İS/MAS tanısı için, diğer patolojilerin dışlanması ile suprapubik ağrı (basınç veya rahatsızlık hissi), birlikte gece-gündüz idrar sıklığında artıştan en az biri ve sistoskopik inceleme ile konmaktadır (hidrodistansiyon ve biyopsi). Diğer rehberlerden Uluslararası İnkontinans Konsültasyonu (ICT), İS/MAS tanısı için invaziv girişimlere gerek olmadan klinik olarak tanı konabileceğini vurgulasa da mesane patolojilerinin görüntülenmesi ve gerekirse biyopsi açısından sistoskopi yapılmasını önermektedir. İS/MAS için, tüm rehberler tam hikaye alınmasını, fizik muayeneyi ve laboratuvar testlerini tanıya yardımcı olmak ve pelvik ağrı yapacak diğer spesifik patolojileri dışlamak amacıyla önermektedir. ³⁷

2.1.5.1. Öykü

EAU rehberi pelvik bölgedeki organların fonksiyonu ile ilgili öykü almanın önemini vurgularken, sistematik değerlendirmeyi de (bilişsel, davranışsal, seksüel ve duygusal) önermektedir. Hastaların çoğunda, mesanenin depolama fazında suprapubik ya da pelvik ağrı mevcuttur, ağrının işemeyle azalması tipik olup sıkışma hissi ve sık idrara çıkma eşlik eden diğer belirtilerdir. İdrar kaçırma sık görülmez ancak derin penetrasyonda disparoni sıktır. Kadın hastalarda disparoni, cinsel istek ve orgazm sayısında azalma gibi seksüel

disfonksiyon görülebilir. Bu semptomların ortalama belirti süresi 3 ile 4 yıldır. Endometriyozis ve aşırı aktif mesane (AAM), İS/MAS ile karışan iki farklı patolojidir. Semptomlar AAM’de menstrüasyondan önce belirginken, endometriyoziste menstrüasyon döneminde şiddetlenir. Amerikan Üroloji Derneği (AUA) rehberi şikayetlerin en az 6 hafta olmasını ve menstrüasyonla ilişkisinin araştırılmasını önermektedir. Pelvik ağrı, İS/MAS’da AAM’ye göre daha sık görülür. Ancak idrar kaçırma olgularında öncelikle AAM akla gelmelidir. Çikolata, turuncgiller, alkollü ve kafeinli içecekler, potasyumdan zengin gıdalar şikayetleri artırmaktadır.³⁷

2.1.5.2. Fizik Muayene

Hastalarda sıkıntılı, depresif görünüm vardır. Pelvis, üretra, skrotum ya da penis üzerinde ağrılı hassas noktalar mevcuttur. Pelvik taban bölgesindeki, hassas ve tetik noktaların belirlenmesi tanı ve tedavi için yardımcı olabilir. Ağrı nedeniyle pelvik inceleme yapmak çoğu kez mümkün olamayabilir.³⁷

2.1.5.3 İşeme Günlüğü

İS/MAS’lı hastalar, asemptomatik hastalara göre daha az işeme hacimlerine ve daha fazla işeme sıklığına sahiptir. Bu nedenle ilk değerlendirmede işeme günlüğü önerilmelidir. AUA en az bir günlük işeme günlüğünü yeterli bulurken, Avrupa İnterstisyel Sistit Çalışma Grubu (ESSIC) üç günlük işeme çizelgesini önermektedir.³⁷

2.1.5.4 Sorgu Formları

Semptom sorgulama formları hastaların değerlendirmesinde ve takibinde faydalı olabilir. Başlangıç değerlendirmesinde ve takipte birçok rehber tarafından *O’Leary Sant* Semptom İnterstisyel Sistit Semptom ve Problem indeksi kullanılmaktadır.^{37,43,44} Ayrıca ESSIC tarafından vizüel ağrı skalası da önerilmektedir.

2.1.5.5 Laboratuvar

Tüm rehberler üriner enfeksiyonun dışlanması için idrar analizi ve idrar kültür testinin yapılmasını önermektedir. Ayrıca, steril piyüri varsa tüberküloz kültürü yapılması tavsiye edilmektedir. Yine steril piyürisi olan kadınlarda, Kadın Doğum Uzmanları Koleji (RCOG), ESSIC ve Kanada Üroloji Derneği (CUA) tarafından *Chlamydia* ve *Üreaplazma* kültürlerinin araştırılmasını uygun görmektedir. Ayrıca ürotelyal malignite açısından yüksek risk taşıyan hastalar için üriner sitoloji bakılması tüm kılavuzlar tarafından önerilmektedir.³⁷

Anti Proliferatif Faktör (APF) 2001 yılında biyobelirteç olarak değerlendirilmiş,

duyarlılığı %94 ve özgüllüğü %95 olarak bulunmuştur.⁴⁵ Bununla birlikte, çok merkezli geniş prospektif çalışmalarda klinik anlamı tespit edilememiştir. Ayrıca epidermal büyüme faktörü de (duyarlılık%87, özgüllük %91) biyobelirteç olarak çalışılmış olsa da⁴⁵, günümüzde hala pratikte kullanılan bir tanısal belirteç bulunmamaktadır.⁴⁶ Bir glikoprotein olan GP51⁴⁷, lökotrien E4, eozinofilik protein X, glikozaminoglikan (GAG), HB-EGF, EGF, NO, cGMP ve IL-6⁴⁸ gibi belirteçler ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Ancak hiçbirisi rutin uygulamaya girecek kadar önem kazanmamıştır.

2.1.5.6. Potasyum Duyarlılık Testi (Parsan Testi, PDT)

İlk defa Parsan tarafından tanımlanan bu test ile anormal üroepitelyal permeabilitenin potasyum iyonlarının epitelyuma geçişine izin vererek ağrıya sebep olduğu düşünülmektedir. Hastada ağrı ya da sıkışma hissi olduğunda, hastadan bu şikayetine 0 ile 5 arasında bir puan vermesi istenir. İki puanın üstü pozitif kabul edilir.⁴⁹ Testin prostatit, üretral sendrom ya da bazı jinekolojik problemi olan hastalarda da pozitif çıkması İS/MAS tanısı için önemini azaltmaktadır. Ayrıca, şiddetli sıkışma hissi ve uzun süreli mesane spazmı oluşabilmektedir. Bu yan etkiler, rutin kullanımını kısıtlamaktadır.⁵⁰ ICI tarafından geçerli bir tanısal test olarak düşünülmesine de, ESSIC tarafından isteğe bağlı bir tanı aracı olarak belirtilmiştir.³⁷

2.1.5.7. Pelvik Görüntüleme

İS/MAS tanısını koyabilmek için, pelvik ağrı yapabilecek diğer sebeplerin ortadan kaldırılması için önerilmektedir. Bu nedenle klinik şüphe halinde pelvik görüntüleme yapılabilir.

2.1.5.8. Ürodinami

İS/MAS tanısal değerlendirilmesinde ürodinamik inceleme rehberler tarafından önerilmemektedir.³⁷ Olguların bir kısmında ilk duyum hissi 125 ml'nin altında olup mesane kapasitesi 300ml'yi aşmaz, ayrıca detrusor aşırı aktivitesi (DAA) tespit edilebilmektedir.⁴⁴ Rezidüel idrar hacmi yüksek, belirgin idrar kaçırma ya da işeme güçlüğü olan ya da tedaviye cevap vermeyen olgularda ürodinamik çalışma önerilmektedir.³⁷

2.1.5.9. Sistoskopi

Tanı için zorunlu değildir. Özellikle, ayırıcı tanıda (hematüri, *karsinoma in situ*, inkontinans cerrahisi sonrası mesh erozyonu, yabancı cisim vb.) faydalı bilgiler verir. EAU, ESSIC ve CUA rehberleri başlangıç değerlendirme için sistoskopiye önerirken, AUA

ve ICI sistoskopiye opsiyonel olarak bırakmıştır. ESSIC ölçütlerine göre İS/MAS'lı hastalarda subtiplendirme için sistoskopi gerekmektedir. Ayrıca, genel ya da spinal/epidural anestezi esnasında yapılan hidrodistansiyonda glomerülasyon ya da Hunner lezyonu görülmesi tanıyı güçlendirmektedir.^{51,52} Hunner lezyonu, gerçek bir ülser değildir ve lokalize kırmızı alanlar olarak görülür (%6-8), bu nedenle ülser yerine lezyon tanımının kullanılması benimsenmiştir. Hunner lezyonu, mesane distansiyonu ile provoke edilen mukozadan submukozaya doğru uzanan derin rüptürlerin olduğu inflamatuvar yapıdır. Sistoskopik olarak santral skardan radyer tarzda çıkan küçük damarların olduğu kırmızımsı mukozal oluşumlardır. Bu lezyonlar koagulum ve fibrin yapıları içerir. Ayrıca, mesanenin hidrodistansiyonu ile birlikte rüptüre olarak peteşiyal tarzda sızmalar gösterir. Mesane fundusundaki sistoskopiye bağlı artefaktlarda dikkatli olmak gerekir. Glomerülasyon için en az iki farklı kadranda peteşiyal tarzda kanamalar görülmelidir. Bununla birlikte, normal olguların %45'inde glomerülasyon mevcuttur ve glomerülasyonların belirtilerle ilişkisi yoktur. Glomerülasyonlar semptomlarla korele olmadığı için İS/MAS fenotiplendirilmesinde ve tanısında yer almamaktadır. Bu bulgular, glomerülasyonun tanındaki önemini azaltmaktadır. İS/MAS, mesane kanseri ya da *karsinoma in situ* ile karışabilmektedir. Bu nedenle, sistoskopi İS/MAS'ın ayırıcı tanısında da önemlidir.³⁷

2.1.5.10. Biyopsi

ESSIC rehberi tarafından tanının onaylanması ve hastaların fenotiplendirilmesi için önerilmektedir. Ancak biyopsinin tek başına tanı koydurucu olmadığı bilinmesi gerekir. Asıl amaç, benzer belirtilerle karşımıza çıkabilecek *karsinoma in situ* olgularının tanısını koymaktır. İS/MAS olguların %50'sinde lamina propriada mast hücre sayısı 30 hücre/ml'nin üzerindedir (detrusor mastositozisi). Hastaların %11'inde ürotelyum kaybı ve %14'ünde lamina propriada granülasyon tespit edilmiştir. Ayrıca olguların %67'sinde hemoraji bulunmaktadır. Bunlara ek olarak, inflamatuvar infiltrasyon ve intrafasiyal fibrozis mesane biyopsisinde karşılaşılabilecek diğer patolojik bulgulardır.³⁷

2.1.5.11. Fenotiplendirme

Son çalışmalar İS/MAS'da multimodal tedavinin planlanabilmesi için olguların fenotiplendirilmesi gerektiğini vurgulamıştır. UPOINT (*Urinary, Psychosocial, Organ specific, Inflammation, Neurological/Systemic, Tenderness*) kişiye özel tedaviyi öneren bir fenotiplendirme örneğidir.⁵³ CUA tarafından, İS/MAS'lı olgularda fenotiplendirme ve bu

fenotipe uygun tedavi önerileri *UPOINT* sistemi kullanılarak şematize edilmiştir (Tablo 2.1.).⁵⁴

Tablo 2.1. Kanada Üroloji Derneği (*CUA*) rehberinin önerdiği *UPOINT* fenotiplendirme sistemine göre çeşitli tedavi yaklaşımları.⁵⁴

	Fenotip	Öneriler
U	URINARY (Üriner)	Mesane egzersizleri, Antikolinerjikler, İntravezikal ajanlar (Heparin, DMSO, Hiyalüronik asit, Kondroitin sülfat, PPS, Oksibutinin), Hidrodistanسیون, Botulinium toksin A, Sakral nöromodulasyon, Radikal cerrahi
P	PSYCHOSOCIAL (Psikososyal)	Stres yönetimi ve psikolojik destek
O	ORGAN SPECIFIC (Organ Spesifik)	Hunner Lezyonsuz: Amitriptilin, Simetidin, Hidroksizin, Kuersetin, PBS, İntravezikal ajanlar (DMSO, Heparin, Hiyalüronik asit, Kondroitin sülfat, Alkalize lidokain, PPS) Hidrodistanسیون, Botulinium toksin A, Radikal cerrahi Hunner Lezyonlu: Siklosporin A, Endoskopik (Fulgurasyon, Lazer, Rezeksiyon, Steroid ejeksiyonu), Hiperbarik oksijen, Radikal cerrahi
I	INFECTIOUS (Enfeksiyöz)	Antimikrobiyaller
N	NEUROLOGIC / SYSTEMIC (Nörolojik/Sistemik)	Gabapentin, Hidroksizin, Simetidin, Sakral nöromodülasyon
T	TENDERNESS (Hassasiyet)	Pelvik taban fizyoterapisi, Masaj, Akupunktur, Tetik nokta enjeksiyonları

2.1.6. Sınıflandırma

Hastalar, Hunner lezyonlu (klasik tip) ve glomerülasyonlu (non-ülseratif tip) olarak ikiye ayrılır.^{55,56} Bu iki grubun klinik görünümü, sonuçları ve tedavi yanıtları farklıdır. Bununla birlikte deneyimli klinisyenler tarafından İS/MAS tanısı konan hastaların %60'ından fazlasının Ulusal Diyabet, Sindirim ve Böbrek Hastalıkları Enstitüsü (*NIDDK*) ölçütlerini karşılamadığı saptanmıştır.

Mesane biyopsisi ve sistoskopi sırasında hidrodistanسیونla ortaya çıkan bulgulara dayanan, bir sınıflandırma sistemi *ESSIC* tarafından sunulmuştur (Tablo 2.2.).⁵⁷ Sınıflandırmada İS/MAS'ın şiddeti iki simge ile gösterilmiştir. Sistoskopide hidrodistanسیون sonrası bulgulardaki derecenin artmasına göre 1'den 3'e, mesane biyopsi bulgularındaki derecenin artmasına göre A'dan C'ye kadar kategorize edilmiştir. Sistoskopi veya biyopsi işlemi yapılmamış ise "X" ile belirtilmiştir.

Tablo 2.2. Sistoskopik bulgulara göre *ESSIC* sınıflandırması.⁵⁷

		Hidrodistansiyon + Sistoskopi			
Biyopsi		Yapılmamış	Normal	Glomerülasyonlar	Hunner lezyonu
	Yapılmamış	XX	1X	2X	3X
	Normal	XA	1A	2A	3A
	Yetersiz	XB	1B	2B	3B
	Pozitif*	XC	1C	2C	3C

*Histolojik olarak inflamatuvar infiltrasyonlar veya detrusor makrositleri veya granülasyon dokusu veya intrafasiküler fibrozis gösterilmiş.

2.1.7. Tedavi

Ürolojinin en problemlili konularından biri olan İS/MAS'ın tedavisi oldukça karmaşıktır. Hastalardaki alt üriner sistem semptomları (AÜSS) yanında psikolojik faktörler tedavi planında göz önüne bulundurulmalıdır. Hastalar genellikle depresif ve ümitsizdir. Psikolojik etmenlerin tabloya yerleşmesiyle tedavi süreci daha zahmetli ve karmaşık hale gelmektedir. Bu nedenle, tedavi planı düzenlenirken hastayla ayrıntılı konuşulmalı, hastanın beklentileri detaylı tespit edilmeli ve hastalığın kronik süreci hastanın anlayacağı dilde anlatılmalıdır. İS/MAS tedavisinde amaç, semptomların giderilmesi, normal mesane fonksiyonun sağlanması ve tedavinin kesilmesiyle birlikte hastanın kaliteli yaşam sürecinin sağlanmasıdır. Tedavi başarısı, 6 ay sonunda semptomların yok olması ve normal mesane fonksiyonunun sağlanması olarak kabul edilebilir.⁵⁸

2.1.7.1. Konservatif Yaklaşım

Mesane eğitiminin yanı sıra, zamanlı işeme, diyetin düzenlenmesi (mesane iritanları; asidik yiyecek ve içecekler, kafein, domates, alkol ve baharatlı gıdalar), sıvı kontrolünün sağlanması, idrarın alkalize edilmesi ve gevşeme egzersizleri birinci basamak tedavide yer almalıdır.⁵⁹ Pelvik taban tetik noktalara lokal anestezi uygulaması ve Kanada ve Doğu Asya Üroloji rehberleri tarafından önerilen akupunktur tedavileri bu aşamada yer almaktadır.³⁷

2.1.7.2. Fizik Tedavi

İS/MAS ile pelvik taban kasları arasında ilişki olduğu bilinmektedir.⁶⁰ Pelvik taban kas tonusu belirgin yüksek ve pelvik taban disfonksiyonu olan hastalara *EAU* rehberi tarafından "*thiele* masajı" (transvajinal manuel tedavi) önerilmektedir. Bununla birlikte sebep sonuç ilişkisi açısından hangisinin birincil etmen olduğu açık değildir. Tedavi

açısından tetik noktalara analjezik ajan enjeksiyonu ya da *biofeedback* tedavileri faydalı olabilmektedir.³⁷

2.1.7.3. Oral Ajanlar

Kanıtı dayalı tıp açısından mevcut tüm oral ajanlar düşük öneri seviyesindedir. Oral tedavi ajanları ikinci basamak tedavi yaklaşımlarıdır.³⁷ Bununla birlikte en sık kullanılan ajanlar; pentosan polisülfat sodyum kapsülleri (PPS/Elmiron®), hidroksizin ve amitriptilindir. Yine oral PPS ile subkütan düşük doz heparin de İS/MAS'lı hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir.⁶¹ Bu ajanların yanında, sıkışma hissi ve sık idrara çıkma nedeniyle antimuskarinik ajanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu tedavi için etkinliğine yönelik yeterli kanıt mevcut değildir. İdrar kültürü negatif olan olgularda antibiyotik tedavisinin yeri yoktur. Bununla birlikte, sık tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları olan hastalarda 3-6 aylık antibiyotik profilaksisi önerilebilir.

FDA tarafından onaylanan tek ilaç PPS'dir ve ayrıca Hunner lezyonu varlığında daha etkindir (günde 3 kez 100 mg). Sekiz aylık tedavi sonrası hastaların yaklaşık yarısı tedaviye cevap verir. Hastaların %2-3'ünde görülebilen saç dökülmesi oldukça rahatsız edici bir yan etkidir. Buna ek olarak, son yıllarda PPS kullanımının artan pigmenter makulopati riski ile ilişkili olduğuna dair bulgular da mevcuttur.⁶² Bilinen oftalmolojik sorunları olan hastalara kapsamlı retina muayenesi yapılması ve tedaviye başladıktan sonra 6 ayda 1 bu muayenenin tekrarlanması önerilmektedir.⁶³ Tedavi süresi 3-6 ay olmalı ve bu süre sonunda etkinliği değerlendirilmelidir. Tedavi başarılı bulunduğu anda, süre bir yıl veya daha ötesine uzatılabilir.

İS/MAS tedavisinde amitriptilin ve diğer trisiklik antidepresanlar da kullanılmaktadır. Birçok rehber tarafından A ve B seviyelerinde önerilmektedir.³⁷ Uzun kullanımlarında yan etki profili ilacın kesilmesinde en önemli etkindir. Kullanım dozu, gece yatarken 10-25 mg'dır ve tolere edildiğinde 75 mg'a kadar çıkılabilir. Psikolojik faktörlere olumlu etkisinin yanı sıra antihistaminik ve antinosiseptif etkileri tedavi başarısında bir etmen olarak kabul edilir. Kabızlık, sedasyon, ağız kuruluğu, kilo alınması yan etkileri olup kardiyak aritmisi olan hastalarda dikkatli olunmalıdır. Tedavi yanıtı alındığında aynı dozda 6-8 hafta tedaviye devam edilmelidir. Eşlik eden depresyona olumlu katkısı ve sedasyon etkisiyle noktüriyi azaltması, bu ilacın tedavi planında yerini korumaktadır.

Antihistaminikler tedavide kullanılmıştır.⁶⁴ Bununla birlikte, hidroksizin ile yapılan çalışmalarda plaseboya üstünlüğü tespit edilmemiştir. Gece yatarken tek doz 75 mg

kullanılabilir. Bu dozlarda görülen sedasyonun noktüriye katkısı olabilir. Tedavi süresi 6-8 haftadır.

Histamin 2 reseptör blokeri olan simetidin, günde iki kez 400 mg kullanımında ağrı ve sık idrara çıkma açısından plaseboya üstün bulunmuştur.⁶⁵

Belirtilen oral ajanların dışında, prednizon, kuersetin, montelukast, mizoprostol ve siklosporin kullanımına ait literatür bulguları mevcuttur.

Siklosporin dışındaki ajanların tarihi önemi dışında günümüzde kullanımı yoktur. *AUA* rehberi tarafından 5. basamak tedavi yöntemidir ve majör cerrahi öncesinde önerilmektedir.³⁷ Siklosporin, bağışıklık sistemini modüle etmesi yönüyle kullanım alanı bulmuştur. Altı aylık tedavide PPS ile karşılaştırıldığında tedavi başarısı daha üstün bulunmuştur (%9'a karşı %75).⁶⁶

Duloksetin, oksibutinin, L-arginin, klorpaktin ve prostaglandin kullanımının *EAU* rehberine göre sınırlı bir önemi vardır.⁶⁷

2.1.7.4. İntravezikal Tedaviler

İS/MAS tedavisinde intravezikal ajanlar, anti-inflamatuvar ve analjezik özellikleri yanında, bozulmuş GAG tabakasının yenilenmesi amacıyla kullanılmaktadır.³⁷

Dimetil sülfoksit'in (DMSO) anti-inflamatuvar, analjezik, kolajen çözünmesi ve kas gevşetici gibi birçok özelliğe sahip olduğu bilinmektedir.⁶⁸ Geçmişte kullanılmıştır ancak önerilmesi için yeterli güncel kanıt yoktur.

GAG analogu olarak heparin tedavisi, kliniğimizde en çok tercih ettiğimiz yöntemdir. Basit ulaşılabilir ve ucuz yöntem olması bizim tercihimizi belirleyen önemli etmenlerdir. Yirmi bin ünite heparin, alkalinize lidokain ile kombine edilerek haftada 2 ya da 3 kez verilmektedir. Heparin, lidokain ve sodyum bikarbonat kombinasyonu hastaların %94'ünde hemen semptomatik düzelme sağlar ve bu hastaların %80'inde 2 haftaya kadar etkisini sürdürür. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Kadın Ürolojisi ve İşlevsel Üroloji bölümünde, toplam 50 ml hacim içinde, 20.000 ünite heparin, 200 mg lidokain ve %8,4'lük sodyum bikarbonat ile haftada iki kez toplam 12 ay intravezikal tedavi olarak uygulanmaktadır.⁵⁸

Hiyalüronik Asit ve Kondroitin Sülfatın GAG tabakasını onardıkları düşünülmektedir.^{69,70} PPS intravezikal kullanılabilir. *EAU* rehberi intravezikal PPS'yi A öneri derecesinde tavsiye etmektedir.³⁷ Yaygın olarak lidokain olarak adlandırılan lignokain, bir amid lokal anestezi ajandır. *EAU* ve *CUA* rehberleri tarafından akut yangı

semptomları gidermede ve kısa süreli semptomların iyileştirilmesinde önerilmektedir.³⁷ BCG, etkinliği hakkında birbirine zıt sonuçlar mevcuttur.⁷¹ Bugün sahip olduğumuz bilgilere göre BCG'nin İS/MAS tedavisinde yeri yoktur.³⁷

2.1.7.5. Mesane Distansiyonu

Sistoskopik yaklaşımlardan, mesane distansiyonu ve Hunner lezyonlarına yönelik transüretral fulgurasyon üçüncü basamak tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır. Her ne kadar standardize edilmiş bir terapötik hidrodistansiyon olmasa da *ESSIC* tarafından, irrigasyon sıvısı simfizis pubisin 80 cm üzerinde olacak şekilde yaklaşık 3 dakikalık idame distansiyon şeklinde önerilmektedir.³⁷ Literatürde bu konuda standardizasyon bulunmamaktadır. Ayrıca, işlem esnasında maksimum mesane kapasitesi de ölçülmelidir. Tedavi ediciliği konusunda yeterli kanıt yoktur. Ancak tanısal değerlendirmenin bir parçası olarak kullanılabilir. Hidrodistansiyon spinal/epidural ya da genel anestezi altında yapılmalıdır. Hidrodistansiyon sonrası görülen glomerülasyon tanı için patognomik bulgu olmamakla birlikte İS/MAS lehine düşünülmelidir. Glomerülasyon değerlendirilirken sistoskopi kılıfının artefaktlarından kaçınılmalıdır. Pozitif glomerülasyon için en az iki farklı kadranda peteşiyal tarzda kanama odakları tespit edilmelidir. Burada dikkat edilecek en önemli nokta, biyopsinin hidrodistansiyon sonrasında yapılmasıdır. Aksi takdirde istenmeyen mesane perforasyonları gerçekleşebilir. Hidrodistansiyonun geçici semptomatik iyileşme yaptığı belirtilmiştir. Bizim deneyimlerimize göre de 6 ayı aşmayan semptomatik iyileşmeler mevcuttur.⁵⁸ Literatürde, kısmi ya da tam düzelmeler %20-60 oranında belirtilmiştir. Her ne kadar İS/MAS tedavisinde kanıt eksikliği nedeniyle tek başına önerilmese de, *Botulinum* toksin ile hidrodistansiyon uygulaması *EAU* rehberlerine göre A öneri derecesinde tavsiye edilmektedir.³⁷

2.1.7.6. Transüretral Rezeksiyon, Koagülasyon ve Lazer Uygulaması

Hunner lezyonu olan hastaların tedavisinde endürolojik tedavi neredeyse tüm rehberler tarafından önerilmektedir. *EAU* rehberine göre Hunner lezyonu olan İS/MAS'lı hastaların tedavisinde transüretral fulgurasyonu B öneri derecesinde uygulanması tavsiye edilmektedir.^{37,67} Ayrıca transüretral lazer uygulaması ile ağrı ve sıkışma hissinin azaldığı gösterilmiştir.⁶⁷

2.1.7.7. Botulinum Toksin-A

Mesane afferent yollarında antinosiseptif etkileri olabilir ve semptomatik ve

ürodinamik iyileşme sağlar.⁷² Trigonal enjeksiyonun etkili ve uzun süreli olduğunu gösterilmiştir. Hastaların %87'sinde 3 ay sonunda, %50'den fazlasında da 9 ay sonunda semptomatik iyileşmenin devam ettiği saptanmıştır. İyileşmenin sona erdiği hastalarda yeniden enjeksiyonun benzer etki oluşturduğu saptanmıştır. *AUA* rehberi daha önceki tedavilerden fayda görmeyen hastalarda dördüncü basamak tedavi yöntemi olarak mesaneye uygulanmasını önermektedir. *EAU* rehberine göre ise hidrodistansiyon ile birlikte mesaneye uygulanması tavsiye edilmektedir.³⁷

2.1.7.8. Hiperbarik Oksijen

Küçük bir alt grup İS/MAS hastasında orta derece düzelme sağlasa da pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir.⁶⁷ Daha çok Japon ve Kanada ürolojik rehberleri içerisinde tedavi yöntemi olarak önerildiği dikkat çekmektedir.⁷³

2.1.7.9. Sinir Stimülasyonu

Refraktör İS/MAS tedavisinde sinir stimülasyonu yöntemleri kullanılmaktadır.⁷⁴ Bu amaçla, FDA onayı olan *Medtronic InterStim* cihazı ile sakral nöromodülasyon yanında posterior tibial sinir stimülasyonu da mevcuttur.⁷⁵ *EAU* rehberine göre radikal cerrahi yapılmadan önce önerilmektedir. *AUA* rehberine göre dördüncü basamak tedavi seçeneği olarak tavsiye edilmektedir.

2.1.7.10. Cerrahi Tedaviler

2.1.7.10.1. Mesane Augmentasyonu

Konservatif tedaviye cevap vermeyen olgularda tek başına ya da subtotal sistektomi ile birlikte uygulanabilir. Hiçbir tedaviye yanıt vermeyen olgular ile Hunner lezyonu olanlarda düşünülebilir. Hunner lezyonu görülmeyen ve mesane kapasitesi iyi olan hastalarda mesane augmentasyonu sonuçları iyi değildir. Literatürde başarı oranı %25-96 olarak bildirilmektedir.

2.1.7.10.2. Total Sistektomi ve Diversiyon

İS/MAS tedavisinde en son çare olarak düşünülmeli ve bu konudaki deneyimi fazla olan kliniklerde uygulanmalıdır. *AUA* kılavuzlarında son basamak tedavi seçeneği olarak göze çarpmaktadır. Geriye dönüşümsüz invaziv bir seçenek olduğu akılda bulundurulmalıdır. Özellikle mesane kapasitesi küçük ya da Hunner lezyonları olan iyi seçilmiş hastalarda supratrigonal sistektominin iyi sonuçları bildirilmiştir.³⁷ Sadece ağrı kontrolü için asla düşünülmemelidir.

EAU ve *AUA* kılavuzlarına göre tedavi önerileri Tablo 2.3. ve 2.4.'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Avrupa Üroloji Derneği (EAU, 2021) güçlü öneri düzeyli tedavi tavsiyeleri.⁶⁷

Öneriler	Öneri Derecesi
İS/MAS tedavisi için alt tip ve fenotip odaklı tedavi öneriniz.	Güçlü
İS/MAS için daima oral veya invaziv tedavilerinin yanında multimodal davranışsal fiziksel ve psikolojik yöntemleri sunmayı düşününüz.	Güçlü
İS/MAS tedavisi için amitriptilin öneriniz.	Güçlü
İS/MAS tedavisi için oral PPS öneriniz.	Güçlü
İntravezikal tedavilerin işe yaramadığı durumlarda hidrodistansiyonla birlikte mesane submukozasına Botulinum toksin A enjeksiyonu uygulayınız.	Güçlü
İntravezikal instilasyon tedavileri başarısız olduysa mesane duvarına ve trigonal bölgeye Botulinum toksin A enjeksiyonu öneriniz.	Güçlü
En son çare olarak ablatif veya rekonstrüktif cerrahiyi düşününüz ve bu işlem İS/MAS alanında tecrübesi olan kişiler tarafından gerçekleştirilmelidir.	Güçlü
Sadece İS/MAS Tip 3C için olmak üzere, transüretral rezeksiyon (fulgurasyon ya da lazer) öneriniz.	Güçlü
Uzun süreli tedavi için oral kortikosteroidleri önermeyiniz.	Güçlü

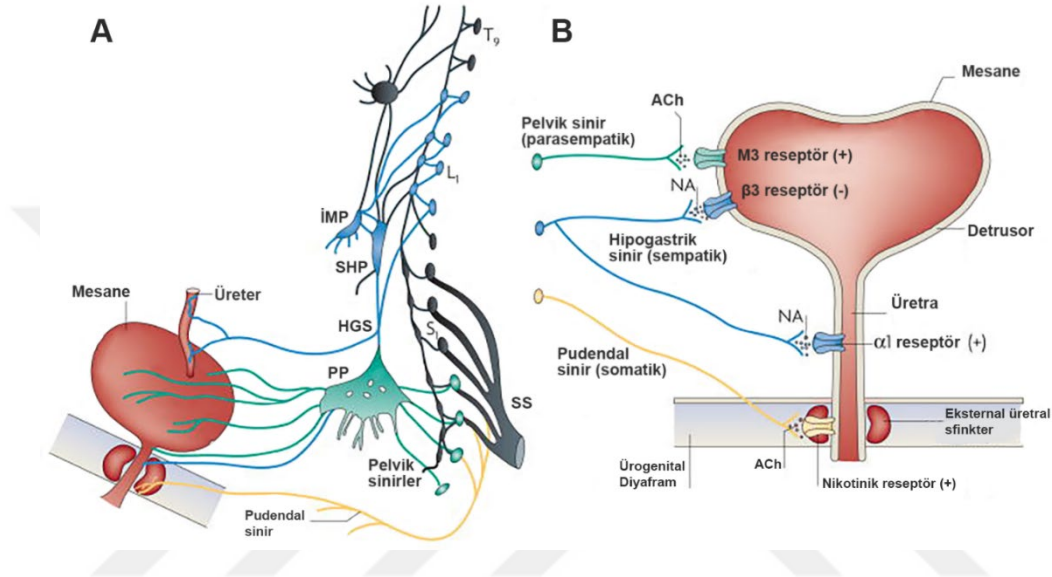
Tablo 2.4. Amerikan Üroloji Derneği (AUA, 2015) İS/MAS Tedavi Rehberi.³⁸

Tedavi Basamakları	Tedaviler
1	Genel rahatlama yöntemleri / Stres Yönetimi Ağrı yönetimi Hasta eğitimi Öz bakım ve davranışsal değişiklikler
2	Uygun manuel fizyoterapi teknikleri Oral: Amitriptilin, PPS, Simetidin, Hidroksizin İntravezikal: DMSO, Lidokain, Heparin Ağrı yönetimi
3	Anestezi altında Sistoskopi + Hidrodistansiyon Ağrı yönetimi Hunner lezyonu mevcutsa Transüretral tedavi
4	Detrusor içine Botulinum toksin A Nöromodülasyon Ağrı yönetimi
5	Siklosporin A Ağrı yönetimi Diversiyon ya da diversiyon + sistektomi Ağrı yönetimi
6	Mesane augmentasyonu Not: Yapısal olarak son dönem küçük mesaneye sahip olan uygun olduğu düşünülen hastalara herhangi bir zamanda diversiyon endikedir.

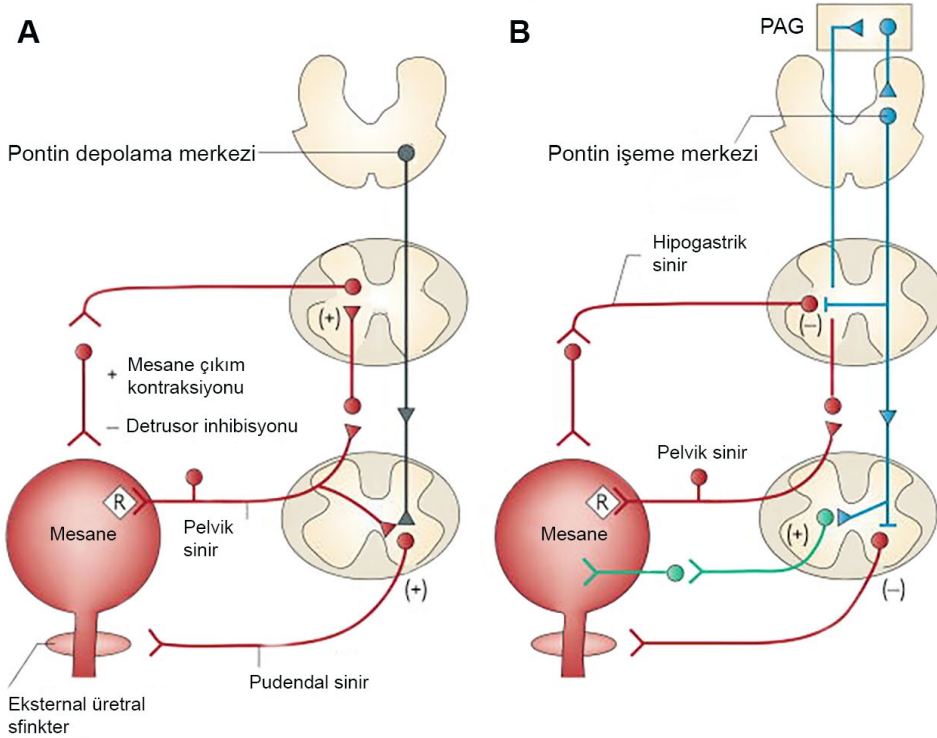
2.2. İnterstisyel Sistit/Mesane Ağrı Sendromu Altında Yatan Mekanizmalar

Normal mesane fonksiyonu için, mesane duvarı kaynaklı afferent sinyaller ile, anterior singulat korteks, insula ve hipotalamustan gelen uyarıcı ve inhibe edici sinyallerin koordinasyonu gereklidir ve bu da prefrontal korteks tarafından istemli ve kontrol altında olan idrara çıkma uygunluğunu sağlar. Aynı zamanda ürotelyumu innerve eden ve detrusora uzanan mesane afferentleri, distansiyona mükemmel bir hassasiyet gösterir.⁷⁶⁻⁷⁸ Karmaşık sinyal ortamından gelen girdiyi entegre eden ve dolgunluk hissinden ağrıya kadar bir dizi duyuyu algılayan mesane afferentleri, bir dizi anti- ve pronosiseptif reseptör ve iyon kanalı ekspresyonunu sağlar^{8,79}. Hücre gövdeleri DKG'nin içinde yer alan bu afferentler; pelvik, hipogastrik/splanknik sinirler aracılığıyla projekte olur, lumbosakral (LS, L5-S1) ve torakolomber (TL, T10-L2) dorsal boynuz içinde sinaps yapar ve

periakvaduktal gri (PAG) madde içinde sonlanır. PAG, omurilikten ve daha yüksek beyin merkezlerinden gelen afferent sinyaller için bir entegrasyon merkezi görevi görür. Afferent aktivitenin belirlenmiş bir eşiğin üzerine çıkması ve beyinden gelen modüle girdinin buna izin vermesi ile PAG verimli işlemeyi indüklemek için pontin işleme merkezini aktive eder ve bu şekilde istemli idrara çıkma dürtüsü algılanmaktadır (Şekil 2.1 ve 2.2).^{3,80-82}



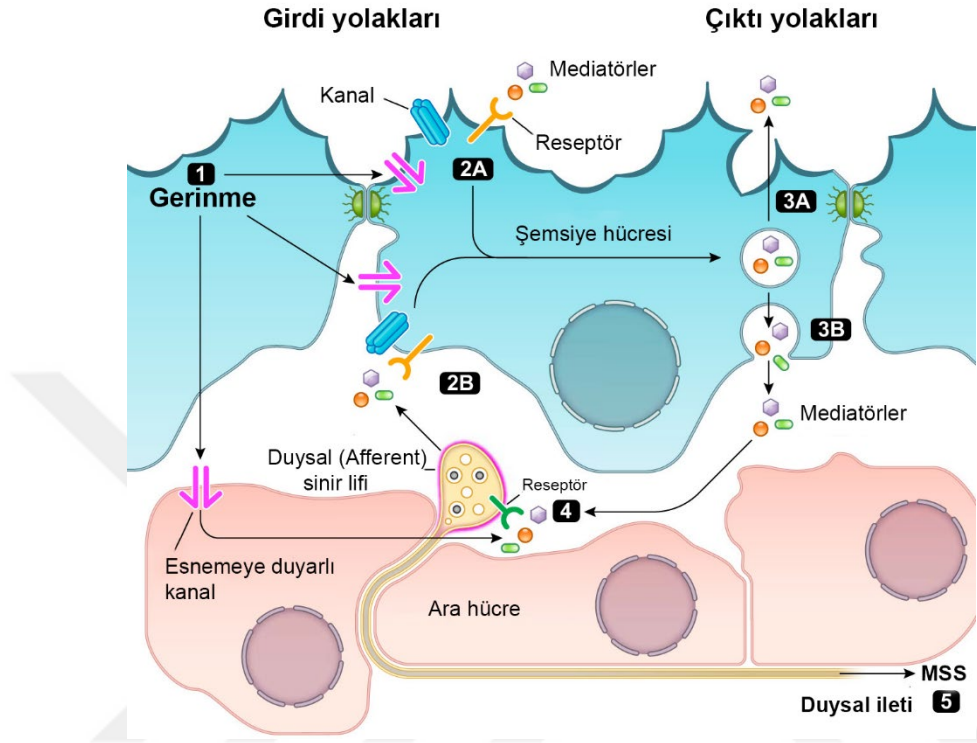
Şekil 2.1. Alt üriner sistemin efferent yolları.⁸⁰ A. Kadınlarda alt üriner sistemin innervasyonu: Sempatik lifler (mavi ile gösterilmiştir), omurilikteki T11-L2 segmentlerinden köken alarak inferior mezenterik gangliyonlar (inferior mezenterik pleksus, İMP) ve hipogastrik sinirden (HGS) veya paravertebral zincirden geçerek mesane ve üretranın tabanındaki pelvik sinirlere girerler. Parasempatik preganglionik lifler (yeşil renkle gösterilmiştir) S2-S4 spinal segmentlerinden köken alarak sakral kökler ve pelvik sinirler üzerinden pelvik pleksus (PP) ve mesane duvarındaki ganglionlara gider. Burası, mesaneye parasempatik innervasyon sağlayan postganglionik sinirlerin ortaya çıktığı yerdir. Eksternal üretral sfinkterin çizgili kaslarını innerve eden somatik motor sinirler (sarı ile gösterilmiştir) S2-S4 motor nöronlarından kaynaklanır ve pudendal sinirlerden geçer. B. Alt üriner sistemi düzenleyen efferent yollar ve nörotransmitter mekanizmaları: Pelvik sinirdeki parasempatik postganglionik aksonlar, mesane düz kasındaki M3 muskarinik reseptörleri uyarak mesane kasılmasına neden olan asetilkolini (ACh) serbest bırakır. Sempatik postganglionik nöronlar, mesane düz kasını gevşetmek için β_3 adrenerjik reseptörleri aktive eden noradrenalin (NA) salgılar. Pudendal sinirdeki somatik aksonlar ayrıca nikotinik kolinerjik reseptörleri aktive ederek dış sfinkter çizgili kasın kasılmasını sağlayan ACh'yi serbest bırakır. Parasempatik postganglionik sinirler ayrıca mesane düz kasını uyaran ATP ve üretral düz kasları gevşeten nitrik oksit salgılar (gösterilmemiştir). L1, birinci lumbal kök; S1, birinci sakral kök; SHP, superior hipogastrik pleksus; SS, siyatik sinir; T9, dokuzuncu torasik kök.⁸⁰



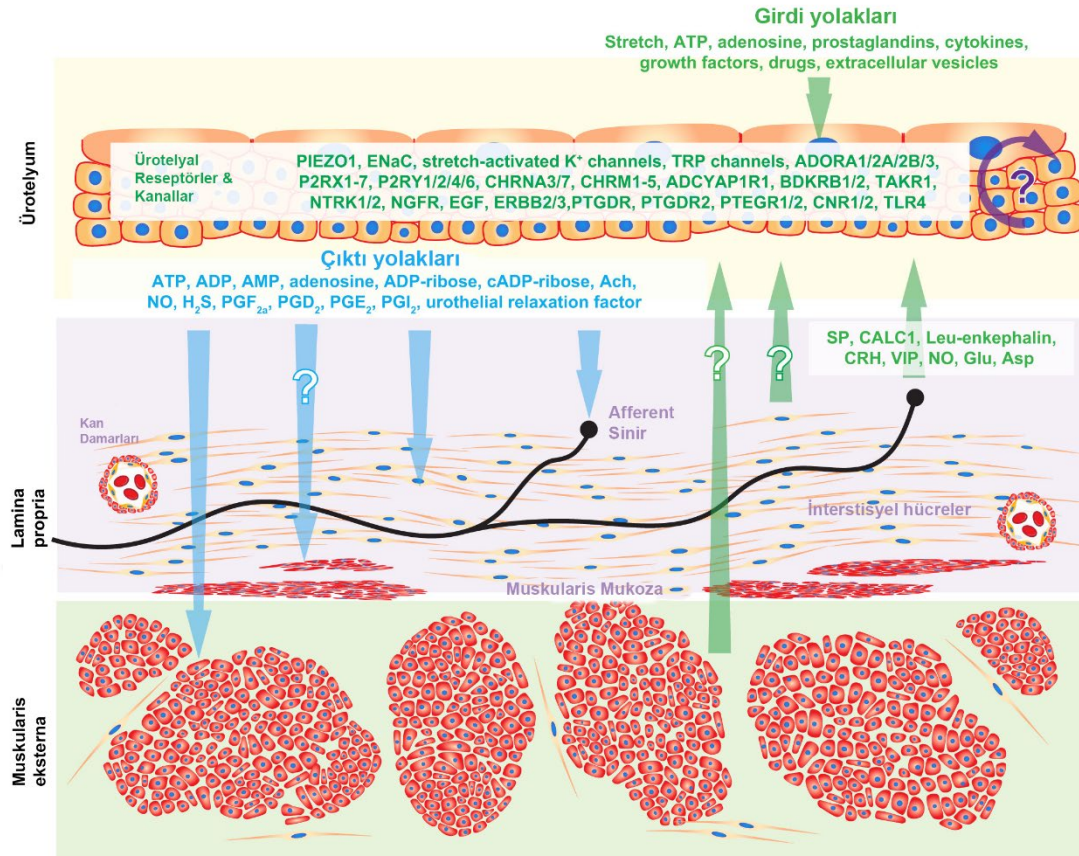
Şekil 2.2. Kontinans ve işeme reflekslerini kontrol eden sinir devreleri.⁸⁰ A. İdrarın depolanması: İdrarın depolanması sırasında, mesanenin genişlemesi düşük seviyeli vezikal afferent ateşlemeye neden olur. Bu da mesane çıkımına (mesane tabanı ve üretra) giden hipogastrik sinirdeki sempatik çıkışı ve eksternal üretral sfinktere giden pudental çıkışı uyarır. Bu yanıtlar spinal refleks yolları tarafından meydana gelir ve kontinansı destekleyen koruyucu refleksleri ifade eder. Sempatik ateşleme, detrusor kasının kasılmasını engeller ve ayrıca mesane gangliyonlarında nörotransmisyonu modüle eder. Buna ek olarak pontin depolama merkezi çizgili üretral sfinkter aktivitesini artırabilir. B. İşeme refleksleri: İdrarın atılımı sırasında, pelvik sinirde yoğun mesane afferent ateşlemesi, pontin işeme merkezinden geçen spinobulbospinal refleks yollarını (mavi renkte gösterilmiştir) aktive eder. Bu, mesaneye ve üretral düz kaslara parasempatik çıkışı (yeşil renkte gösterilmiştir) uyarır ve üretral çıkıma giden sempatik ve pudental çıkışı (kırmızı renkte gösterilmiştir) inhibe eder. Omurilikten çıkan afferent girdi, pontin işeme merkezine ulaşmadan önce periakvaduktal grideki (PAG) ara nöronlardan geçebilir. Bu diyagramların, bilinçli mesane duyularının oluşumunu veya depolamadan boşaltıma geçişin altında yatan mekanizmaları ele almadığını, her ikisinin de muhtemelen PAG'in üstündeki serebral devreleri kapsadığını unutmayın. R, afferent sinir terminallerindeki reseptörleri temsil eder.⁸⁰

Klinik çalışmalar İS/MAS'lı hastaların, sağlıklı deneklerle göre daha düşük sistometrik hacimlerde mesane dolgunluk hissi, sıkışma hissi ve ağrı algıladığını ortaya koymaktadır.¹ Dolayısıyla bu gözlemler, İS/MAS altında yatan mekanizmalarda anahtar bir bileşen olarak fizyolojik uyarılara karşı mesane afferent yollarının duyarlılığını işaret etmektedir.^{2,3} Ayrıca İS/MAS hastalarının depresyon ve anksiyete komorbiditesinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve ayrıca yüksek psikolojik stres seviyeleri ile mesane semptomlarının alevlenmesinin korele olduğu tespit edilmiştir.⁴⁻⁶ Bu nedenle, afferent sinyalin artan yoğunluğunun yanında duygusal afektif durumun modülasyonu da mesane hissi üzerinde

hastalarında ürotelyal mediatör salınımında değişiklikler tanımlanmış ve bu değişikliklerin kronik nöronal aşırı duyarlılığının altında yatan mekanizma olabileceği belirtilmiştir (Şekil 2.3. ve 2.4).^{104,105}

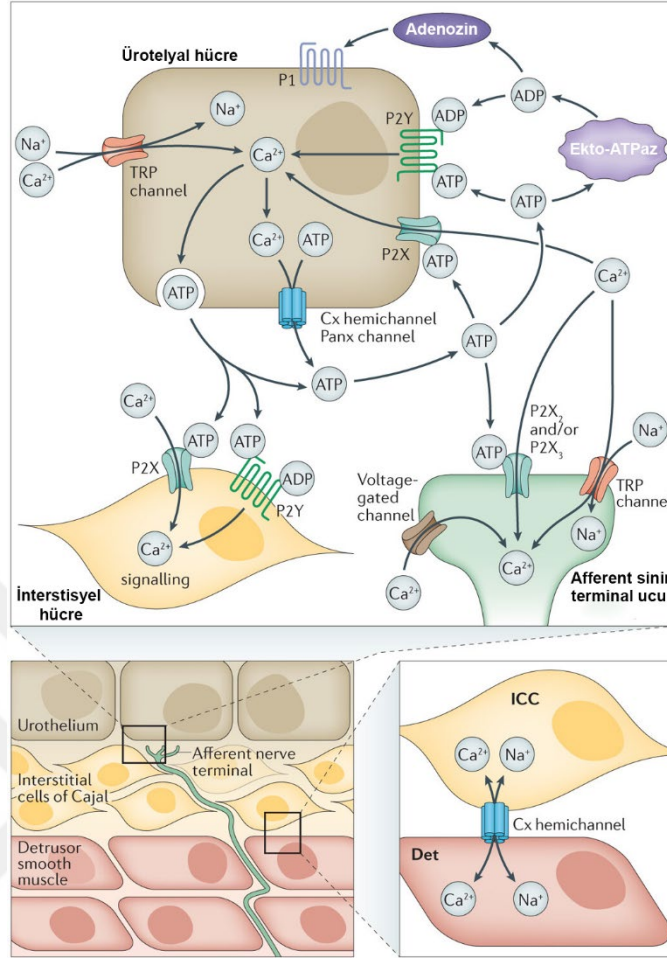


Şekil 2.3. Ürotelyum ilişkili duysal ağ.¹⁰⁶ Bu duysal ağın işlevi ürotelyum ile bazal komşuluğundaki dokular arasında çift yönlü iletişimi sağlamaktır. Ürotelyum girdi yollarını; esnemeye duyarlı kanallar (Basamak 1), idrarda bulunan mediatörler tarafından uyarılan kanallar (Basamak 2A) ve afferent sinir terminalinden salınan mediatörler tarafından uyarılan kanallar (Basamak 2B) oluşturur. Ürotelyum yüzeyinden apikal ve bazolateral olarak salınan mediatörler çıktı yolları olarak tanımlanır. Girdi yollarının aktivasyonu, bu çıktı yollarını uyararak ürotelyum apikal (Basamak 3A) ve bazolateral yüzeylerden (Basamak 3B) mediatör salınımına neden olur. Ürotelyumun serozal yüzeyinden salınan mediatörler (Basamak 3B), afferent liflerin terminalindeki reseptörlere bağlanarak (Basamak 4) ürotelyumun mevcut fizyokimyasal durumunu merkezi sinir sistemine (MSS) bildirir (Basamak 5). Bu model afferent sinir terminalleri ile ürotelyumun etkileşimini açıklamaktadır. Bununla birlikte benzer yolların ürotelyum-interstisyel hücreler ve düz kas hücreleri arasında da olması muhtemeldir.¹⁰⁶



Şekil 2.4. Ürotelyal yolların özeti.¹⁰⁶ Ürotelyum tarafından salınan mediatörler (yani, “çıktılar”) mavi renk ile yazılmıştır ve bu mediatörlerin etkilediği varsayılan hedef dokular mavi ok ile gösterilmiştir. Mesane lümeninde bulunan veya afferent sinir terminalinden salınanlar mediatörler yeşil renk ile yazılmıştır ve bunlar ürotelyal yanıtları tetikleyen girdiler olarak işlev görür. Ürotelyumda bulunduğu varsayılan girdi yolları yeşil renk ile yazılmıştır ve bu yollar çok sayıda kanal ve reseptörü içerir. İnterisyel hücreler veya düz kas hücreleri tarafından salınan mediatörlerin ürotelyal fonksiyona etkisi hakkında sınırlı bir bilgi vardır, bu nedenle soru işaretleri ile belirtilmiştir. Bir ürotelyal hücre tarafından salınan mediatörlerin farklı bir ürotelyal hücrede girdi olarak işlev görebileceği varsayımı mor ok ile ifade edilmiştir.¹⁰⁶

Kronik mesane inflamasyonunun, sıçanlarda ürotelyumdan ATP salınımını ve mesane afferentlerinde pürinerjik sinyalleşmeyi arttırdığı^{16,17}; İS/MAS’lı hastalarda ürotelyumda hem gerilme aracılı ATP salınımını hem de P2X3 reseptör ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir.^{18,19} Prelinik araştırmalardan muskarinik reseptör aracılı ACh’nin, ürotelyal hücrelerden NO ve prostanooidlerin yanı sıra ATP salınımını da tetiklediği^{20,21}, ayrıca deneysel sistit modellerinde ACh ve NO salınımının da arttığı bilinmektedir.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Bunlara ek olarak, bradikinin, insan ürotelyal hücre hattında ürotelyal NGF salınımını uyarmakta ve gerilme kaynaklı ATP salınımını artırmaktadır.^{20,111} İS/MAS’lı hastaların¹¹² ve CYP ile indüklenen sistit modeli¹⁶ mesane örneklerinde ürotelyumda Bradikinin-1 reseptörü ekspresyonu artmaktadır (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Pürinerjik mekanik duysal transdüksiyonun kuramsal modeli ve TRP kanallarının alt üriner sistem ile ilişkisi.¹⁰² Ürotelyum tarafından eksprese edilen geçici reseptör potansiyeli kanalı (TRP) mesane distansiyonu ile aktive olarak ürotelyumdan ATP salınmasına neden olur. Salınan ATP merkezi sinir sistemine duysal ve nosiseptif sinyalleri iletecek olan afferent sinirlerin terminal ucunda bulunan P2X2 veya P2X3 reseptörü üzerine etki eder. Aynı zamanda TRP kanalları yine bahsi geçen afferent sinir terminallerinde eksprese edilebilir. Bu kanallardan bazıları alt üriner sistem fizyolojinde rol oynayabileceği ifade edilmiştir. Ürotelyum hücreleri tarafından ATP salınımına ekzositoz veya *panneksin* ve *conneksin* hemi kanalları aracılık edebilir. Salınan ATP, interstisyel hücreler üzerinde bulunan pürinerjik reseptörler üzerinden interstisyel hücre fonksiyonuna etki edebilir. Bunlara ek olarak ortama salınan ATP'nin etkileri yine bu pürinerjik reseptörler ve ekto-ATPaz'lar tarafından değiştirilebilir. İnterstisyel hücreler ile detrusor hücreleri arasında sıkı bağlantı kanalları sayesinde ürotelyumdan salınan ATP'nin etkileri detrusor hücrelerine kadar uzanabilir. Ürotelyal reseptörlerin ve kanalların uyarılması, mesane duyu sinirlerini ve diğer hücre tiplerini hedef alan mediatörlerin salınmasına neden olabilir; ürotelyal hücreler ayrıca sinirlerden veya diğer hücre tiplerinden salınan nörotransmitterler için hedef de olabilirler yani otokrin (otoregülasyon) veya parakrin (yakındaki sinir liflerinden veya diğer hücrelerden salınım) mekanizmalar tarafından aktive edilebilirler.¹⁰²

İS/MAS'ta değişmiş ürotelyal nörotransmitter salınımı veya reseptör ekspresyonunun nedenleri tam olarak belirlenemese de, bu değişikliklerin inflamasyon, enfeksiyon veya ürotelyal hasarlanmanın bir sonucu olduğuna dair birikmiş kanıtlar mevcuttur.⁹⁹

2.2.2. İnflamasyon

Sadece küçük bir İS/MAS hasta popülasyonu, Hunner ülserlerinin varlığı ile karakterize önemli bir inflamasyon sergilemektedir.¹¹³ Bununla birlikte İS/MAS hastalarının mesane ve idrarındaki proinflamatuvar mediatörlerin miktarında artış olduğu yaygın olarak bildirilmektedir.^{86,114-117} Mast hücrelerinden salınanların, histaminin ve NGF'yi içeren pro-inflamatuvar mediatörlerin, afferent sinir terminallerini doğrudan hassaslaştırdığı bilinmektedir.¹¹⁸ Ayrıca İS/MAS hastalarında pro-inflamatuvar genlerin artmış ekspresyonu, ödem, doku granülasyonu; makrofaj, kemokin, sitokin, eozinofil ve ayrıca T ve B hücre belirteçlerinde artış da tanımlanmıştır.^{114,119}

Sistit kaynaklı inflamasyonun çoğunluğu yüzeyel mukozada lokalize olmasına rağmen, ürotelyal afferentler bu çevresel değişiklikleri tespit edebilecek ve değişikliklere yanıt verebilecek bir lokasyondadır.⁹⁹ Afferentlerin inflamasyona bağlı hassaslaşması, normal yara iyileşmesinin indüklenmesi için temel bir mekanizmadır, ancak afferentlerin kronik duyarlılığı, uzun süreli veya şiddetli bir inflamasyonu takiben ortaya çıkabilir.^{7,119} Ürolojik bozukluklarda inflamatuvar aracılı bir patofizyolojiyi desteklemek için, sistit hayvan modellerinde hem akut hem de kronik mesane hiperaktivitesini indükleyen asetik asit, akrolein, CYP, zimosan ve LPS dahil bir dizi kimyasal madde kullanılmıştır.¹²⁰⁻¹²³ AAM ve İS/MAS gibi hastalıkların araştırılmasında inflamatuvar hayvan modelleri kullanımında birçok sınırlama olsa da bu hayvanlarda, mesane distansiyonu sırasında sistometrik değişiklikler ve artmış visseromotor tepki ile AAM fenotipi, azalmış mesane kapasitesi, mesane distansiyonunda allodini ve hiperaljezi varlığı ile insanlardakine benzer bulgular tespit edilmiştir.¹²⁴⁻¹²⁷ Ayrıca, mesane afferentleri kimyasal ve inflamatuvar uyaranlara karşı doğrudan duyarlılık gösterirken¹²⁸, CYP ile indüklenen sıçan ve doğal olarak oluşan bir kedi İS/MAS modelinde mesaneyi innerve eden DKG nöronlarının daha düşük aktivasyon eşiği ile bu duruma ikincil olarak duyarlılaştığı tespit edilmiştir.^{129,130} İS/MAS'ı tedavi etmede mesane afferent ateşlemesini bloke eden (lidokain ve neosaksitoksin gibi) ve periferik sinir desensitizasyonuna neden olan (resiniferatoksin) intravezikal ajanların etkililiği, distansiyon ile oluşan mesane aşırı duyarlılığında periferik afferentlerin rolünün önemini vurgulamaktadır.^{131,132}

Geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanalı olan Geçici Reseptör Potansiyeli Vanilloid Reseptör-1'in (TRPV1), İS/MAS'lı hastaların mesanelerinde artmış ekspresyonu gösterilmiştir.¹³³ Bunun yanında, TRPV1 ve Geçici Reseptör Potansiyeli Ankirin Reseptör-

1 (TRPA1), nöronal aktivasyon eşiklerini modüle ederek ve P2X reseptör aktivasyonuna mesane afferent yanıtlarını artırarak, kemirgenlerin normal ve sistit kaynaklı mekanik duyarlılığına aracılık etmede yer almıştır.^{126,134-138} Sistit hayvan modellerinde, voltaj kapılı sodyum kanalları (Nav)^{79,139}, potasyum kanalları (Kv)¹⁴⁰; P2X^{129,141}, Geçici Reseptör Potansiyeli Vanilloid Reseptör-4 (TRPV4)¹⁴² ve kannabinoid^{143,144} reseptörleri olmak üzere nöronal duyarlılığı ve nöronal uyarılabilirliği düzenleyen mesane afferentleri üzerinde nosisepsiyon ile ilişkili bir dizi ek reseptör ve kanal da tanımlanmıştır. Bazı hastalar aktif inflamasyon veya artmış ürotelyal geçirgenlik olmaksızın, daha önceki mesane enfeksiyonu veya inflamasyonunun remisyon döneminde olması mümkündür. Bu senaryoya göre, uzun süreli aşırı duyarlılık hali artmış duyuşal semptomların nedeni olabilir.⁹⁹ Çocukken klinik olarak tekrarlayan İYE öyküsü olan kadınların yetişkinlik döneminde İS/MAS tanısı alma olasılığı önemli ölçüde yükselmektedir¹⁴⁵ ve ayrıca neonatal sıçan mesane hasarının preklirik araştırmaları, bu durumun duyuşal yolların uzun süreli duyarlılaşmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ İnflamasyonun gerilemesini veya doku yaralanmasının iyileşmesini takiben periferik afferentlerin nöroplastisitesi hem somatik hem de viseral ağrı modellerinde, nörojenik inflamasyon ve nöronal filizlenmenin indüklenmesi yoluyla kanıtlanmıştır.^{7,128,149} Neonatal sıçanlarda mesane inflamasyonu; yetişkinlik döneminde inflamatuvar uyaranlara karşı aşırı duyarlılık ile sonuçlanmakta, AAM fenotipinin^{146,147,150} yanı sıra spontan veya mesane distansiyonu ile uyarılmış spinal viseral nosiseptif nöronların aşırı yanıtını indüklemektedir.¹⁴⁸

AAM, yetişkin sistit preklirik modellerinde, tirozin reseptör kinaz (Trk) A, Trk B ve Kalsitonin Gen İlişkili Peptit (CGRP) artışları ile ilişkili bulunmuştur^{151,152} ve yine bu değişikliklerin afferent terminallerin bulunduğu dokuda inflamasyonu kolaylaştırdığı tespit edilmiştir.¹⁵³ Ayrıca İS/MAS'lı hastalar, sağlıklı kontrollere göre serum ve idrarda daha yüksek NGF seviyelerine sahiptir.¹⁵⁴ Fare ürotelyumunda aşırı NGF ekspresyonu, aşırı nöronal innervasyona, artmış mast hücre sayısına ve mesane fonksiyonunda değişikliklere yol açar.¹⁵⁵ Bu bulgular, *in vivo* ve *in vitro* olarak kemirgen inflamasyon modellerinde¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ ve İS/MAS hastalarının mesanelerinde^{158,159} tanımlanmış nöronal terminallerin artan filizlenmesini açıklamaktadır.

2.2.3. Mikrobiyom/Kronik İdrar Yolu Enfeksiyonu

Mesane mikrobiyomunu oluşturan bakteri türlerindeki kaymalar, İS/MAS'ın hem varlığı hem de şiddeti ile ilişkilendirilmiştir.¹⁶⁰ Örneğin, İS/MAS'lı kadınlar sağlıklı kadınlara

göre daha az mikrobiyota çeşitliliğine sahiptir.¹¹⁹ İlginç bir şekilde, mesane mikrobiyomunda hastalar arası önemli değişkenliğe rağmen, antimikrobiyal özelliklere sahip *Lactobacillus*'ta İS/MAS hastalarında kontrollere kıyasla azalma yaygın bir bulgudur. Ayrıca, *Lactobacillus acidophilus*'un yokluğu, daha yüksek ağrı skorları ve İS semptom indeksinde daha yüksek skorlar ile ilişkilidir.¹¹⁹ Bu veriler, üriner mikro çevre ile afferent sinirler arasında muhtemelen ürotelyumun aracılık ettiği iletişimin varlığını desteklemektedir.⁹⁹

2.2.4. Organlar Arası Duyarlılık

İBS ve inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi kolon hastalıklarının, komşu bir organ olan ve herhangi bir patoloji saptanmayan mesanede ilerleyen süreçte patoloji gelişimine neden olabileceği ile ilgili kanıtlar mevcuttur.¹³⁹

Kolit fare modelinde, 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asidin (TNBS) rektum içine uygulanması, kolondaki afferent uçlardan omuriliğe kadar tüm periferik duyuusal yolun uyarılabilirliğini arttırmıştır.⁷ TNBS koliti sıkışma ve sıklık semptomlarında, mesane distansiyonuna karşı afferent duyarlılığında artışa neden olmuştur. Bu semptomlar, mesanede herhangi belirgin bir inflamasyon veya histolojik hasar yokluğunda ortaya çıkmıştır ve bu da devam eden İS/MAS semptomlarının değişen afferent duyarlılığıyla ilişkisini vurgulamaktadır.¹⁶¹

"Çapraz organ duyarlılığının" pelvik organların fizyolojik koordinasyonundan, torakolomber (TL) ve lumbosakral (LS) DKG ve omurilik içindeki ortak duyu yollarının kalıcı patolojik plastisitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.^{139,162} Kolonik innervasyon yapan DKG nöronlarının yaklaşık %15'i, aynı anda mesaneyi innerve etmekte¹⁶¹, spinal dorsal boynuz nöronları ise benzer oranda hem mesane hem de kolon distansiyonuna yanıt vermektedir.¹³⁹ Bu nedenle, kolonik afferent yolların duyarlılığı, mesane afferent yollarının uyarılabilirliğini doğrudan etkileme potansiyeline sahiptir. Gerçekten de çok yakın tarihli bir preklinik çalışmada, kronik kolonik afferent duyarlılığının mesane afferent duyarlılığına ve bunun da kontrolsüz işemeye neden olduğu gösterilmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, mesane fonksiyonundaki bu değişiklikler, sadece kolonu hedef alan terapötik bir tedavi ile tersine çevrilebilmiştir.¹⁶³

Ek olarak, koliti takiben kolonik afferent yollarda gelişen nörojenik inflamasyonun göstergesi olan birtakım nörokimyasal değişiklikler de meydana gelmektedir.¹³⁹ Çok sayıda çalışma, bu değişikliklerin, mesane, mesaneyi innerve eden DKG nöronları ve

omurilikte nöromodülatör NGF, Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF), CGRP ve yüksek afiniteli reseptör Trk-B'nin kalıcı olarak artması anlamına geldiğini göstermiştir.¹⁶⁴⁻

¹⁶⁸ Bu reseptörler ve nöropeptitler, pozitif geri besleme mekanizmasıyla birbirlerinin fonksiyonlarını düzenlemede, muhtemelen gangliyonlar içindeki parakrin etkileriyle mesane afferent uyarılabilirliğini artırmada, yani organlar arası duyarlılığa sebep olmada yakın bir ilişkiyi paylaşmaktadır.^{161,169}

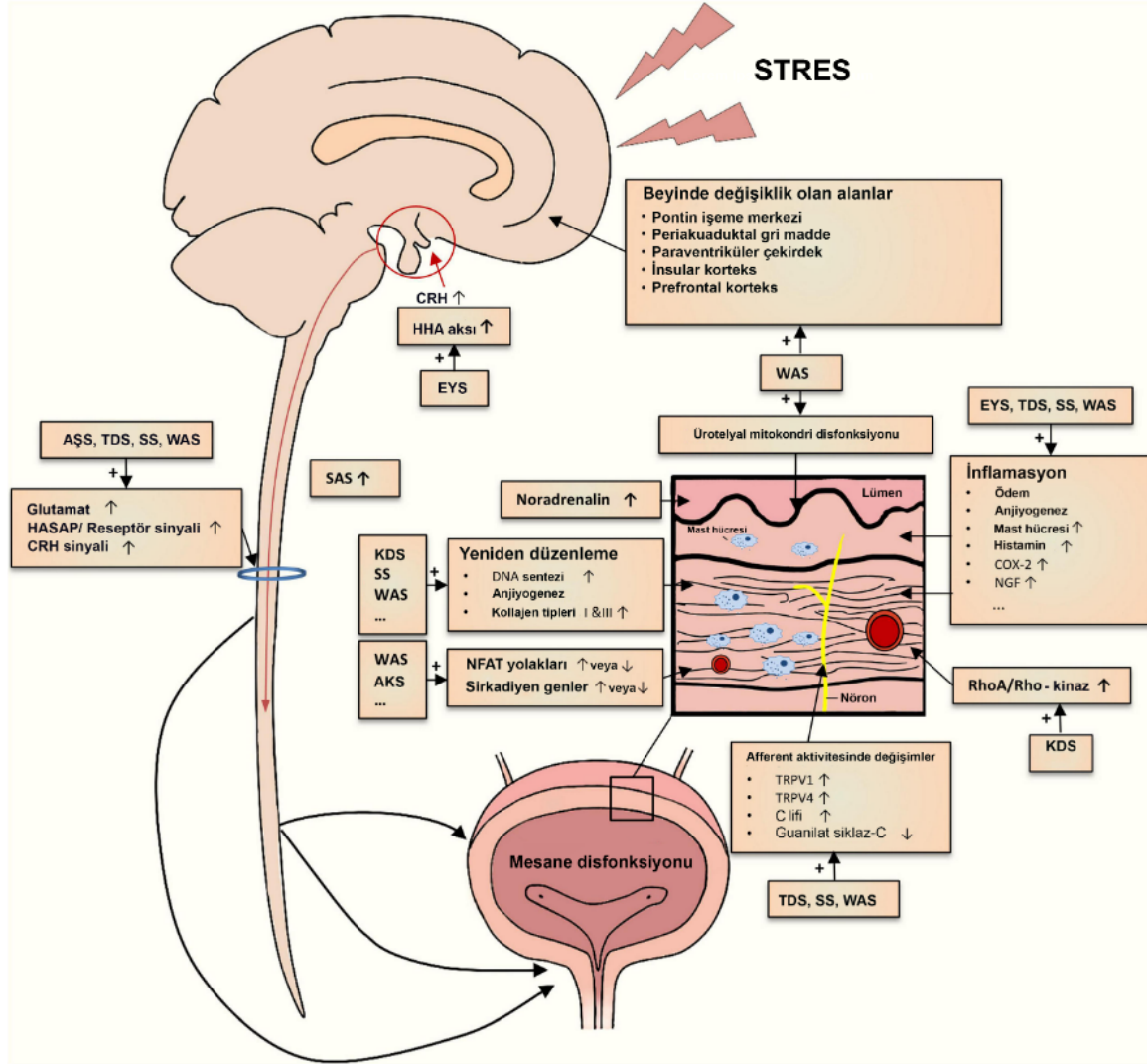
2.2.5. Kortikal Düzenleme: Stres, Anksiyete ve Depresyon

Mesane afferentlerinden gelen duyuşal sinyaller, limbik sistem (amigdala, hipotalamus, talamus, singulat girus), insula ve prefrontal korteksten gelen girdilerle modüle edildikleri PAG'da birleşir ve bu da hipotalamik hipofiz adrenal (HHA) eksenini tarafından modüle edilebilir.⁸⁰ Bu nedenle, kortikal ağlardaki değişiklikler veya duygusal afektif durumun modülasyonu, mesane hissi üzerinde derin etkilere sahip olabileceği gibi İS/MAS semptomlarının gelişimi ve devamlılığı altında yatan önemli bir mekanizma da olabilir.⁹⁹

İS/MAS'lı hastalar, süregelen erken yaşam stresini (EYS) takiben HHA eksenini düzensizliğinin bir sonucu olabilecek sağlıklı kontrollerden önemli ölçüde daha yüksek psikolojik stres seviyeleri bildirmektedir.¹⁷⁰ Çocukların EYS'ye maruz kalması, HHA anormallikleri gelişimi için önemli bir risk faktörüdür ve ilerleyen zamanlarda gelişecek depresyon ve anksiyete ile güçlü korelasyonlar gösterir.¹⁷¹ Bu amaçla, bir dizi çalışma, İS/MAS hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha yüksek EYS ve travma insidansı rapor ederken ¹⁷², klinik çalışmalar İS/MAS'lı hastalarda stres, anksiyete, depresyon ve mesane aşırı aktivite semptomları arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir.^{4,5} İS/MAS'lı hastalarda İS/MAS semptomlarının hem öncesi hem de sonrası döneme ait depresyon ve anksiyete prevalansı yüksektir; ancak hangisinin neden hangisinin sonuç olduğunu saptamak hasta kohortlarının net tanımlanamaması nedeniyle zor olmuştur.⁶ İS/MAS'lı kadınlarda bilişsel bozukluklarla olan ilişkiye ek olarak, beyin bölgeleri arasındaki iletişimi kolaylaştıran beynin beyaz cevherindeki yapısal anormallikler, semptom şiddetiyle yakından ilişkilidir.¹⁷³

Stres ve mesane bozuklukları arasındaki bağlantı, kemirgenlerde yapılan prelinik çalışmalarla, strese yanıt olarak oluşan mesane aşırı aktivitesine veya mekanik hiperaljeziye stresin tedavi edilmesinden sonra alınan olumlu yanıt ile desteklenmektedir. Ek olarak, bu aşırı duyarlılığın, duygusal işleme ve mesane kontrolü ile ilişkili beyin bölgelerindeki önemli değişikliklere bağlı veya bu değişiklikler ile korelasyonunun olduğu

tespit edilmiştir.^{127,174} Neonatal dişi fareleri annelerinden ayırma yöntemi ile oluşturulan EYS modeli, mesane distansiyonuna visseromotor yanıtları arttırmıştır.¹⁷⁵ Bu modellerde periferik afferent duyarlılığının stres sonucu oluşup oluşmadığı veya duyarlılığın sadece MSS içinde tahkim edilip edilmediği henüz tam olarak belirlenememiştir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Kronik psikolojik stres kaynaklı alt üriner sistem disfonksiyonu ve altında yatan olası mekanizmaların özeti.¹⁷⁶ Mevcut çalışmalar, mesane disfonksiyonuna katkıda bulunan merkezi ve periferik değişiklikleri göstermektedir. AKS; Aralıklı kısıtlama stresi, AŞS; Ayak şok stresi, COX-2; Siklooksijenaz-2, CRH; Kortikotropin salgılatıcı hormon, EYS; Erken yaşam stresi, HASAP; Hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit, HHA; Hipotalamik hipofiz adrenokortikal, KDS; Kronik değişken stres, NFAT; Aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü, NGF; Sinir büyüme faktörü, SAS; Sempatik-adrenal sistem, SS; Sosyal stres, TDS; Tekrarlanan değişken stres, TRPV1; Geçici reseptör potansiyeli vanilloid tip 1, TRPV4; Geçici reseptör potansiyeli vanilloid tip 4, WAS; Water avoidance stress (Sudan kaçınma stres protokolü).¹⁷⁶

2.3. İnterstisyel Sistit/Mesane Ağrısı Sendromu Deneysel Hayvan Modelleri

İS/MAS'ın patofizyolojisini daha iyi anlamak için birçok deneysel hayvan modeli üzerinde çalışılmıştır. Mevcut modellerde, intravezikal veya sistemik uygulamalar ile mesanede İS/MAS özellikleri taklit edilmeye çalışılmıştır. İS/MAS ile ilgili olabilecek çeşitli faktörleri incelemede üç farklı hayvan modeli yaygın olarak kullanılmaktadır.

- 1- Mesane merkezli modeller
- 2- Karmaşık mekanizmalara sahip modeller
- 3- Psikolojik ve fiziksel stresler / doğal modeller

İS/MAS'ın tüm yönlerinin tek bir model tarafından taklit edilemeyeceği açıktır. Modellerin her biri bulmacanın bir parçasına katkıda bulunmaktadır. İS/MAS patofizyolojisinin ve zaman sürecinin makul bir resmini yeniden oluşturmak ve böylece tedavi hedeflerini belirleyebilmek için birden fazla model gerekebilmektedir.⁹

2.3.1. Mesane Merkezli Modeller

Bu modeller (çoğunlukla sıçan ve fare), idrarda toksik bir maddenin bulunduğu durumları taklit ediyor gibi görünmekte ve hidroklorik veya asetik asit¹⁷⁷, aseton¹⁷⁸, akrolein (CYP'nin aktif metaboliti)¹⁷⁹, ksilen¹⁸⁰, hardal yağı, kroton yağı, terebentin¹⁸¹, protamin sülfat¹⁸², LPS¹⁸³, veya CYP¹⁸⁴ gibi tahriş edici maddelerin intravezikal uygulanmasını içermektedir. Ayrıca ürotelyal hedeflerin değiştirilmiş ekspresyonunu da içerebilirler (claudin'ler¹⁸⁵, antiproliferatif faktörler¹⁸⁶ ve üroplakin II¹⁷⁷). Akut mesane ağrısının yaygın olarak kullanılan mesane merkezli bir modeli, tek bir doz intraperitoneal CYP enjeksiyonu ile indüklenen sistit modelidir. İS/MAS'ın ağrı ilişkili davranış değişiklikleri, DAA ve inflamasyon aktivasyonu gibi birçok tipik özelliği enjeksiyon sonrası 24 saat içinde ortaya çıkmaktadır. Mesanede ödem, masif inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hemoraji ve mukozal erozyon görülür, bu da İS/MAS'dan ziyade akut hemorajik sistit modeli ile bu modeli daha alakalı kılar. Sıçan ve farelerde, düşük dozlarda çoklu sistemik CYP enjeksiyonları ile indüklenen ve belirgin davranış değişiklikleri olmaksızın kronik inflamasyonu ve hafif mesane ağrısını ortaya çıkaran kronik bir model tarif edilmiştir.^{187,188} CYP modelleri, kronik inflamasyonla ilişkili mesane nöronal yollarındaki patolojik değişiklikleri incelemek için kullanılmıştır. Bu modelin karakteristik patolojik değişikliklerinin altında yatan moleküler mekanizmalar birçok araştırmacı tarafından kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bununla birlikte, bu bulguların translayonel önemi açıklığa kavuşturulmamıştır.⁹

Lai ve ark., mesane distansiyonuna abdominal visseromotor yanıtını ölçerek dişi C57 farelerinde ortaya çıkan mesane hiperalejisini göstermiştir.¹²⁵ Sonuç olarak, bu veriler kronik CYP'nin neden olduğu mesane inflamasyonu ve ağrısı ile, prelinik İS/MAS araştırmaları için umut verici bir model olarak sunulmuştur.⁹ Golubeva ve ark., tekrarlayan sistemik CYP enjeksiyonlarına maruz bırakılan farelerin mesane dokusunda masif inflamatuvar infiltrasyon, doku kanamaları, mukozal ülserasyonlar veya ürotelyum kaybı belirtisi gözlenmeksizin lamina propriada ödem, proinflamatuvar sitokin gen ekspresyonunda orta derecede artış ve mastositoz ile karakterize hafif bir inflamatuvar yanıt geliştirdiğini göstermiştir.¹⁸⁹

Mesane merkezli modellerin belli sınırlamaları vardır ve daha çok mesanede neler olabileceğine odaklanır. Akut yüksek doz CYP uygulaması İS/MAS için tipik olmayan hemorajik sistite neden olduğu, kronik sistiti indükleyen düşük dozlu CYP'nin tekrarlayan dozda uygulanmasının ise İS/MAS'ı taklit etmede daha uygun bir model olduğu kabul edilmektedir.⁹ Buna ek olarak protamin sülfat gibi ürotelyuma selektif olamayan ajanlar sitoplazmik membranı hasara uğratarak hücre lizisine neden olabilmektedir. Bu da ürotelyal katmanın ötesine uzanan, hedeflenmeyen hücre tiplerinin hasarı ile sonuçlanabilir. Bu nedenle İS/MAS'ı modellemek için uygun ajanlar olarak kabul edilmemektedirler.¹⁹⁰ Bugüne kadar, mevcut mesane merkezli hiçbir model İS/MAS hastalarının spesifik epidemiyolojik bulgularını taklit etmeyi amaçlamış veya kronik stresin semptom şiddeti üzerindeki bilinen etkisini açıklayamamıştır. Mesane merkezli hayvan modelleri daha çok kronik inflamasyon ile ilişkili mesane yapılarındaki patolojik değişiklikleri ve altta yatan mekanizmaları aydınlatmada önemli görünmektedir.⁹

2.3.2. Kompleks Mekanizmalı Modeller

Karmaşık mekanizmalara sahip modeller, mesanedeki değişikliklerin, MSS aktivasyonu gibi mesane dışı sebeplerle meydana geldiği varsayımına dayanmaktadır. Kuyruğa psödorabies virüsünün (PRV) enjekte edilmesi, TNBS'nin kolona damlatılması, otoimmün modeller gibi MSS devrelerinin aktivasyonu ve çeşitli komorbid bozukluklar (Ör. Kronik pelvik ağrı ve vulvodini) yoluyla mesane değişikliklerine yol açarlar.^{161,191-193} Farelerde PRV enfeksiyonu, lamina propriada mast hücre birikimi ve pelvik ağrı ile ilişkili bir nörojenik sistit formunu indüklemektedir. Wang ve ark., mast hücrelerinin sistitteki rolünü araştırmak için İS/MAS'ın birçok klinik özelliğini yansıtan bir transgenik otoimmün sistit modeli kullanmışlardır. Sonuçlarının, mast hücrelerinin sistit ile ilişkili alt üriner sistem

disfonksiyonundaki rolü için doğrudan kanıt sağladığı ve belirli İS/MAS formlarını tedavi etmek için mast hücre inhibitörlerinin kullanımını destekleyen bir sonuca varmışlardır.¹⁹⁴

Bu modeller, sistit/mesane disfonksiyonuna katkıda bulunabilecek mekanizmalar hakkında ilginç bilgiler sağlayabilmektedir, ancak bunların İS/MAS için translasyonel değeri halen belirsizdir.⁹

2.3.3. Psikolojik ve Fiziksel Stresler / Doğal Modeller

Bu kategori, çeşitli stres modelleri (WAS, kısıtlama stresi), bir kedi İS/MAS modeli, norepinefrin enjeksiyonu ve çevresel sıcaklık veya ışığın manipüle edildiği modelleri içerir. Hayvanlar ağrı hissedip hissetmediklerini kendileri bildiremezken, çeşitli zararlı veya tahriş edici uyaranlara yanıt olarak davranışları gözlemlenebilir ve puanlanabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, çeşitli psikolojik ve fiziksel stres biçimleri de dahil olmak üzere bazı etmenlerin, kemirgenlerde analjezi veya hiperaljezi üretebileceğini göstermiştir. Ortam sıcaklığındaki ve sosyal faktörlerdeki farklılıklar bile ağrı araştırmalarındaki ölçümleri değiştirebilmektedir. Psikososyal stres, birçok komorbid hastalık ve fibromiyalji, cilt hastalıkları, astım ve IBS gibi diğer hastalıklar üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilmektedir. Çok sayıda araştırma, stresin (cilt, mesane ve bağırsak) beyin eksenindeki iletişimi önemli ölçüde değiştirebileceğini ve bu sinyal mekanizmalarını hedeflemenin sağlığı ve hastalığı etkileyebileceğini ortaya koymuştur.^{5,195,196} Ek olarak, İS/MAS hastaları, duyuşsal algı ve ağrıya katıldığı bilinen beyin bölgelerinde, mesane dolumu ile artmış işlevsel beyin aktivasyonu sergilemektedir. Bu bağlamda, anksiyeteye yatkın sıçanlarda kronik WAS'ın İS/MAS teşhisi konan insanlarda gözlenenlere benzer bir dizi klinik ve işlevsel özellik ile sonuçlanabileceğine dair kanıtlar vardır. Çalışmalar, kronik psikolojik stresin idrar sıklığını, kronik mesane hiperaljezisini, taktil arka pençe allodinisini ve suprapubik hiperaljeziyi indüklediğini göstermiştir.^{197,198} Bu modeller aynı zamanda sıkışmaya yanıt veren işeme refleksi arklarının artmış katılımını da ortaya çıkarmıştır.¹⁷⁴ WAS modelinin ayrıca, hem AÜSS hem de İS/MAS ile ilişkili komorbid bir durum olabilen İBS için bir model olarak gastrointestinal sistemde değişiklikler sergilediği gösterilmiştir.

Psikolojik stresi İS/MAS gibi fonksiyonel ağrı sendromlarıyla ilişkilendiren olayların sırası netleştirilmemiş olsa da otonom sinir sistemi sempatik bölümündeki aktivasyonunun anahtar bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Sempatik sistemin tutulumu, karmaşık bölgesel ağrı sendromu ve fibromiyalji dahil olmak üzere bir dizi kronik ağrılı durum rapor

edilmiştir. Çalışmalar, sempatoadrenal stres ekseninin sadece indüksiyonda değil, aynı zamanda devam eden mekanik hiperaljezide de rol oynayabileceğini ortaya koymuştur. Adrenerjik stimülasyonun, hem mesane fonksiyonu üzerindeki uzun süreli etkilere hem de kolorektal distansiyon açısından pelvik iç organların aşırı duyarlılığına aracılık ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, kronik stres, stresin ağrı semptomlarının şiddetini ve süresini arttırdığı bir mekanizma olabilen, sempatik sinir aktivitesini değiştiren sinir sisteminde kalıcı değişikliklerle sonuçlanır.⁹

WAS modeli sık idrara çıkma, mesane hiperaljezisi ve yüksek stres yanıtı ile karakterizedir.^{174,199} WAS modeli, mukozada inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve yüzeysel şemsiye hücrelerin kaybından dolayı ürotelyal yüzeyde düzensiz bir azalma gösterir.

Charrua ve ark. fenilefrinin 14 gün boyunca her gün deri altından verildiği bir model kullanmıştır. Fenilefrin uygulaması viseral ağrıyı, spinal Fos ekspresyonunu, mesane refleks aktivitesini, işeme sıklığını ve defekasyon sayısını artırmıştır. Ayrıca mukoza ürotelyal incelme gösterirken subürotelyumda da mastositoz mevcuttur. Sempatik sinir yoğunluğu ve idrar noradrenalin seviyeleri artmıştır. Bu modelde indüklenen ağrı silodosin tarafından tersine çevrilmiştir.²⁰⁰

WAS ve fenilefrin modelleri şu anda en ilgi çekici modeller olarak görülmektedir; çünkü bunlar sadece mesane değişikliklerini değil, aynı zamanda İS/MAS hastalarında bulunabilecek sistemik değişiklikleri de (ör. Merkezi duyarlılaşma) göstermektedir. Ek olarak Kronik Pelvik Ağrı Çalışmasında Multidisipliner Yaklaşım (MAPP-CPP) Araştırma Ağı, ürolojik kronik pelvik ağrı sendromunu incelemek için hayvan modellerini değerlendirmiş; WAS modelinin, insan durumunun stres değişkenliğini yansıttığını ve hastalarda ortaya çıkan temel semptomların çoğunu sergilediğini rapor etmişlerdir.^{201,202}

2.4. Mesane İşlev Bozukluğu ve Pürinerjik Yolak

Profesör Geoffrey Burnstock pürinerjik yolak üstüne birçok araştırma yapmıştır. Pürinerjik yolağın birçok hücre, doku ve sistemdeki görevi aydınlatılmıştır. ATP'nin nöronlar ve diğer hücrelerden salındığı, mesane de dahil olmak üzere birçok ortamda otokrin ve parakrin haberleşmeye aracılık ettiği ve alt üriner sistem fizyolojisinde önemli bir rolü olduğu artık iyi bilinmektedir.^{10,11} Mesanenin gerilmesi üzerine ürotelyum ve diğer mukozal hücrelerden salınan ATP, mesane dolumunun lokal olarak algılanmasında duyuşal iletim sisteminin bir parçası olarak aracılık etmektedir.¹²

İnsan olmayan memeli *ex vivo* mesane preparatlarında elektriksel alan uyarısı (EAU) çalışmalarında gösterildiği gibi ATP, intramural sinirlerden ACh ile birlikte salınır ve burada detrusor kasılması için post-sinaptik olarak etki eder.²⁰³ İlginç bir şekilde, ATP, yetişkin insan normal detrusorunun EAU uyarılmış kontraktıl aktivasyonunda önemli bir rol oynamaz; bununla birlikte, patolojinin bir nedeni veya sonucu olarak rolünde değişiklikler olmaktadır.²⁰³

Ek olarak, insan harici memeli mesanesinde atropine dirençli, ATP aracılı EAU-kasılması, mesane çıkım tıkanıklık modellerinde artış göstermiş ve bu da ATP'nin patolojik mekanizmalara katılımının kanıtını sağlamıştır.³

2.4.1. Pürinler: Alt Üriner Sistemde His ve Ağrı

ATP'nin topikal olarak uygulandığı çalışmalardan, afferent nöronların ateşlemesini arttırdığı ve algojenik olduğu yani hücre dışı ATP'nin duysal ve nosiseptif bir mediatör olarak görev gördüğü kavramı ortaya çıkmıştır.¹³ Hücre içi Ca^{2+} artışına neden olan iyonotropik pürinoseptörlerin, özellikle P2X3 veya heterotipik P2X2/3 reseptörlerinin, duyu nöronları üzerinde gösterilmesi ile epitelyal hücreler tarafından salınan ATP'nin hangi yolak üzerinden nöral yanıtları oluşturduğu açıklığa kavuşturulmuştur.^{14,15} P2X3 reseptörü nakavt farelerin kullanıldığı deneyler ile P2X3 reseptör yokluğunda mesane dolumunda afferent ateşlemenin azalması ile P2X3 reseptörünün mesane duvarının gerilmesi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir.²⁰⁴

P2X2/P2X3 reseptörleri kedi²⁰⁵, sıçan²⁰⁶ ve insan²⁰⁷ mesane doku örneklerinde tespit edilmiştir. Ruan ve ark. kedi intramural gangliyonlarında, rolleri henüz açıklığa kavuşturulmamış çok çeşitli P2X (P2X1-7) ve P2Y (P2Y1,2,4,6,12) reseptörlerin keşfinde bulunmuştur.²⁰⁸ İnsan doku örneklerinde, nöronlar üzerinde P2X2/P2X3 reseptör ekspresyonunun önemli ölçüde plastisitesi gösterilmiştir.²⁰⁹ Ayrıca, idiyopatik veya nöropatik DAA'nın tedavisinde kullanılan *botulinum* toksini ile tedavi edilen hastaların nöronlarında azalmış P2X3 reseptör ekspresyonu ile yine bu hastalarda azalmış sıkışma ataklarının önemli ölçüde korele olduğu görülmüştür.²⁰⁷

İlgi çekici bir şekilde, ATP-P2X2/3 reseptörün mesane duvarı duysal yolundaki önemine ilişkin bir görüş daha yakın zamanda sunulmuştur. Bu yolağın patolojik durumlarda (örneğin ürotelyumdan ATP salınımının LPS tarafından artırıldığı durumlar) önem kazandığı belirtilmiştir. Bu çalışmada, P2X2 veya P2X3 reseptörünün tekli nakavtının, vahşi tip hayvanlarla karşılaştırılmasında kontraksiyonlar arası süre veya işeme

etkinliği üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. Ancak LPS ile mesane inflamasyonu indüklendiğinde kontraksiyonlar arası süre sadece bu reseptörleri olan vahşi hayvanlarda kısalmıştır.²¹⁰

Mesane duvarının fiziksel veya kimyasal streslere yanıt olarak ATP salgıladığı konusunda fikir birliği vardır. Duyusal yanıtlarla ilişkili ATP'nin kaynağının çoğunun mukoza olduğu saptanmıştır. Ürotelyum üç hücre katmanı olmak üzere sırasıyla apikal, orta ve bazal tabakalarına sahiptir. Bunların hepsi ATP salınımında eşit kapasitededir. Ayrıca apikal hücreler idrarı alttaki dokulardan ayırmak için etkili bir engel oluşturur.¹⁰⁶ Subürotelyum: fibroblastlar, miyofibroblastlar, interstisyel hücreler, yoğun bir damar ağı, ürotelyuma ulaşan afferent sinir liflerinden oluşan kompleks bir yapıdır. Bu kompleks, eksojen ATP üretebilen ve bunlara yanıt verebilen işlevsel bir yapı (duyusal ađ) oluşturur.²¹¹

Ürotelyal ATP salınımı için transmembran Ca^{2+} akışı yoluyla hücre içi Ca^{2+} 'nın artması gereklidir.²¹² Ürotelyal hücrelerde gerilme ile aktive olan katyon seçici iyon kanalları tarif edilmiştir: epitelyal Na^+ kanalları (ENaC); TRP ailesinin üyeleri²¹³⁻²¹⁵; asit duyarlı iyon kanalları (ASIC)²¹⁶ ve Piezzo^{217,218} kanalları. Bunlar doğrudan Ca^{2+} akışını indükleyebilir veya Na^+ akışını başlatabilir ve bu da L-tipi Ca^{2+} kanallarının aktivasyonu veya Na^+ / Ca^{2+} değişimi yoluyla Ca^{2+} akışını başlatabilir.

Birçok çeşitte kimyasal ve biyolojik ajan, ürotelyal kaynaklı ATP salınımını modüle eder ve yine birçoğu, AAM veya İS/MAS ile ilişkili semptomları hafifletmek amacıyla araştırılmaktadır. Çoğu ajan mekanik-duyarlı iyon kanallarının aktivasyon yolağını hedeflemektedir. Mesane doku örneklerinde asidoz, kısmen TRPV1 ve ASIC aktivasyonu üzerinden ATP salınımını önemli ölçüde arttırmıştır.²¹⁹ Bir TRPV1 agonisti olan kapsaisin, ilk başta etkinleştirmeye uzun süreli maruz bırakılma da ise kanalı duyarsızlaştırmaya neden olmuştur.¹⁰ Kapsaisinin ürotelyumdan ATP salınımını arttırdığı, TRPV1 antagonisti kapsazepinin ise bu etkiyi ortadan kaldırdığı gösterilmiştir.

Ürotelyumda daha belirgin olmak üzere endotelyal hücrelerde ATP kaynaklı ATP salınım yolağı Burnstock ve ark. tarafından ortaya konmuştur. Ürotelyum, ATP'nin daha fazla salınmasına katkıda bulunabilecek çeşitli P2X ($P2X_{1-7}$) ve P2Y ($P2Y_{1,2,4}$) pürinerjik reseptörlerini eksprese etmektedir.^{205,220} Fonksiyonel deneylerde ürotelyum, endojen ATP'den ADP ve AMP üretebilen ektoATPaz ekspresyonu ve hücre içi depolardan Ca^{2+} 'yı

serbest bırakmada P2Y reseptör aktivasyonu ile önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, iyonotropik P2X reseptörlerinin rolü göz ardı edilemez.²²¹

Ürotelyal hücrelerde hem muskarinik hem de nikotinik reseptörler bulunur ve her ikisinin de ACh ile aktivasyonu ATP salınımına yol açar. ACh daha çok M2 reseptörü üzerinden bu etkiyi yaratır. Bu gözlemler, kolinerjik ve pürinerjik yollar arasında önemli etkileşimler olduğunu ve AAM semptomların tedavisinde kullanılan antimuskarinik ajanların mesanenin duysal sinyalizasyonunda da potansiyel önemli bir hedef olabileceğini düşündürmüştür.²²²

Mesane ve prostat kaynaklı pelvik ağrı sendromları ile potansiyel ilişkisi nedeniyle, inflamasyon ve pürinerjik yollar arasındaki bağlantıya önemli ölçüde odaklanılmıştır. İS/MAS tanısı alan hastaların kontrollere kıyasla biyopsi örneklerinde ATP salınımının artışı gösterilmiştir.²²³ Genel olarak, inflamasyonu ve ilişkili mesane ağrısı durumlarını modelleyen koşullar altında artmış afferent sinir aktivitesinin yanı sıra mesane duvarından ATP salınımının arttığı açıktır.²²⁴ Bununla birlikte, bu iki fenomen arasındaki nedensel ilişki tam olarak tanımlanmayı beklemektedir.

İdiyopatik DAA²²⁵, diabetes mellitus'un neden olduğu DAA²²⁶, omurilik yaralanmasından kaynaklanan nöropatik DAA²²⁷ veya iyi huylu prostat hiperplazisine bağlı mesane çıkış tıkanıklığı²²⁸ dahil olmak üzere birçok alt üriner sisteme ait patoloji artmış ATP salınımı ile ilişkilidir. ATP salınımındaki değişikliklerin bu durumların nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu henüz kanıtlanmamıştır.

2.4.2. Pürinler: Detrusor Kasılması ve Modülasyonu

Mesane, spontan aksiyon potansiyelleri, spontan geçici depolarizasyonlar ve spontan kasılmalar şeklinde spontan elektriksel ve mekanik aktivite sergilemektedir. Bu aktivitenin, nörotoksin tetrodoksine (TTX) veya bir kolinerjik, adrenerjik ve pürinerjik reseptör antagonistleri kokteyline karşı duyarsızlığı nedeniyle, genellikle miyojenik kökenli olduğu kabul edilirdi.²²⁹ Ayrıca bu aktivite tek başına işeme için yeterli kasılmalara yol açamayan ancak idrar boşaltımı için optimal mesane şeklini koruyabilen düşük amplitüdlü durumları temsil etmektedir.²³⁰ Spontan kasılmalar detrusor düz kasının bir özelliğidir. Kobay detrusor kasındaki spontan elektriksel dalga sıklığının ATP tarafından artırıldığı mikroeletrot kayıtlarında saptanmıştır. Fare mesanesinde ATP'nin spontan nöronal salınımı ile spontan aksiyon potansiyeli oluşumu tetiklemesi, ATP'nin düz kas hücreleri üzerindeki NF449'a duyarlı P2X1 reseptörlerine bağlanması ardından katyon akışı ile

depolarizasyonun sağlanması bu depolarizasyonun aynı zamanda L-tipi Ca^{2+} kanallarını aktive etmesine dayandırılmıştır.²³¹ Yazarlar, kayıtların yapıldığı fare mesanesinde, spontan aksiyon potansiyellerinin miyojenik kökenli olmaktan ziyade, ATP'nin spontan nöronal salınımı ile meydana geldiği sonucuna varmışlardır. Bununla tutarlı olarak, izole edilmiş kobay detrusor düz kasına (mukoza yok) ilişkin bir çalışmada, spontan kasılma sıklığının ve genliğinin ATP'deki geçici artışlarla, detrusordaki sinir terminallerinden ATP'nin spontan salınımı yoluyla ilişkili olduğu bulunmuştur.^{232,233}

Spontan aktiviteyi etkilemeye ek olarak, pürinerjik aracılı mukozal sinyalizasyon, EAU aracılı detrusor kasılmalarının amplitüdünü de etkileyebilmektedir. EAU kasılmaları, *ex vivo* olarak ışınlanmış tam kalınlıkta kobay mesane şeritlerinde, ışınlanmamış şeritlere göre daha düşük amplitüdlü iken; mukozadan arındırılmış şeritlerle yapılan karşılaştırma ise, radyasyonun mukoza olmadığında EAU kasılmalarını etkilemediğini ve radyasyona duyarlı mukozal modülasyonu desteklediğini göstermiştir.²³⁴

Özet olarak bu çalışmalar ürotelyum merkezli pürinerjik yolağın modülasyonu ile detrusor kasılmalarının etkilenebileceğini ortaya çıkarmıştır.

2.5. Kemirgenlerde Ağrı Davranışlarını Değerlendirmek İçin Kullanılan Yöntemler

İnsanlarda ağrı araştırmalarının yapılması zordur, öznel ve etik düşüncelerle sınırlıdır, bu da fareler ve sıçanların ağrıyı araştırmak için model olarak yaygın şekilde kullanılmasına yol açar.²³⁵ Bununla birlikte, hayvan modellerinin kullanımıyla, insanlarda ağrıya eşdeğer kabul edilebilecek davranışsal tepkilerin nicelleştirilmesiyle ilgili zorluklar ortaya çıkmaktadır. Hayvanlar insanlardan farklı olarak ağrıyı sözel olarak ifade edemezler. Bu nedenle hiçbir testin hayvanlardaki ağrıyı doğrudan ölçemeyeceğine dikkat edilmelidir.²³⁶ Hayvanlarda hoş olmayan duygusal ağrı deneyimi; bir vücut parçasının bir uyarandan geri çekilmesi, etkilenen bölgenin tımarlanması, azalmış ambulator hareket ve ajitasyon artışını içerebilen ağrı benzeri davranışlardan çıkarılır. Kemirgenlerde ağrı doğrudan ölçülemediğinden, anestezi uygulanmamış hayvanlarda ağrı benzeri davranışları ölçmek ve değerlendirmek için güvenilir, tekrarlanabilir, hassas ve spesifik dolaylı yöntemler geliştirmek gerekli olmuştur.²³⁵

Nosisepsiyon terimi; mekanik, termal, elektriksel veya kimyasal olan ve dokuya zarar verme potansiyeli olan herhangi bir uyarıyı kapsayan zararlı uyarılara verilen periferik nöronal yanıtı tanımlamak için kullanılır.²³⁷ Tipik olarak zararlı uyarılar, zararlı uyarıları elektrik sinyallerine dönüştüren bir dizi özel iyon kanalı ve reseptöre sahip olan

periferik duyu nöronlarının bir alt kümesi olan nosiseptörleri aktive eder. Nosiseptif sinyaller daha sonra ağrı hissi olarak işlenmek üzere omuriliğe ve beyne gönderilir. Dolayısıyla ağrı hem duyuşal hem de duygusal bileşenleri kapsayan bir deneyimdir; bu nedenle ağrı terimi nosisepsiyon yerine kullanılamaz.

Ağrı, hayvan çalışmalarında nosisepsiyon miktarını ölçmek için en sık kullanılan yöntem olan bir nosiseptif uyarandan çekilme gibi "ağrı benzeri" davranışlardan çıkarılır. Normalde geri çekme yanıtı uyandırmayan bir uyarın uygulanırsa ve hayvan uyarandan çekilirse, hayvanda allodini olduğu kabul edilir. Benzer şekilde, normalde bir geri çekilme tepkisi uyandıran bir uyarın uygulanırsa, ancak hayvan abartılı bir tepkiyle geri çekilirse, hayvanda hiperaljezi olduğu kabul edilir.²³⁸

2.5.1.Açık Alan Testi

İlk kez 1934 yılında Hall tarafından sıçanlarda tanımlanmıştır.²³⁹ Yapılan ilk deneylerde sıçanın açık alana konulmasıyla birlikte oluşın dışkılama sayısı ile ürkeklik arasındaki ilişki incelenmiştir. Deneklerin alışık olduğu ortamdan alınarak yeni çevreye konulmaları, deneklerde grup ya da sürüden ayrılma ve açık alana bırakılma anksiyetesine yol açmaktadır. Açık alan testi uygulama alanları farklı ebatlarda ve şekillerde olabilir. Araştırmacılar tarafından dairesel, dikdörtgen ve kare formları kullanılmıştır. Bütün düzeneklerde merkez ve periferik olmak üzere iki ayrı bölge tanımlanmıştır.

Denek her zaman test düzeneğindeki merkez bölgeye konularak deneye başlanır. Anksiyetenin azalmasına bağılı olarak merkez bölgeye girme sayısı ve merkez bölgede geçirilen süre artar. Aksine anksiyete artışı ile periferik bölgede geçen süre artmaktadır. Açık alana konan hayvanlarda anksiyete artışına bağılı olarak sınırları belirli testin duvar ve köşelerine kaçma, periferde vakit geçirme isteğı görülür. Bu davranışa “*thigmotaxis*” denmektedir.²⁴⁰ Açık alan testinde anksiyete ölçümü ile ilgili birçok davranış (iki ayağı üzerine kalkma, kaşınma, gezinme vb.) ve parametre belirtilmiştir. Bunlardan en önemlilerinden birisi iki ayağı üzerine kalkma davranışıdır. Açık alana konan hayvanlarda yeni çevre hem merak uyandırmakta hem de anksiyeteye yol açmaktadır. Her iki duygunun çatışmasında merak duygusunun daha ağır basması durumunda hayvan yeni çevreyi araştırma davranışı olarak iki ayağı üzerine kalkma davranışını (*rearing*) yapmaktadır. İki ayağı üzerine kalkma davranışı dışında toplam katedilen mesafe, bölme değıştirme sayısı, periferde geçen süre, havayı koklama davranışı, kazıma, kaşınma, dış gıcırdatma, dışkılama miktarı ve ürinasyon varlığı da incelenmektedir. Açık alan testi genel olarak bir

kez ve beş dakika uygulanmasına karşın, farklı araştırmalarda on dakikaya kadar uygulanmaktadır.

2.5.2.Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

1955 yılında Montegomery tarafında Y şeklinden oluşan bir form olarak tanımlanmıştır. Daha sonra 1984 yılında Handley ve Mithani, 1985 yılında ise Pellow ve ark. tarafından modifiye edilerek yerden genellikle 50-70 cm yüksekliğinde, artı şeklinde açık ve kapalı kollardan oluşan şekli oluşturulmuştur.^{241,242} Yükseltilmiş artı labirent testinde sıçan ya da fare açık alan testinde olduğu gibi merkez bölgeye konulur. Merkez bölge iki açık iki kapalı kolun kesiştiği bölgedir. Kafesinden alınan denekte yeni çevre ve yükseklik anksiyeteye yol açmaktadır.²⁴³ Artan anksiyete bağlı olarak kapalı kolda geçen süre, kapalı kola girme sayısı, kapalı kolda geçen sürenin yüzdesi artar. Anksiyetenin azalmasına bağlı olarak da açık kolda geçen süre ve açık kola girme sayısı artmaktadır.

2.5.3.Kuyruk Çekme Testi (*Tail Flick*)

İlk olarak 1941’de tariflenen kuyruk çekme testi, fare ve sıçanların kuyruğuna bir ısı uyarısının uygulanmasını içerir ve kuyruğun "titremesi" veya "seğirmesi" için geçen süre kaydedilir.²⁴⁴ Uygulanan ısı uyarısı, odaklanmış bir ışık huzmesinin kuyruğa uygulandığı radyan ısı veya kuyruk uzak ucunun 46-52 °C arasında sabit sıcaklıkta ayarlanmış bir sıcak su banyosuna daldırılması şeklinde olabilir. Testin her iki versiyonu da hayvanın gevşek bir şekilde tutulmasını gerektirmektedir.

2.5.4.Sıcak Plaka Testi (*Hot Plate*)

İlk olarak 1944’te tariflenen sıcak plaka testi, farelerde ve sıçanlarda ısı eşiklerini belirlemek için kullanılabilmektedir.²⁴⁵ Kuyruk çekme testine karşılık, sıcak plaka testi ve arka pençelere ısı uyarıları uygulayan diğer testler supraspinal yollar ile daha fazla ilişkilidir. Geleneksel sıcak plaka testinde, sabit bir sıcaklıkta, genellikle 50-55 °C arasında tutulan metal bir yüzey üzerine dizginlenmemiş bir fare veya sıçan yerleştirilir ve tepki gecikmesi, yani bir nosiseptif davranışı gözlemlemek için geçen süre (*latency*), araştırmacı tarafından kaydedilir. Nosiseptif davranışlar, ön patiyi çekme veya yalama, arka patiyi çekme veya yalama ve zıplamayı içermektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deneysel Tasarım

Bu çalışma için Kocaeli Üniversitesi hayvan araştırmaları komitesi tarafından etik kurul onayı (Karar no: 5/1-2021) alınmıştır. Altmış dört adet 10-12 haftalık genç yetişkin dişi Wistar albino sıçan (200-250 g ağırlığında) Kocaeli Üniversitesi deney hayvan laboratuvarından elde edilmiştir. Sıçanlar 12 saatlik gece/gündüz döngüsünde 21 ± 2 °C de takip edilmiştir. Deneklere su ve standart laboratuvar diyeti (*ad libitum*) sağlanmıştır. Toplam 64 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan; kronik CYP ve kronik sudan kaçınma stres (WAS) deneysel İS/MAS modelleri için ikiye ayrılmıştır (n=32). Her iki model için sıçanlar; Kontrol, Kontrol+AF219, İS/MAS ve İS/MAS+AF219 olmak üzere 4 gruba randomize (n=8, her grup için) ayrıldı. Daha önce bir sıçan osteoartrit ağrı modelinde AF219 kullanılmış, uygulama yöntemi olarak oral-gavaj ve doz miktarı olarak günlük 10 mg/kg belirlenmiştir.³⁴ Bizim çalışmamızda da bu uygulama yöntemi ve miktarı kullanıldı.

3.1.1. CYP-İS/MAS Modeli

Ortalama ağırlığı $229,31\pm 8,185$ olan 32 adet sıçan kullanılmıştır. İS/MAS ve İS/MAS+AF219 gruplarına daha önce tanımlanmış protokole uygun olarak CYP 75 mg/kg 1 ml 3 günde bir (1,4 ve 7. günlerde) toplam üç doz intraperitoneal (i.p.) uygulanmıştır²⁴⁶⁻²⁴⁸. Kontrol ve Kontrol+AF219 gruplarına aynı sıklıkta ve dozda i.p. 1 ml serum fizyolojik (%0,9 izotonik sodyum klorür solüsyonu) uygulandı. Kontrol+AF219 ve İS/MAS+AF219 gruplarına 6,7 ve 8. günlerde saat 09:00'da 10 mg/kg AF219 (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, ABD), sodyum karboksimetil selüloz (KMS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) içerisinde süspende edilerek toplam üç doz oral gavaj olarak (Şekil 3.1.), Kontrol ve İS/MAS gruplarına yine aynı günlerde sadece KMS 1cc oral gavaj olarak uygulandı. Sekizinci gün oral gavajdan 1 saat sonra ağrı/anksiyete benzeri davranış deneylerine geçildi. Açık alan, lokomotor aktivite ölçümü, yükseltilmiş artı labirent, kuyruk çekme (*tail flick*) ve sıcak plaka (*hot plate*) testleri gerçekleştirildi.

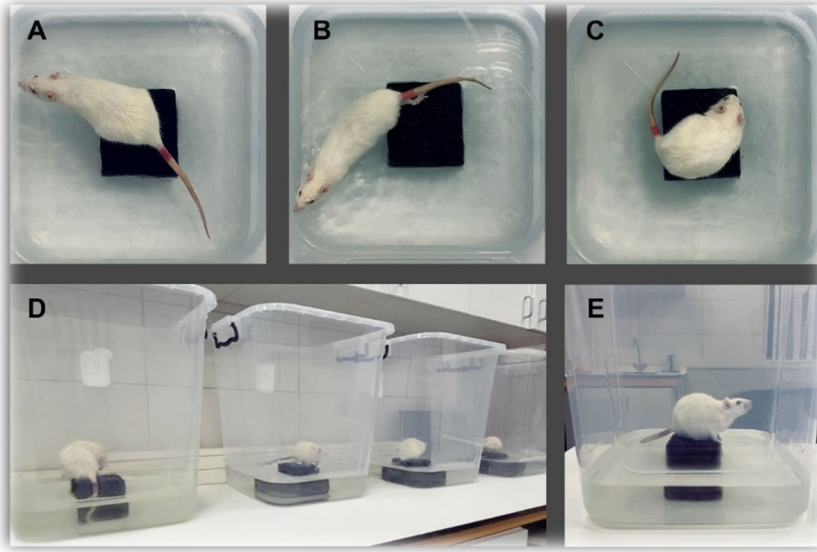
3.1.2. WAS-İS/MAS Modeli

Ortalama ağırlığı $228,72\pm 12,269$ olan 32 adet sıçan kullanılmıştır. İS/MAS ve İS/MAS+AF219 gruplarına daha önce tanımlanmış protokole uygun olarak^{199,249} 10 gün boyunca günde 1 saat $30\times 25\times 40$ cm ebatlarında, içi 7 cm derinliğinde suyla doldurulmuş pleksiglas kutuların merkezine yerleştirilmiş $10\times 8\times 8$ cm platformun üzerinde bekletildi.

(Şekil 3.2.) Kontrol ve Kontrol+ AF219 grupları ise su konulmamış havuzlarda 1 saat bekletildi. Protokol her gün saat 10:00'da gerçekleştirildi. Kontrol+AF219 ve İS/MAS+AF219 gruplarına 9,10 ve 11. günler saat 09:00'da 10 mg/kg AF219 (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, ABD), sodyum karboksimetil selüloz (KMS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) içerisinde süspande edilerek toplam üç doz oral gavaj olarak, Kontrol ve İS/MAS gruplarına yine aynı günlerde sadece KMS 1cc oral gavaj olarak uygulandı. On birinci gün oral gavajdan 1 saat sonra ağrı/anksiyete benzeri davranış deneylerine geçildi. Açık alan, lokomotor aktivite ölçümü, yükseltilmiş artı labirent, kuyruk çekme ve sıcak plaka testleri gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. P2X3 reseptör antagonisti AF219'un (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, ABD) oral gavaj olarak uygulanması.



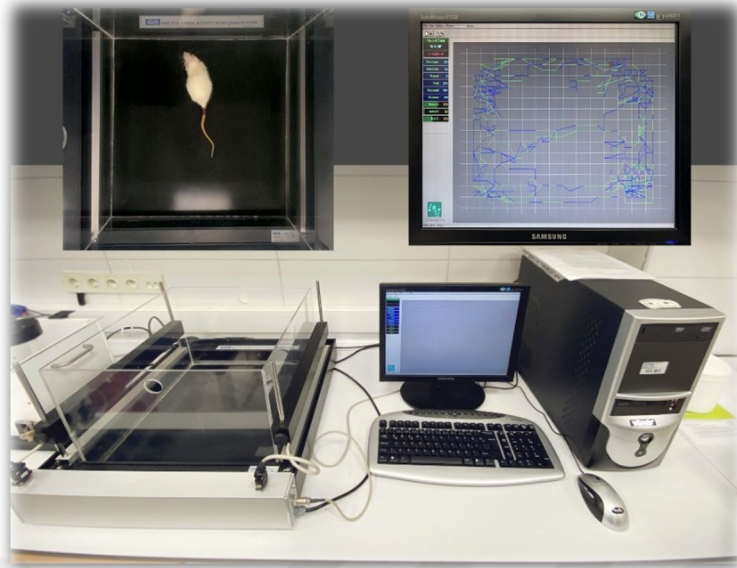
Şekil 3.2. Sudan Kaçınma Stres (WAS) Protokolü. A. Platform üzerine bırakılan sıçan; B. Çevreyi keşfetme içgüdüsü ile hareket ederek su içene giren sıçan görüntüsü; C. Kendini koruma içgüdüsü ile hızlı bir şekilde tekrar platform üzerine çıkan sıçan görüntüsü; D. Aynı anda sıçanlara WAS protokolünün uygulanması; E. Platform üzerinde kalmaya çalışan sıçanın yandan görüntüsü.

3.2. Davranış Deneyleri

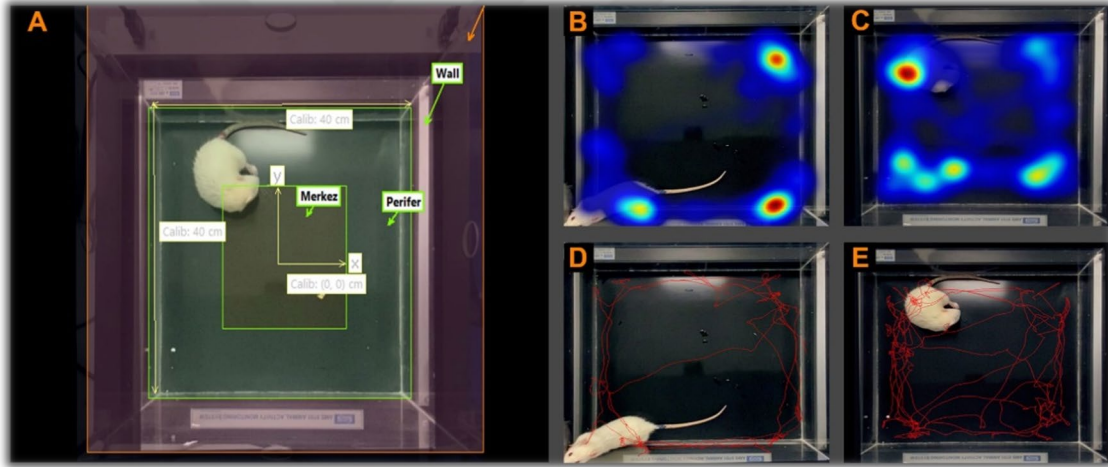
Her deneğe ait ağrı/anksiyete benzeri davranış deneyleri video kamera ile kaydedilmiş ve bu kayıtlar arşivlenmiştir. Deneylere açık alan testi ve lokomotor aktivite ölçümü yapılarak başlanmış, bu deney sırasında total lokomotor aktivitesi gruptan anlamlı olarak düşük olanlar (hangi gruptan olduğu bağımsız), azalmış lokomotor fonksiyonun test sonuçlarına etki edebileceği ve yanlış sonuçlara yol açabileceği nedeniyle sonrasında yapılacak diğer ağrı/anksiyete benzeri davranış deneylerine dahil edilmemiştir.

3.2.1. Açık Alan Testi ve Locomotor Aktivite Ölçümü Deneyi

Locomotor aktivite, bir pleksiglas kutu (40x40x30 cm) ve açık alan aktivite yazılımı içeren bir bilgisayardan oluşan sistem (May AMS 9701, Commat Ltd., Ankara, Türkiye) ile değerlendirildi (Şekil 3.3.). Toplam lokomotor aktivite, hayvanların 5 dakika boyunca vertikal, ambulator ve stereotipik aktivitelerinin toplamı olarak tanımlandı. Ayrıca video kayıt ve Ethovision XT 11.5 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, ABD) yazılımı ile merkez ve perifer alan sınırları belirlenerek deneklerin bu alanlarda geçirdikleri süreler ayrı olarak otomatik analiz edildi (Şekil 3.4.). Bunlara ek olarak deney sırasında dışkılama sayısı not edildi.



Şekil 3.3. Lokomotor aktivite izleme sistemi. (May AMS 9701, Commat Ltd., Ankara, Türkiye)



Şekil 3.4. Açık Alan Testi. A. Ethovision XT 11.5 (*Noldus Information Technology*, Leesburg, VA, ABD) yazılımı. B. Yüksek anksiyete benzeri davranış; C. Normal keşif benzeri davranış. D. Yüksek anksiyete benzeri davranış; E. Normal keşif benzeri davranış.

3.2.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Deneyi

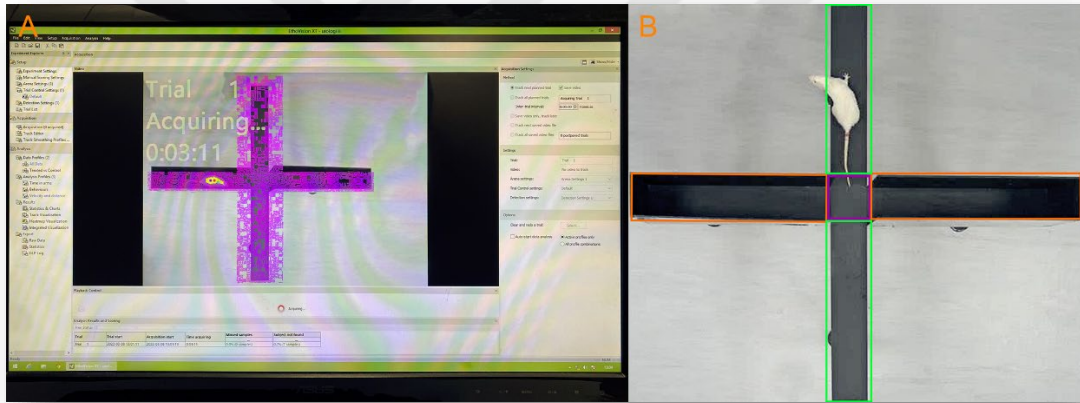
Test cihazı dört siyah polipropilen koldan oluşuyordu. İki "açık" kol 0,5 cm çıkıntılara ve iki "kapalı" kol 30 cm duvarlara sahipti. Kollar 10 cm genişliğinde, 50 cm uzunluğunda ve 55 cm yüksekliğinde akrilik ayaklar üzerine yerleştirilmiştir. Test sessiz, loş ışıklı bir odada yapılmıştır. Her testin başında sıçanlar, açık bir kola bakacak şekilde aparatın ortasına yerleştirildi. Sıçanların aparatı 5 dakika keşfetmesine izin verildi ve davranışları labirentin üzerine monte edilmiş bir kamera ile kaydedildi. Düzenek beş bölgeye ayrıldı

(iki açık kol, iki kapalı kol ve bir merkez bölge). Davranışlar EthoVision XT 11.5 yazılımı (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, ABD) kullanılarak otomatik olarak analiz edildi. Kollarda geçirilen süreler ve kollara giriş sayıları analiz edilen parametrelerdi (Şekil 3.5. ve 3.6)

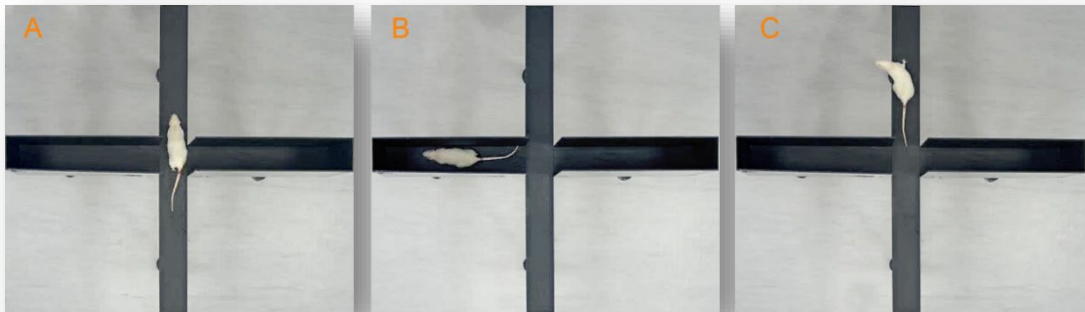
3.2.3. Kuyruk Çekme Testi

Deney başlangıcı (1.gün) ve sonunda (sakrifikasyon günü) radyan ısı üreten bir cihaz (May TF 211-C1, Commat Ltd., Ankara, Türkiye) ile test gerçekleştirildi (Şekil 3.7.). Sonlandırma süresi (*Cut-off*) 15 sn olarak tanımlandı. Her denek için 5 dk ara ile test 3 kez tekrarlandı (Şekil 3.8.) Bu üç ölçümün ortalaması hesaplandı. Deney sonu ölçülen değer, deney başlangıç değerine (*baseline*) göre değişimi % olarak hesap edildi.

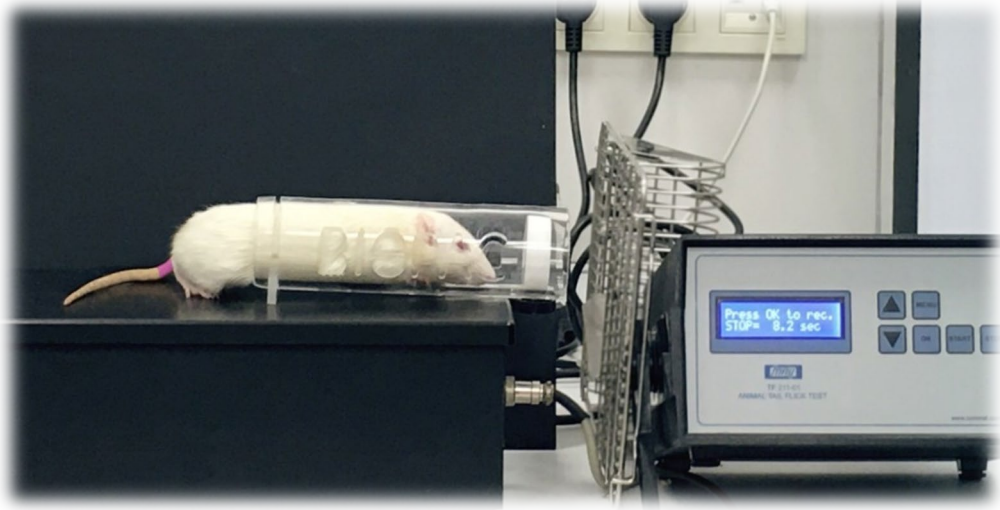
- $$\left[(\text{Deney sonu kuyruk çekme süresi} - \text{Baseline kuyruk çekme süresi}) / \text{Baseline kuyruk çekme süresi} \right] \times 100$$



Şekil 3.5. EthoVision XT 11.5 yazılımı (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, ABD) A. Sıçan hareketlerinin yazılım tarafından kayıt edilmesi. B. Açık ve kapalı kolların yazılımda tanımlanması.



Şekil 3.6. Yükseltilmiş artı labirent testi keşif bölgeleri. A. Merkez kol; B. Kapalı kol; C. Açık kol.



Şekil 3.7. Kuyruk Çekme Test düzeneği (May TF 211-C1, Commat Ltd., Ankara, Türkiye)



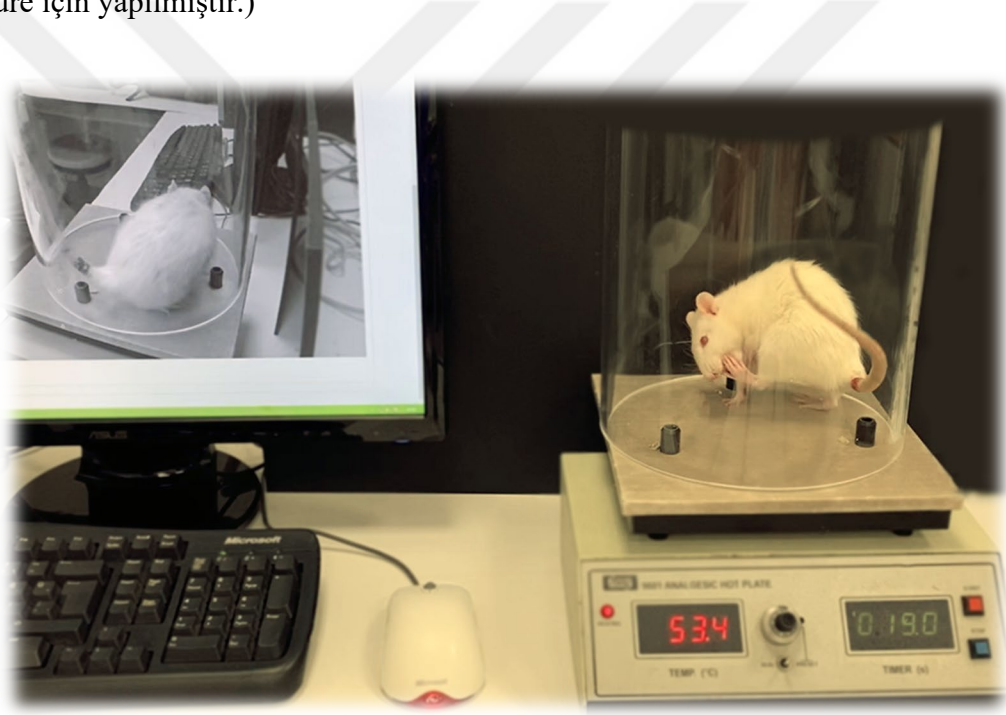
Şekil 3.8. Kuyruk Çekme Testi. A. Kuyruğa radyan ısı uygulanması; B. Sıçanın kuyruğunu çekmesi ile enerjinin otomatik kesilmesi.

3.2.4. Sıcak Plaka Testi

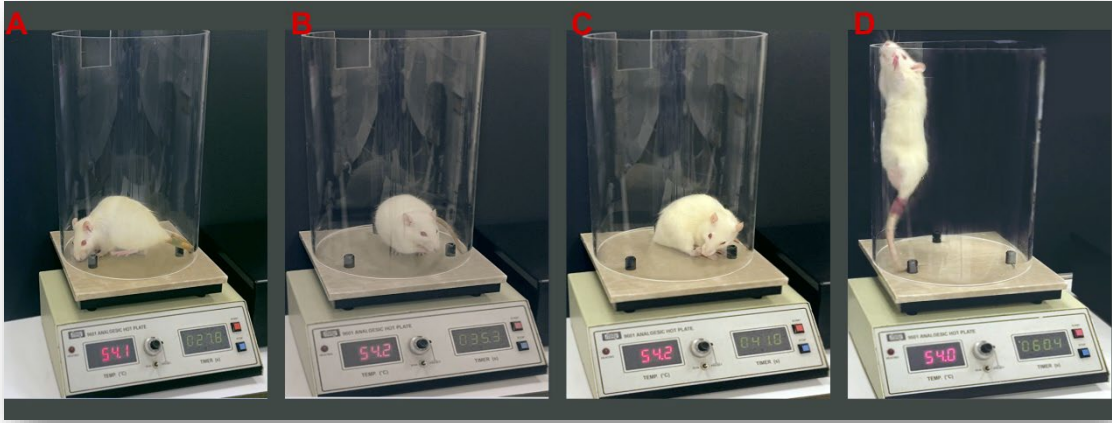
Deney başlangıcı (1.gün) ve sonunda (sakrifikasyon günü) 54 ± 2 °C sıcak plaka içeren platform ile (May AHP 9601, Commat Ltd., Ankara, Türkiye) test gerçekleştirildi (Şekil 3.9.) Sonlandırma süresi (*Cut-off*) 45 sn olarak tanımlandı. Deneyler test süresince video kamera ile kayıt edildi. Sıçanların ön ve arka patilerini kaldırma ve yalaması, ayrıca zıplama ve platformdan kaçma süreleri (Şekil 3.10.) çift kör iki araştırmacı tarafından video kayıtları izlenerek not edildi. Çevreyi keşfetme/merak benzeri davranışların doğal sonucu olarak hareket eden ve arka patileri üzerinde şahlanan (*rearing*) sıçanların ön

patilerini kaldırmaları, ağırlı uyaran ya da normal keşif davranışının bir sonucu olup olmamasındaki belirsizlik nedeniyle ön pati kaldırma süresi değerlendirme dışı bırakılmıştır. Ayrıca, deneyin sonlandırma süresine kadar çok az deneğin ön pati yalama ve platformdan zıplayarak kaçma davranışları göstermesi nedeniyle ön pati yalama ve zıplama/kaçma süreleri de değerlendirme dışı bırakılmıştır. Arka pati kaldırma ve yalamaya kadar geçen süre değerlerinin (*latency*) ortalaması her bir parametre için ayrı olarak hesap edildi. Yine deney sonu ölçülen değerlerin baseline değerlere göre değişimi % olarak her iki parametre için ayrı olarak hesap edilmiştir.

- $$\left[\frac{(\text{Deney sonu sıcak plaka süresi} - \text{Baseline sıcak plaka süresi})}{\text{Baseline sıcak plaka süresi}} \right] \times 100$$
 (Bu hesaplama arka pati kaldırma ve arka pati yalama olmak üzere iki ayrı süre için yapılmıştır.)



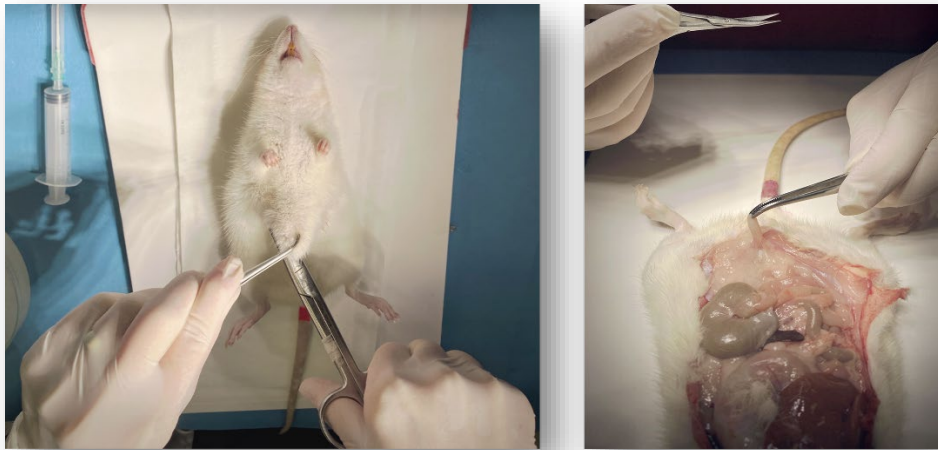
Şekil 3.9. Sıcak Plaka Test Platformu (May AHP 9601, Commat Ltd., Ankara, Türkiye)



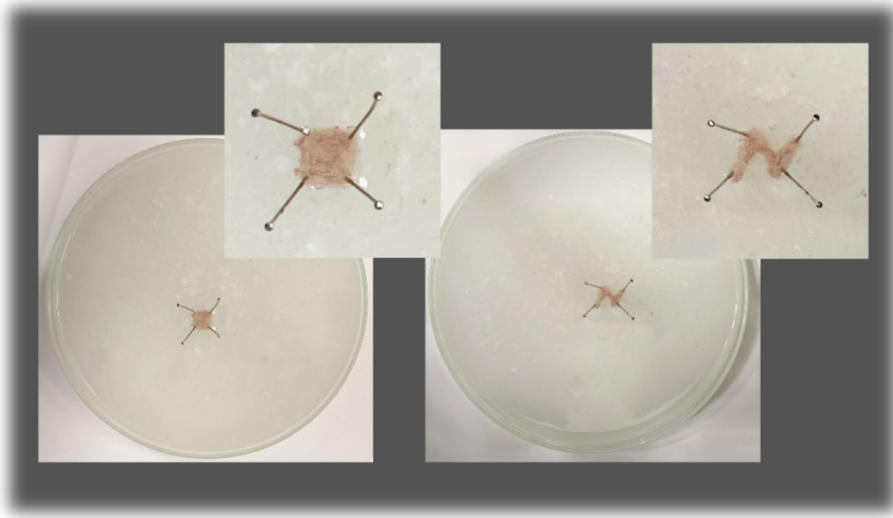
Şekil 3.10. Sıcak plaka testinde sıçan davranışları; A. Arka pati kaldırma; B. Ön pati yalama; C. Arka pati yalama; D. Platformdan kaçma.

3.3. Sakrifikasyon ve Dokuların Deneylere Hazırlanması

Denekler intramüsküler ketamin 50mg/kg + ksilazin 5mg/kg anestezi uygulaması sonrası eksanguinasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Daha sonra abdominal vertikal insizyon ile mesane ortaya kondu (Şekil 3.11.). Mesane diseke edilerek bir bütün olarak çıkarıldı. Çıkarılan mesane dokusu yaş ağırlıkla ölçüldü ve vücut ağırlığına oranı hesaplandı. Ardından şerit haline getirilen dokunun (Şekil 3.12.) 1/6'lık kısmı %10'luk formalin solüsyonuna tespit edilerek histopatolojik inceleme için, 1/6'lık kısmı ise protein analizi için -80 °C' de saklanmak üzere randomize olarak ayrıldı. Kalan 4/6'lık kısım ile izole organ deneyleri gerçekleştirildi.



Şekil 3.11. Abdominal insizyon ile mesanenin ortaya konması.



Şekil 3.12. Mesane dokusunun deneylere hazırlanması. A. Açılan mesane dokusu ve yaklaştırılmış görüntüsü; B. Şerit haline getirilen mesane dokusu ve yaklaştırılmış görüntüsü.

3.4. İzole Mesane Şeritlerinin *In Vitro* Deneyleri

3.4.1. *In Vitro* Deneylerde Kullanılan Besleyici Solüsyonlar ve İlaçlar

Deneylerde besleyici solüsyon olarak pH'ı 7.4 olan Tyrode solüsyonu ve NaCl'nin ekimolar miktarda KCl ile yer değiştirilmesi sonucu elde edilen yüksek K^+ içerikli 80 mM KCl çözeltisi kullanıldı. Çözeltiler deney günü taze olarak hazırlandı.

İzole organ deneylerinde kullanılan ilaçlar: Karbamilkolin klorür (Karbakol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), Papaverin hidroklorür (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD, St. Louis, Missouri, ABD), Adenozin 5'trifosfat disodyum hidrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), Atropin sülfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), Debrizokin sülfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), AF219 (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, ABD) dur.

AF219 hariç tüm ilaçlar distile su içinde çözülüp gerekli seyreltmeler yapılmak suretiyle günlük olarak hazırlandı ve deney boyunca soğukta muhafaza edildi. AF219 stok çözeltisi DMSO'da çözülerek seyreltmeleri distile su ile yapıldı. Stok çözelti dokuya doğrudan verilmedi, distile su ile seyreltikten sonra dokuyu inkübe etmek için kullanıldı.

3.4.2. İzole Mesane Şeritlerinin *In Vitro* Deneylere Hazırlanması

Deneyler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Biriminde (DETAB) gerçekleştirildi. Şerit haline getirilen mesane dokuları hazırlandıktan sonra %95 O_2 - %5 CO_2 ile gazlandırılan ve 37°C olarak ısıtılan, Tyrode solüsyonu (mM olarak

NaCl:136, KCl:2.7, CaCl₂:1.8, MgCl₂:1.05, NaH₂PO₄:0.42, NaHCO₃:11.9, Glukoz:5.5) içeren 20 ml'lik ceketli tip organ banyosuna bir ucu organ askısına diğer ucu gerim değişikliklerini kaydetmek üzere izometrik transdüser (FDTA 10, Commat Ltd., Ankara, Türkiye) bağlanarak yerleştirildi. Mesane şeritleri 1 gramlık ön gerim altında 15 dakikada bir yıkanarak 1 saat dengelenmeye bırakıldı.

Her mesane şeridinde meydana gelen izometrik gerim değişikliklerinin ölçümü, veri analizi yapabilen bir yazılım (BSL Pro 3.7, Biopac System Inc, Santa Barbara, CA, ABD) içeren çevrimiçi olarak kaydeden dört kanallı bilgisayarlı farmakolojik veri toplama sistemi (MP30B-CE; Biopac System Inc, Santa Barbara, CA, ABD) ile bağlantılı izometrik force transdüserler (MAY-COM FDT 10A; Commat Ltd., Ankara, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi.

Dengelenme periyodu sonunda şeritler 80 mM KCl solüsyonuna maruz bırakıldı. Daha sonra yıkanan dokular karbakol, ATP ve EAU kasılma yanıtları ve papaverin gevşeme yanıtları elde edildi.

EAU, MAY ST95PT (Commat Ltd., Ankara, Türkiye) stimülatör ile uygulandı. Mesane şeritleri organ banyosuna birbirine 6-8 mm uzaklığında paralel iki platin tel elektrot arasına vertikal olarak iki ucundan asıldı. EAU sırasında organ banyosuna muskarinik reseptör blokörü 10⁻⁶ M Atropin, adrenerjik sinir blokörü 3x10⁻⁶ M Debrizokin ve P2X3 reseptör antagonisti 10⁻⁵ M AF219 eklenerek 30 dakika inkübasyon suretiyle parasempatik, sempatik ve pürinerjik sinir aktivitesinden oluşacak yanıtlar engellendi. Deneyler sonunda mesane şeritleri kurutma kâğıdı üzerine alınıp hafifçe kurutulduktan sonra tartıldı.



Şekil 3.13. Kocaeli Üniversitesi DETAB - İzole Organ Deney Laboratuvarı. Doku banyosu modüllerine ait görüntü.

3.4.3. KCl Kasılma Yanıtları

Kontrol ve deney gruplarından elde edilen mesane şeritleri 80 mM KCl ile muamele edildi. Elde edilen kasılma yanıtları mg/mg olarak kaydedildi.

3.4.4. Karbakol Kasılma Yanıtları

Kontrol ve deney gruplarından elde edilen mesane şeritlerine karbakol 10^{-9} - 10^{-4} M kümülatif konsantrasyonlarda ilave edilerek konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edildi. Her bir konsantrasyondaki kasılma yanıtı dengeye eriştikten sonra bir üst konsantrasyona geçildi. Elde edilen kasılma yanıtları mg/mg kasılma olarak kaydedildi.

3.4.5. Papaverin Gevşeme Yanıtları

Kümülatif karbakol yanıtının ardından tek konsantrasyonda papaverin 10^{-4} M uygulandı. Gevşeme yanıtları mg/mg olarak kaydedildi.

3.4.6. ATP Kasılma Yanıtları

Deney ve kontrol gruplarından elde edilen izole mesane şeritlerine ATP (10^{-8} - 10^{-4} M) kümülatif konsantrasyonlarda ilave edilerek konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edildi.

3.4.7. EAU'nun Oluşturduğu Kasılma Yanıtları

Deney ve kontrol gruplarından izole edilen mesane şeritleri dengeye ulaştıktan sonra 50 V, 1 ms; 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, Hz'lik frekanslarda toplam 10 sn süre ile uyarılar verilerek kasılma yanıtları alındı. Her frekansta oluşan gevşeme yanıtı geri döndükten sonra bir sonraki frekansa geçildi.

Bu yanıtlar alınmadan ortama muskarinik reseptör blokörü 10^{-6} M Atropin, adrenerjik sinir blokörü 3×10^{-6} M Debrizokin eklendi. Elde edilen EAU yanıtlarında pürinerjik P2X3 reseptörlerinin rolünü *in vitro* olarak göstermek amacıyla aynı yanıtlar tüm gruplarda P2X3 reseptör antagonisti AF219 (10^{-5} M) varlığında tekrar alındı.

3.5. Histopatolojik İnceleme

3.5.1. Doku Hazırlama

Bütün gruplardan alınan mesane dokusu örnekleri %10'luk formalin solüsyonunda 24 saat tespit edildi. Tespit işlemi sonrası formalin solüsyonu içinden alınan doku örnekleri çeşme suyu altında yıkandı ve sırasıyla %75, %96 ve %100 etanol serisinden geçirilerek suyunu giderme işlemi uygulandı. Bundan sonra ksilen ile şeffaflaştırılan dokular sıvı parafinle 60°C'lik etüvde 3 saat inkübe edilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan Leica RM 2125RT model (Leica Biosystems, Deer Park, IL, ABD) sliding mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı.

3.5.2. Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyama

Doku kesitlerine Hematoksilen-Eozin (H&E) boyası uygulandı.

Uygulanan H&E boyama protokolü aşağıdaki gibidir:

1. Ksilen ile deparafinizasyon
2. %100, %96 ve %75 etanol serisi ile hidratasyon
3. Yıkama (çeşme suyunda)
4. Hematoksilen solüsyonu, 1 dakika
5. Yıkama (çeşme suyunda)
6. Eozin solüsyonu, 1 dakika
7. Yıkama (çeşme suyunda)
8. %75, %96 ve %100 etanol serisi ile dehidratasyon
9. Ksilen ile şeffaflandırma
10. Entellan kullanarak lamelle kapama

Boyanan preparatlar, Olympus BX50 (Olympus Life-Science, Tokyo, Japonya) marka ışık mikroskobuyla incelendi ve fotoğraflandı.

3.5.3. Histopatolojik İnceleme

Işık mikroskobu altında inflamasyon değerlendirme kriterlerinde epitelyal değişiklikler, submukozal ödem, hemoraji ve inflamatuvar infiltrasyon varlığı ve şiddeti kullanıldı. Daha önce deneysel sistit modelinde tanımlanmış (inflamasyon tabanlı) bu değerlendirme 0-5 arasında 6 değerden oluşmakta 0 en hafif 5 en şiddetli histolojik skora karşılık gelmektedir²⁵⁰. Mesanenin inflamasyon değerlendirmesi yapılırken kullanılan ölçütler Tablo 3.1.' de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Histolojik skorlama ölçütleri.²⁵⁰

Skor	Histolojik Özellikler
0	İnflamasyon veya epitelyal değişikliğin olmaması veya morfolojik olarak dikkat çekmeyecek düzeyde olması.
1	Lamina propria içinde ara sıra nötrofiller veya lenfositlerden oluşan minimal inflamatuvar infiltrasyon.
2	Hafif ödem veya hemorajinin eşlik ettiği, ancak muskularis propriada inflamasyon veya anlamlı ürotelyal değişikliklerin olmadığı, lamina propria içinde dağınık nötrofiller veya lenfositler ile minimal-hafif inflamatuvar infiltrasyon.
3	Lamina propriada hafif veya hafif-orta derecede inflamatuvar infiltrasyon ve muskularis propriaya fokal yayılmış inflamasyon.
4	Hem lamina propria'da hem de muskularis propria'da sık dağılmış nötrofillere ve lenfositler ile orta derecede inflamasyon.
5	Lamina propria ve muskularis propria'da ürotelyal ülserasyon, şiddetli ödem, hemoraji ve fibrin birikimi gibi diğer önemli bulgularla birlikte şiddetli inflamasyon.

3.6. Moleküler Analiz İçin Doku Hazırlama ve *Western Blot (WB)* Deneyi

3.6.1. Protein Ekstraktlarının Hazırlanması

Mesane doku örnekleri buz üzerinde çözülerek bistüri yardımı ile küçük parçalara (<1.00 mm) ayrıldı. Kan kontaminasyonundan kurtulmak için örnekler soğuk yıkama tamponu (250 mM süktroz, 25 mM tris, pH 7.4) ile üç defa yıkandılar. Yıkama çözeltisini uzaklaştırmak için 10.000 x g'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Temizlenmiş dokulara 100 µL T-PER (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ekstraksiyon tamponu ilave edildi ve 0.2 mm paslanmaz çelik boncuklar kullanılarak Blut blender cihazı (Next Advance, Troy, NY, ABD) yardımıyla 5 dk süre ile 3 tekrarlı olarak 4°C'de homojenizasyon işlemi yapıldı. Homojenatlar, parçalanmamış doku debrislerinden kurtulmak için 4°C'de ilk önce 10.000 x g'de 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant bir kere de 15000 x g'de 30 dakika süre ile santrifüj edilerek protein ekstraktları elde edilmiş oldu. Protein konsantrasyonları, modifiye edilmiş Bradford yöntemi ²⁵¹ (Bradford Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) ile belirlendi. Protein ekstraksiyonundan sonra, doku protein ekstraktları (n=64) toplamda 8 grup olacak şekilde örneklerden eşit konsantrasyonda alınarak gruplara ait protein havuzları (*pooling*) oluşturuldu ve her bir grup, deney grup ismi ile adlandırıldı.

3.6.2. Protein Normalizasyonu

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak, her bir grup havuzundan alınan 25'şer µg proteinin jel üzerinde moleküler ağırlıklarına göre ayrımları sağlanacak proteinler nitroselüloz membranlara aktarıldı. Normalizasyon deneyleri için internal kontrol protein olarak Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) seçildi ve membranlar anti-GAPDH antikoru (SC-137179 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, ABD)) ile *WB* analizine tabi tutuldu. Antikor-protein etkileşimini gösteren bantlar, elektrokemilüminesans (ECL) görüntüleme sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak yüksek duyarlı filmler yardımı ile görüntülendi. Image-J programı kullanılarak film üzerindeki proteinlere ait bant yoğunlukları hesaplandı ve protein havuzlardaki protein konsantrasyonları bant yoğunluk oranlarına göre yeniden belirlendi.

3.6.3. Jellerin Boyanması

Jeller fiksasyon solüsyonu ile gece boyu fikse edildikten sonra, kolloidal Coomassie Brilliant Blue (cCBB) ile boyandı ve Quantity One yazılımı (Versiyon 4.6.7, Bio-Rad,

Hercules, CA, ABD) kullanılarak VersaDoc4000 MP (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) sistemi ile görüntülendi.

3.6.4. WB Deneyi

Proteinler, SDS-PAGE (%12) jel üzerinde moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı ve bir Trans-Blot SD Yarı-Kuru Transfer Sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak nitroselüloz membrana (GE Healthcare, Chicago, IL, ABD) aktarıldı. Membran, %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T (Tris tamponu-Tween 20) içinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloke edildi, bloklama sonrası TBS-T ile 10'ar dakika 3 kez yıkandıktan sonra primer antikor muamelesine geçildi. Primer antikorlar (P2X3; (B-5) SC-390572 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, ABD), P2X7; (D-1) SC-514962 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, ABD), Trk-A; MA5-32123 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD), TRPV1; NBP1-97417 (Novus Biologicals, Centennial, CO, ABD), TRPA1; NB110-40763, (Novus Biologicals, Centennial, CO, ABD), GAPDH; SC-137179 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, ABD)) uygun dilüsyonlar yapılarak gece boyu 4°C'de çalkalanarak uygulandı. Primer antikor ile inkübasyon sonrası üç kez TBS-T ile yıkanan membran, HRP-etiketli uygun sekonder antikorlar (1: 10.000 seyreltme ile) ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalanarak inkübe edildi. Yine TBS-T yıkamanın ardından, membran üzerindeki protein bantları ECL görüntüleme sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak yüksek duyarlı filmler yardımı ile görüntülendi. Membranlar gerektiğinde Restore™ WB Stripping tamponu (#21059, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak strip edildi. Her antikor için WB deneyleri üç kez tekrar edildi. Bant yoğunluklarının göreceli kantitatif değerlendirmeleri için Image-J programı kullanıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, Chicago, IL, ABD) Versiyon 24 programı kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılımı Shapiro-Wilk ile test edildi. Parametrik veriler için ortalama±standart sapma, nonparametrik veriler için ise medyan (çeyreklikler arası açıklık) değeri kullanıldı (CAA=Ç₃-Ç₁). Gruplar arası ortalama değerlerin karşılaştırılması One-way Anova ve Post Hoc Tukey testi ile gerçekleştirildi. Nonparametrik değişkenlerin karşılaştırılmasında ise Bonferroni düzeltilmeli Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Bütün istatistiksel incelemelerde %95 güven aralığında $p < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Davranış Deneyleri

Her iki model için de gruplar arası deney başlangıç ortalama ağırlıkları farklılık göstermedi ($p>0,05$). Grupların deney öncesi ve sonrasında ölçülen ağırlıkları, ağırlık değişim yüzdeleri ve ayrıca sakrifikasyon sonrası ölçülen mesane ağırlıkları ve bu ağırlıkların vücut ağırlıklarına oranı (%) Tablo 4.1’de sunulmuştur. Tüm gruplarda deney öncesine göre, deney sonrası ağırlıkları azalmış olduğu tespit edilmekle birlikte bu değişim her iki modelin İS/MAS gruplarında daha fazlaydı ($p<0,05$).

Tablo 4.1. Grupların deney sonunda ağırlık değişimleri ve mesane ağırlıkları.

	Kontrol (n=8)	Kontrol+AF219 (n=8)	İS/MAS (n=8)	İS/MAS+AF219 (n=8)	<i>p</i>
CYP Modeli					
Başlangıç ağırlık (g)	229,75±8,379	230,25±9,036	227,88±7,900	229,38±8,879	0,951 [¶]
Son ağırlık (g)	224,00±9,289	225,13±8,442	216,50±11,747	218,63±9,590	0,598 [¶]
Ağırlık değişim (%)	-2,51±1,411	-2,21±1,302	-5,04±2,034 ^{**}	-4,70±1,119 [*]	<0,001[¶]
Mesane ağırlık (mg)	130,0 (15,9)	125,9 (16,38)	165,1 (52,71) [*]	130,2 (41,16) [#]	0,005[¥]
Mesane / vücut ağırlık (%)	0,059 (0,01)	0,055 (0,01)	0,073 (0,020) ^{**}	0,058 (0,020) [#]	0,004[¥]
WAS Modeli					
Başlangıç ağırlık (g)	229,13±13,293	223,88±11,470	234,88±12,873	227,88±11,532	0,455 [¶]
Son ağırlık (g)	223,75±16,456	217,75±11,720	221,50±11,796	220,38±11,600	0,831 [¶]
Ağırlık değişim (%)	-2,42±2,069	-2,74±1,274	-5,32±1,792 [*]	-3,30±0,830	0,004[¶]
Mesane ağırlık (mg)	129,44±5,804	125,03±8,432	150,71±8,256 ^{**}	128,76±8,512 ^{##}	<0,001[¶]
Mesane / vücut ağırlık (%)	0,056±0,0036	0,056±0,0052	0,065±0,0036 ^{**}	0,057±0,0039 ^{##}	<0,001[¶]

¶ One Way Anova – Post Hoc Tukey Testi, ¥ Kruskal-Wallis – Bonferroni düzeltmesi

* İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol

İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS

* veya #: $p<0,05$ ** veya ##: $p<0,01$ *** veya ###: $p<0,001$

Her iki ayrı modelde gruplar arası toplam lokomotor aktivite skorları istatistiksel olarak farklılık göstermedi ($p>0,05$). CYP modeli İS/MAS grubunda vertikal aktivite skorları diğer gruplara göre önemli ölçüde daha düşüktü ($p<0,01$) ve ayrıca İS/MAS+AF219 grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p>0,05$). Dışkılama

sayıları incelendiğinde, WAS modeli İS/MAS grubunda ise dışkılama sayıları kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,05$) ve İS/MAS+AF219 grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark yoktu ($p>0,05$). Her iki deney modeli İS/MAS gruplarının merkez bölgede geçirilen süre yüzdesi diğer gruplara göre önemli ölçüde daha azdı ($p<0,05$) ve yine İS/MAS+AF219 grupları ile kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Açık alan testi ve lokomotor aktivite sonuçları Tablo 4.2 'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. Açık Alan Testi ve Locomotor Aktivite Sonuçları.

	Kontrol (n=7)	Kontrol+AF219 (n=7)	İS/MAS (n=7)	İS/MAS+AF219 (n=7)	<i>p</i>
CYP Modeli					
Ambulatuvar Aktivite	203,86±42,569	191,86±32,616	158,29±30,170	170,71±37,003	0,105 [¶]
Stereotipik Aktivite	865,00±76,594	854,30±96,398	827,86±58,820	855,71±144,437	0,908 [¶]
Horizontal Aktivite	1961,00±312,593	1869,86±249,949	1620,57±230,671	1726,00±264,631	0,108 [¶]
Vertikal aktivite	17,29±3,147	17,14±4,451	11,43±3,207 ^{**}	17,71±1,380 [#]	0,003[¶]
Mesafe (cm)	579,29±116,810	547,14±91,197	454,29±83,170	494,29±97,897	0,110 [¶]
Total Aktivite	1085,29±94,615	1062,73±111,645	998,00±75,193	1045,14±131,374	0,472 [¶]
Dışkılama sayısı	0 (3)	0 (1)	1 (1)	0 (1)	0,826 [¥]
Merkez (%)	4,39±1,131	4,26±1,080	2,72±0,627 [*]	3,79±1,405	0,036[¶]
WAS Modeli					
Ambulatuvar Aktivite	191,86±39,545	181,43±36,814	187,00±41,493	208,57±43,954	0,631 [¶]
Stereotipik Aktivite	874,29±49,567	879,86±38,360	895,14±44,979	882,29±41,044	0,835 [¶]
Horizontal Aktivite	1870,14±302,252	1793,86±291,504	1846,43±305,087	2001,71±336,546	0,639 [¶]
Vertikal Aktivite	18,57±1,902	18,86±3,532	15,43±3,359	18,43±3,359	0,162 [¶]
Mesafe (cm)	545,71±110,291	517,71±105,815	539,43±115,205	592,43±126,947	0,669 [¶]
Total Aktivite	1082,86±76,443	1072,71±73,373	1098,57±70,595	1110,14±75,959	0,789 [¶]
Dışkılama sayısı	0 (1)	0 (2)	2 (2) [*]	1 (2)	0,040[¥]
Merkez Süre (%)	4,76±0,956	4,57±0,787	3,18±0,624 ^{**}	3,82±0,527	0,002[¶]

¶ One Way Anova – Post Hoc Tukey Testi, ¥ Kruskal-Wallis – Bonferroni düzeltmesi

* İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol

İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS

* veya #: $p<0,05$ ** veya ##: $p<0,01$ *** veya ###: $p<0,001$

Yükseltilmiş artı labirent testi, toplam kollara giriş sayılarında gruplar arasında fark yoktu ($p>0,05$) ancak açık kollarda geçirilen süre her iki modele ait İS/MAS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p<0,05$). Diğer yandan İS/MAS+AF219 gruplarındaki açık kolda geçirilen süre ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak bir fark izlenmedi ($p>0,05$). (Tablo 4.3.)

Tablo 4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Test Sonuçları

	Kontrol (n=7)	Kontrol+AF219 (n=7)	İS/MAS (n=7)	İS/MAS+AF219 (n=7)	p
CYP Modeli					
Toplam kol giriş sayısı	9 (3)	8 (6)	7 (2)	9 (5)	0,628 [¥]
Açık kol süre (sn)	40,43±9,663	40,59±12,262	23,66±5,729 [*]	32,77±14,544	0,026[¶]
WAS Modeli					
Toplam kol giriş sayısı	9 (3)	9 (1)	7 (3)	10 (2)	0,648 [¥]
Açık kol süre (sn)	40,64±11,782	41,09±7,589	23,14±10,645 [*]	33,35±11,978	0,014[¶]

¶ One Way Anova – Post Hoc Tukey Testi, ¥ Kruskal-Wallis – Bonferroni düzeltmesi

* İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol

İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS

* veya #: $p<0,05$ ** veya ##: $p<0,01$ *** veya ###: $p<0,001$

Kuyruk çekme ve sıcak plaka testlerinde kuyruk çekme ve arka pati kaldırma süreleri deney başlangıcı baz alınarak değerlendirildiğinde, her iki modelin İS/MAS gruplarında diğer gruplara göre istatistiksel olarak azalmış olduğu bulundu ($p<0,05$). Kuyruk çekme ve arka pati kaldırma süre değişimleri (%), İS/MAS+AF219 grubunda İS/MAS grubuna göre pozitif yönde anlamlı olarak artmış olduğu izlendi (CYP modelinde +6,36±10,120 vs. -5,15±2,743; WAS modeli için +4,92 ±9,157 vs. -13,71±1,390, $p<0,05$). İS/MAS+AF219 gruplarında ise bu değerler kontroller ile farklılık göstermedi ($p>0,05$). Sıcak plaka ve kuyruk çekme testlerine ait sonuçlar Tablo 4.4’te sunulmuştur. Sıcak plaka testine ait arka pati kaldırma süre değişim (%) grafikleri Şekil 4.1’de verilmiştir.

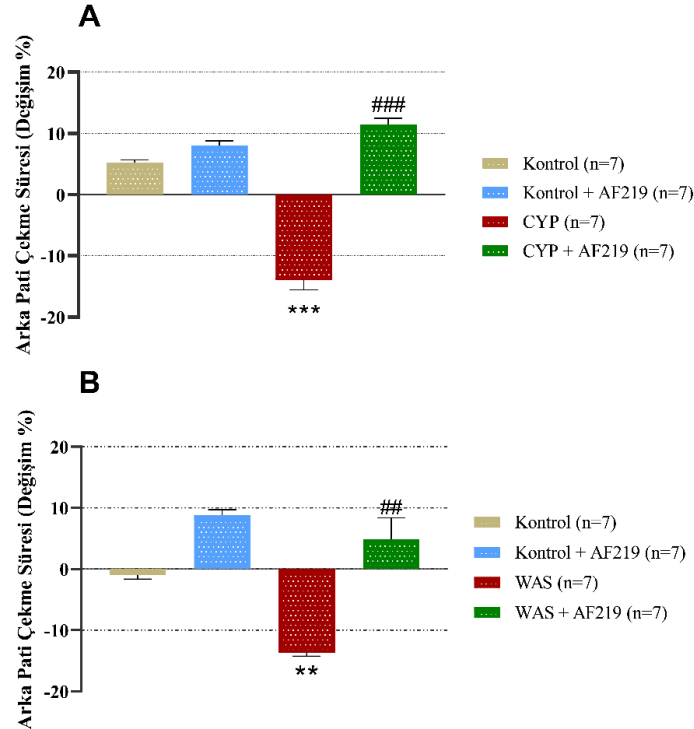
Tablo 4.4. Sıcak Plaka ve Kuyruk Çekme Test sonuçları

	Kontrol (n=7)	Kontrol+AF219 (n=7)	İS/MAS (n=7)	İS/MAS+AF219 (n=7)	<i>p</i>
CYP Modeli					
Kuyruk çekme süre değişimi (%)	4,36±3,051	6,25±6,796	-5,15±2,743 ^{**}	6,36±10,120 ^{##}	0,007[¶]
Arka pati kaldırma süre değişimi (%)	5,26±1,034	8,01±1,975	-13,97±4,188 ^{***}	11,47±2,576 ^{###}	<0,001[¶]
Arka pati yalama süre değişimi (%)	4,21±3,301	-2,78±1,643	-15,67±6,345 ^{**}	-7,31±8,332 [#]	<0,001[¶]
WAS Modeli					
Arka pati kaldırma süre değişimi (%)	1,03±1,655	8,83±2,385	-13,71±1,390 ^{**}	4,92 ±9,157 ^{##}	<0,001[¶]
Arka pati yalama süre değişimi (%)	1,03±1,906	1,28±7,065	-13,42±,008 ^{**}	-16,74±3,025 ^{**}	<0,001[¶]
Kuyruk çekme süre değişimi (%)	2,17±6,302	-7,59±2,307	-19,75±6,801 ^{**}	-7,93±0,839 [#]	<0,001[¶]

¶ One Way Anova – Post Hoc Tukey Testi

* İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol

İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS

* veya #: $p<0,05$ ** veya ##: $p<0,01$ *** veya ###: $p<0,001$ 

Şekil 4.1. Sıcak Plaka Testi - Arka Pati Kaldırma (Değişim %) Grafikleri. A. CYP Modeli; B. WAS Modeli. CYP ve WAS grup isimlendirmeleri İS/MAS'a karşılık gelmektedir. * İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol; # İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS; * veya #: $p<0,05$, ** veya ##: $p<0,01$, *** veya ###: $p<0,001$.

4.2. İzole Mesane Şeritlerinin *In Vitro* Deney Sonuçları

4.2.1. KCl Kasılma Yanıtları

Her iki deney modelinde de 80 mM KCl sonrası kasılma yanıtlarında gruplar arasında fark tespit edilmedi ($p>0,05$). (Tablo 4.5.) (Şekil 4.2.)

Tablo 4.5. KCl kasılma yanıtları.

KCl 80 mM	CYP Modeli	WAS Modeli
<i>Ortalama $\pm$ SH (mg)</i>		
Kontrol (n=8)	5090 $\pm$ 590	6500 $\pm$ 500
Kontrol+AF219 (n=8)	5140 $\pm$ 560	6700 $\pm$ 800
İS/MAS (n=8)	5890 $\pm$ 520	5450 $\pm$ 350
İS/MAS+AF219 (n=8)	5040 $\pm$ 410	5900 $\pm$ 600
P Değeri	0,628 [¶]	0,430 [¶]

¶ One Way Anova – Post Hoc Tukey Testi
SH, Standart Hata

4.2.2. Karbakol Kasılma Yanıtları

İS/MAS gruplarında CYP modeli için 10^{-6} , WAS modeli için 10^{-7} M derişimlerinden itibaren kontrol gruplarına göre artmış kasılma yanıtları izlenirken, diğer taraftan İS/MAS+AF219 gruplarının kasılma yanıtları İS/MAS gruplarına göre istatistiksel olarak azalmış olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Kümülatif derişimlerde her iki modelde de İS/MAS+AF219 ile kontrol grupları arasında kasılma yanıtlarında farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$, Şekil 4.2.).

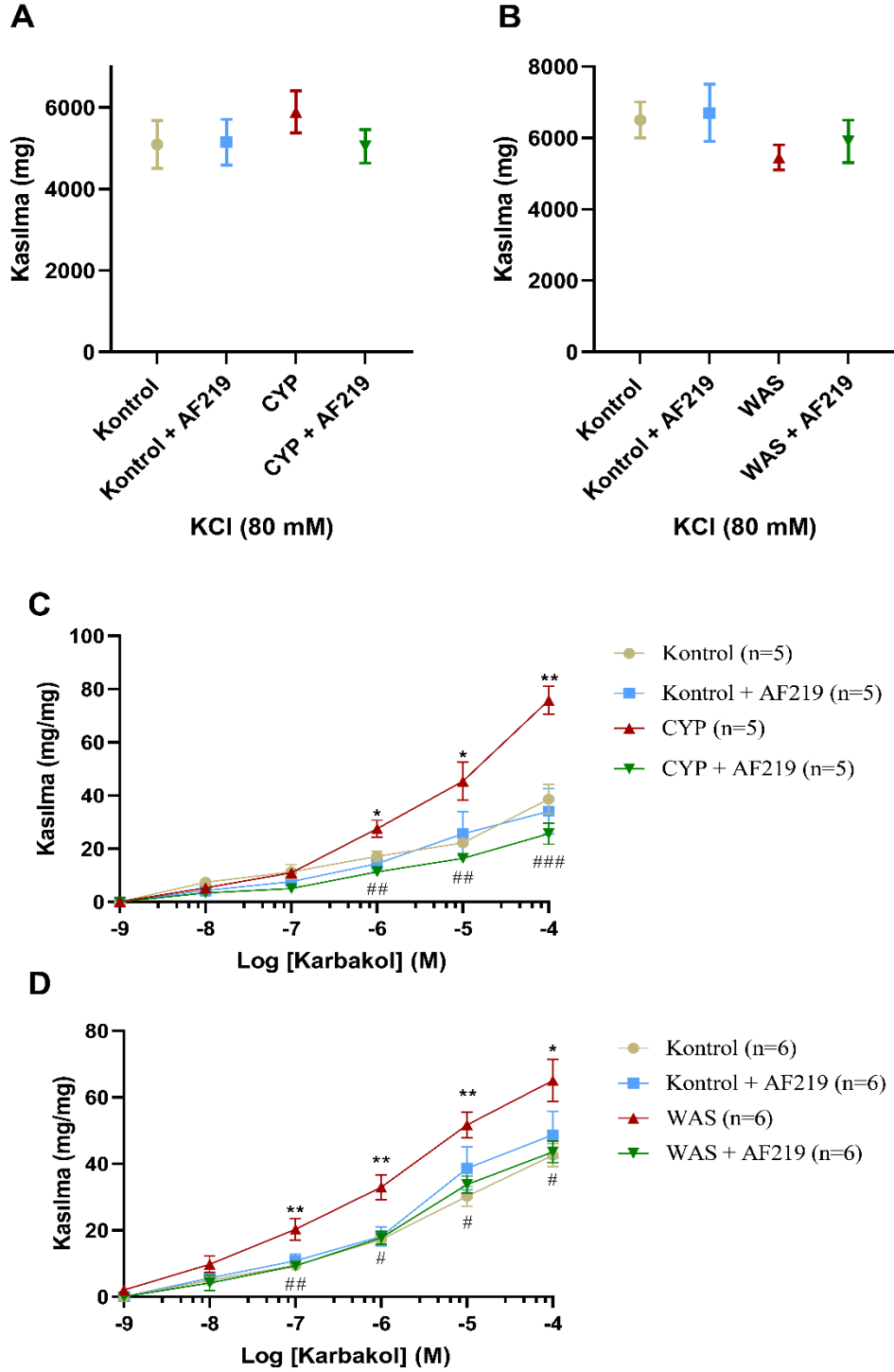
4.2.3. Papaverin Gevşeme Yanıtları

Her iki deney modeli için 10^{-4} M papaverin sonrası gevşeme yanıtlarında gruplar arasında fark tespit edilmedi ($p>0,05$, Tablo 4.6)

Tablo 4.6. Papaverin gevşeme yanıtları.

Papaverin 10^{-4} M	CYP Modeli	WAS Modeli
<i>Ortalama $\pm$ SH (%)</i>		
Kontrol (n=8)	99.98 $\pm$ 0.33	99.27 $\pm$ 2.02
Kontrol+AF219 (n=8)	99.62 $\pm$ 1.14	98.23 $\pm$ 1.36
İS/MAS (n=8)	100.02 $\pm$ 0.30	98.42 $\pm$ 1.50
İS/MAS+AF219 (n=8)	99.27 $\pm$ 2.02	99.71 $\pm$ 1.26
P Değeri	0,966 [¶]	0,922 [¶]

¶ One Way Anova – Post Hoc Tukey Testi
SH, Standart Hata

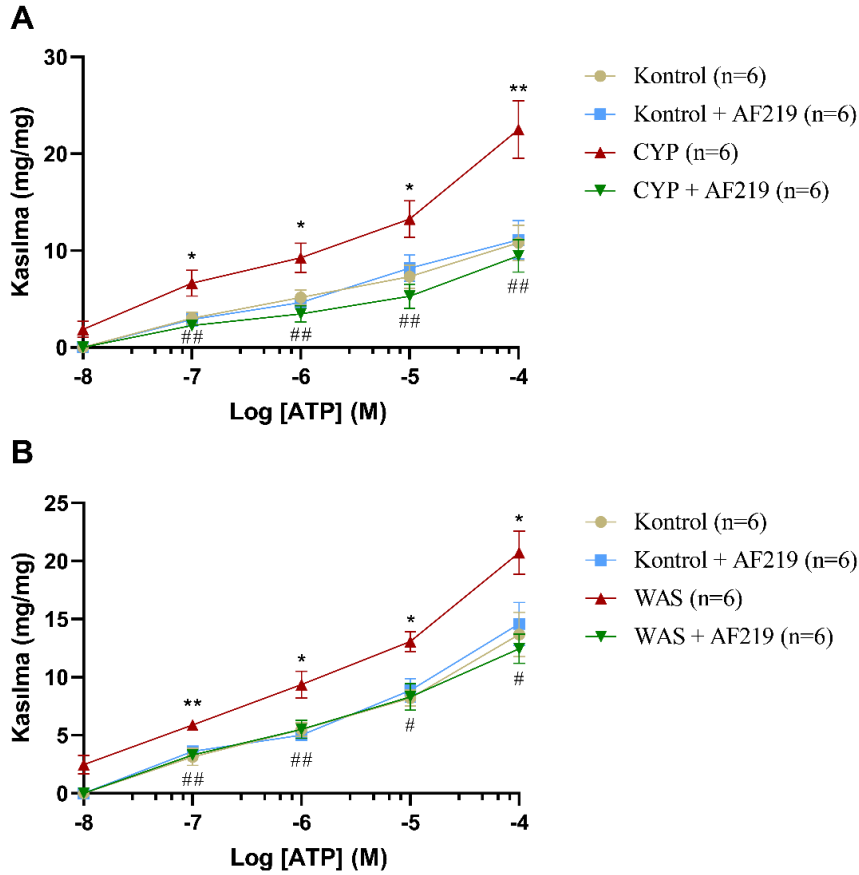


Şekil 4.2. KCl ve Karbakol kasılma yanıt grafikleri. A. CYP modeli KCl kasılma yanıt grafiği; B. WAS modeli KCl kasılma yanıt grafiği; C. CYP modeli Karbakol kasılma yanıt grafiği; D. WAS modeli Karbakol kasılma yanıt grafiği. CYP ve WAS grup isimlendirmeleri İS/MAS'a karşılık gelmektedir. * İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol; # İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS; * veya #: $p < 0,05$, ** veya ##: $p < 0,01$, *** veya ####: $p < 0,001$.

4.2.4. ATP Kasılma Yanıtları

İS/MAS gruplarında her iki model için 10^{-7} M derişiminden itibaren kontrol gruplarına

göre artmış kasılma yanıtları izlenirken, diğer taraftan İS/MAS+AF219 gruplarının kasılma yanıtları İS/MAS gruplarına göre istatistiksel olarak azalmış olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Her iki modelde de kümülatif derişimlerde İS/MAS+AF219 ile kontrol grupları arasında kasılma yanıtlarında farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$, Şekil 4.3.).

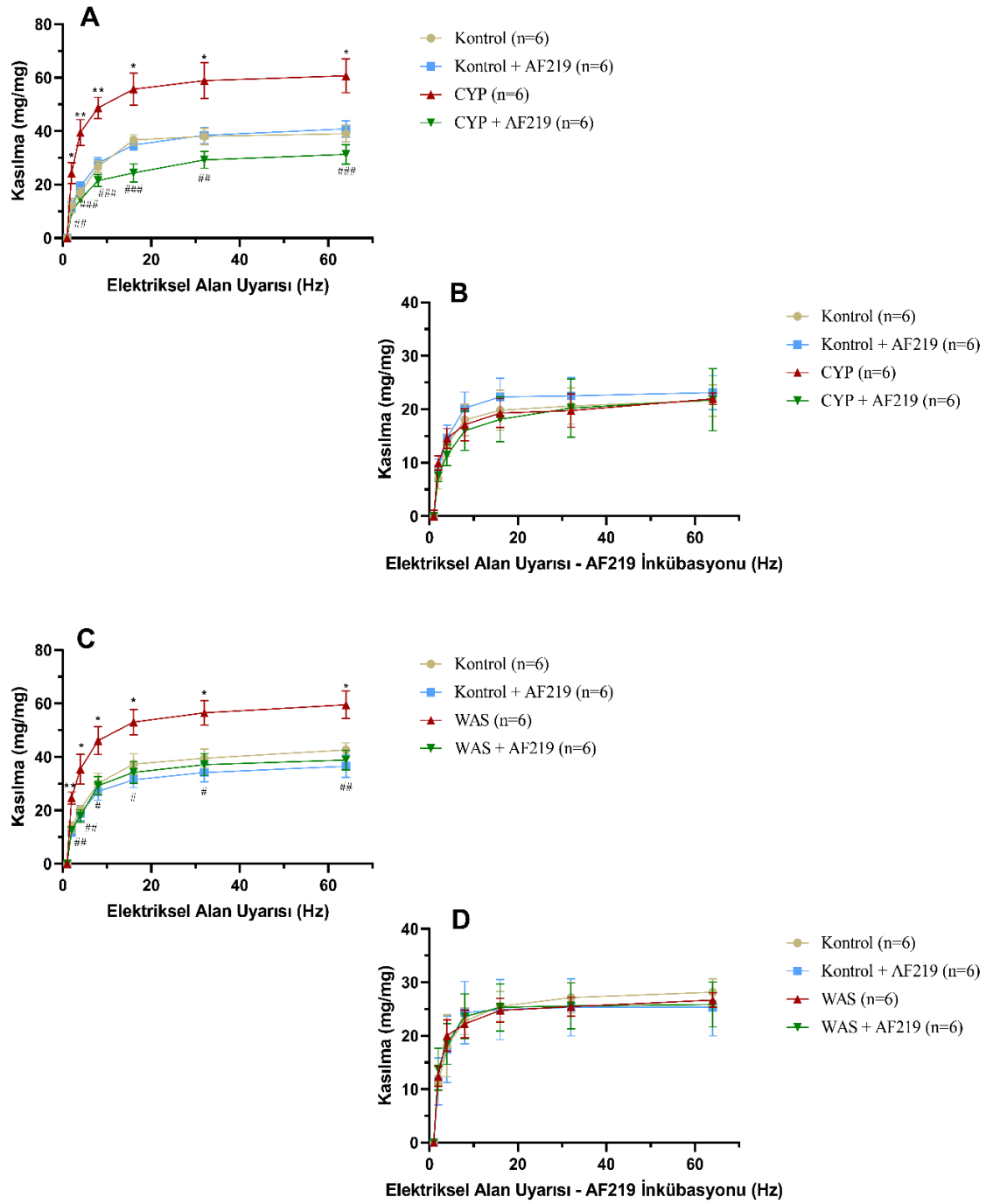


Şekil 4.3. ATP kasılma yanıt grafikleri, A. CYP modeli; B. WAS modeli. CYP ve WAS grup isimlendirmeleri İS/MAS'a karşılık gelmektedir. * İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol; # İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS; * veya #: $p<0,05$, ** veya ##: $p<0,01$, *** veya ###: $p<0,001$

4.2.5. EAU'nun Oluşturduğu Kasılma Yanıtları

İS/MAS gruplarında her iki model için 50 V elektrik alanı uyarısına karşılık tüm frekans aralıklarında kontrol gruplarına göre artmış kasılma yanıtları izlenirken, diğer taraftan İS/MAS+AF219 gruplarının kasılma yanıtları İS/MAS gruplarına göre istatistiksel olarak azalmış olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Ancak artan frekans aralıklarında her iki modelde de İS/MAS+AF219 ile kontrol grupları arasındaki kasılma yanıtlarında farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$, Şekil 4.4.A ve C)

Buna ek olarak her iki model ait tüm grupların mesane şeritleri, 10^{-5} M AF219 ile inkübe edildiğinde gruplar arasında kasılma yanıtları açısından istatistiksel olarak farklılık izlenmedi ($p>0,05$, Şekil 4.4.B ve D)

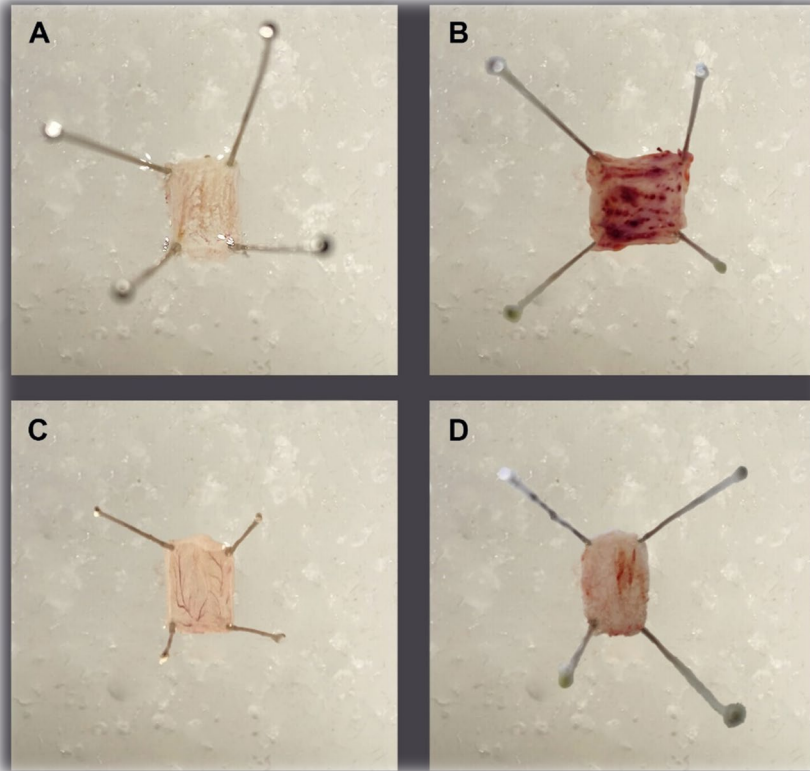


Şekil 4.4. Elektriksel Alan Uyarısı yanıt grafikleri. A. CYP modeli EAU yanıt grafiği; B. CYP modeli AF219 inkübasyon sonrası EAU grafiği; C. WAS modeli EAU yanıt grafiği; D. WAS modeli AF219 inkübasyon sonrası EAU grafiği. CYP ve WAS grup isimlendirmeleri İS/MAS'a karşılık gelmektedir. * İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol; # İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS; * veya #: $p<0,05$, ** veya ##: $p<0,01$, *** veya ###: $p<0,001$

4.3. Histolojik İnceleme

Hem CYP hem de WAS modeli ile oluşturulan hastalık gruplarına (İS/MAS) ait mesane dokularının ağırlıkları ve bu ağırlıkların vücut ağırlıklarına göre oranları istatistiksel olarak

daha fazlaydı ($p<0,05$, Tablo 4.1). Ayrıca her iki modelin İS/MAS grupları diğer gruplara göre daha yüksek inflamasyon tabanlı histolojik skor değerlerine sahipti ($p<0,05$, Tablo 4.7.). İnflamasyon tabanlı histolojik skor her iki modelde de İS/MAS+AF219 grubunda İS/MAS grubuna göre düşüş göstermiş olsa da bu düşüş sadece WAS modeli için istatistiksel olarak anlamlıydı (CYP için $1,63\pm0,518$ vs. $2,00\pm0,00$, $p=0,114$ WAS için $1,75\pm0,707$ vs. $2,63\pm0,518$, $p=0,025$). Her iki modelde de İS/MAS+AF219 ve kontrol grupları arasında inflamasyon tabanlı histolojik skorlar arasında istatistiksel bir fark izlenmedi ($p>0,05$). Her iki modele ait makroskopik mesane doku görüntüleri Şekil 4.5'te, mikroskopik görüntü örnekleri ise Şekil 4.6.'da verilmiştir. Mesane-vücut ağırlık oranı (%) ve histolojik skor grafikleri Şekil 4.7.'de sunulmuştur.



Şekil 4.5. Mesane dokularının makroskopik görüntüsü. A. CYP modeli Kontrol grubuna ait mesane dokusu; B. CYP modeli İS/MAS grubuna ait mesane dokusu; C. WAS modeli Kontrol grubuna ait mesane dokusu; D. WAS modeli İS/MAS grubuna ait mesane dokusu.

Tablo 4.7. Gruplara ait histolojik skor sonuçları.

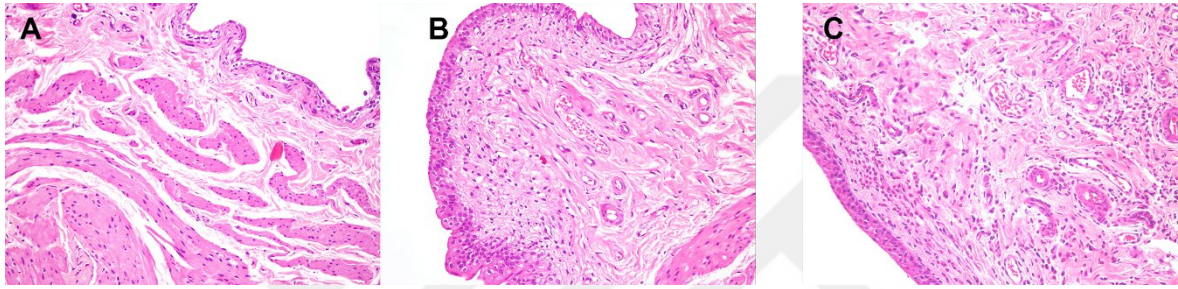
	Kontrol (n=8)	Kontrol+AF219 (n=8)	İS/MAS (n=8)	İS/MAS+AF219 (n=8)	p
CYP Modeli					
Histolojik Skor	1,25±0,463	1,13±0,354	2,00±0,00**	1,63±0,518	<0,001¶
WAS Modeli					
Histolojik Skor	1,63±0,518	1,63±0,744	2,63±0,518**	1,75±0,707#	0,009¶

¶ One Way Anova – Post Hoc Tukey Testi

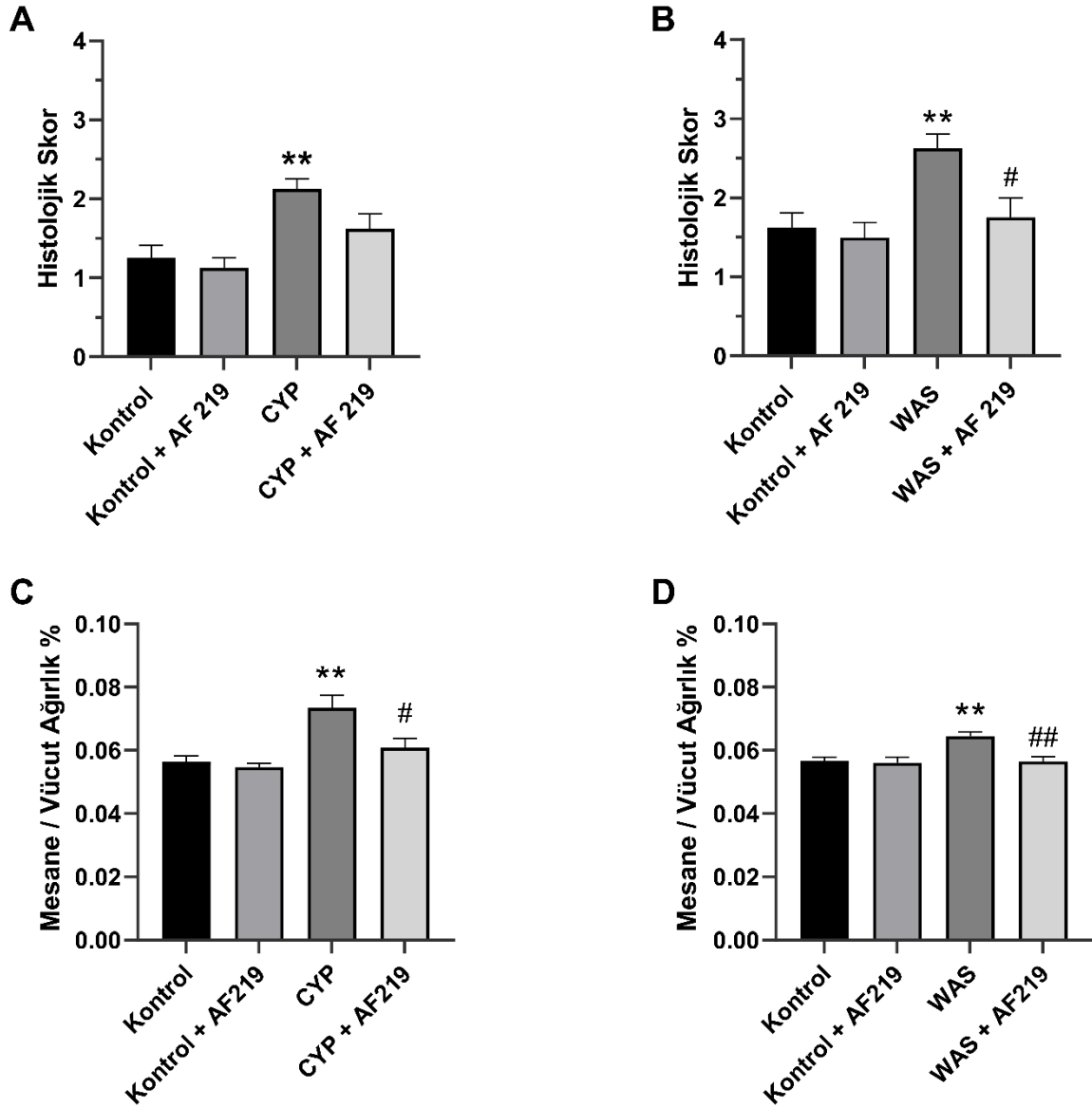
* İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol

İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS

* veya #: $p < 0,05$ ** veya ##: $p < 0,01$ *** veya ###: $p < 0,001$



Şekil 4.6. Mesane dokularının histopatolojik incelemeye ait mikroskopik görüntüleri (H&Ex200). A. CYP modeli Kontrol grubuna ait bir örnek, mesane mukozası normal görünümde olup, lamina propriada minimal inflamasyon, vaskülarizasyon ve interstisyel ödem mevcuttur. B. CYP modeli İS/MAS grubuna ait bir örnek, mesane mukozası normal görünümde olup, lamina propriada hafif-orta derecede inflamasyon, orta derecede vaskülarizasyon ve interstisyel ödem mevcuttur. C. WAS modeli İS/MAS grubuna ait bir örnek, mesane mukozası normal görünümde olup, lamina propriada ve muskularis propriaya uzanım gösteren orta derecede inflamasyon, vaskülarizasyon ve interstisyel ödem mevcuttur.



Şekil 4.7. Gruplara ait histoloji skorları ve mesane vücut ağırlık oranı (%) ait grafik görüntüleri. A. CYP modeli histolojik skor grafiği; B. WAS modeli histolojik skor grafiği; C. CYP modeli mesane vücut ağırlık oranı (%) grafiği; D. WAS modeli mesane vücut ağırlık oranı (%) grafiği. CYP ve WAS grup isimlendirmeleri İS/MAS'a karşılık gelmektedir. * İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol; # İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS; * veya #: $p<0,05$, ** veya ##: $p<0,01$, *** veya ###: $p<0,001$

4.4. WB Deney Sonuçları

Hem CYP hem WAS ile oluşturulan İS/MAS modellerinde P2X3, P2X7, Trk-A ve TRPV1 protein düzeyleri İS/MAS gruplarında kontrol gruplarına göre önemli ölçüde daha yüksek izlendi ($p<0,05$). TRPA1 protein düzeyleri ise her iki modelde de gruplar arasında farklılık göstermedi ($p>0,05$).

CYP modelinde, İS/MAS+AF219 grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında P2X3, Trk-A ve TRPV1 protein düzeyleri anlamlı olarak yüksek izlenirken ($p>0,05$), P2X7 proteini açısından fark izlenmedi ($p>0,05$). Diğer taraftan WAS modelinde ise, İS/MAS+AF219 grubu ile kontrol grubu arasında P2X3, P2X7, Trk-A ve TRPV1 açısından istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Yine WAS modelinde, İS/MAS grubuna göre İS/MAS+AF219 grubunda P2X3 ve P2X7 protein düzeylerinin önemli ölçüde daha düşük olması dikkat çekti ($p<0,05$). WB analizine ait sonuçlar Tablo 4.8.'de ve grafikler Şekil 4.8. ve 4.9.'da verilmiştir.

Tablo 4.8. Western Blot analiz sonuçları.

Protein/GAPDH	Kontrol (n=8)	Kontrol+AF219 (n=8)	İS/MAS (n=8)	İS/MAS+AF219 (n=8)	<i>p</i>
Ortalama±SS					
CYP Modeli					
P2X3	0,42±0,189	0,49±0,282	2,01±0,466**	1,72±0,321**	0,001[¶]
P2X7	0,31±0,240	0,48±0,404	2,18±0,534**	1,39±0,579	0,004[¶]
Trk-A	0,43±0,521	0,52±0,236	1,59±0,258**	1,28±0,036*	0,001[¶]
TRPV1	0,96±0,139	0,90±0,031	1,70±0,142**	1,59±0,259**	0,001[¶]
TRPA1	0,13±0,047	0,19±0,118	0,36±0,217	0,24±0,116	0,297 [¶]
WAS Modeli					
P2X3	0,72±0,262	1,05±0,400	2,00±0,697*	1,05±0,430 [#]	0,050[¶]
P2X7	0,74±0,094	0,97±0,190	1,64±0,306**	0,90±0,322 [#]	0,009[¶]
Trk-A	0,69±0,390	0,92±0,268	1,57±0,369*	1,39±0,111	0,024[¶]
TRPV1	0,64±0,147	0,67±0,081	1,22±0,210*	0,95±0,214	0,010[¶]
TRPA1	0,11±0,090	0,14±0,059	0,21±0,059	0,16±0,029	0,246 [¶]

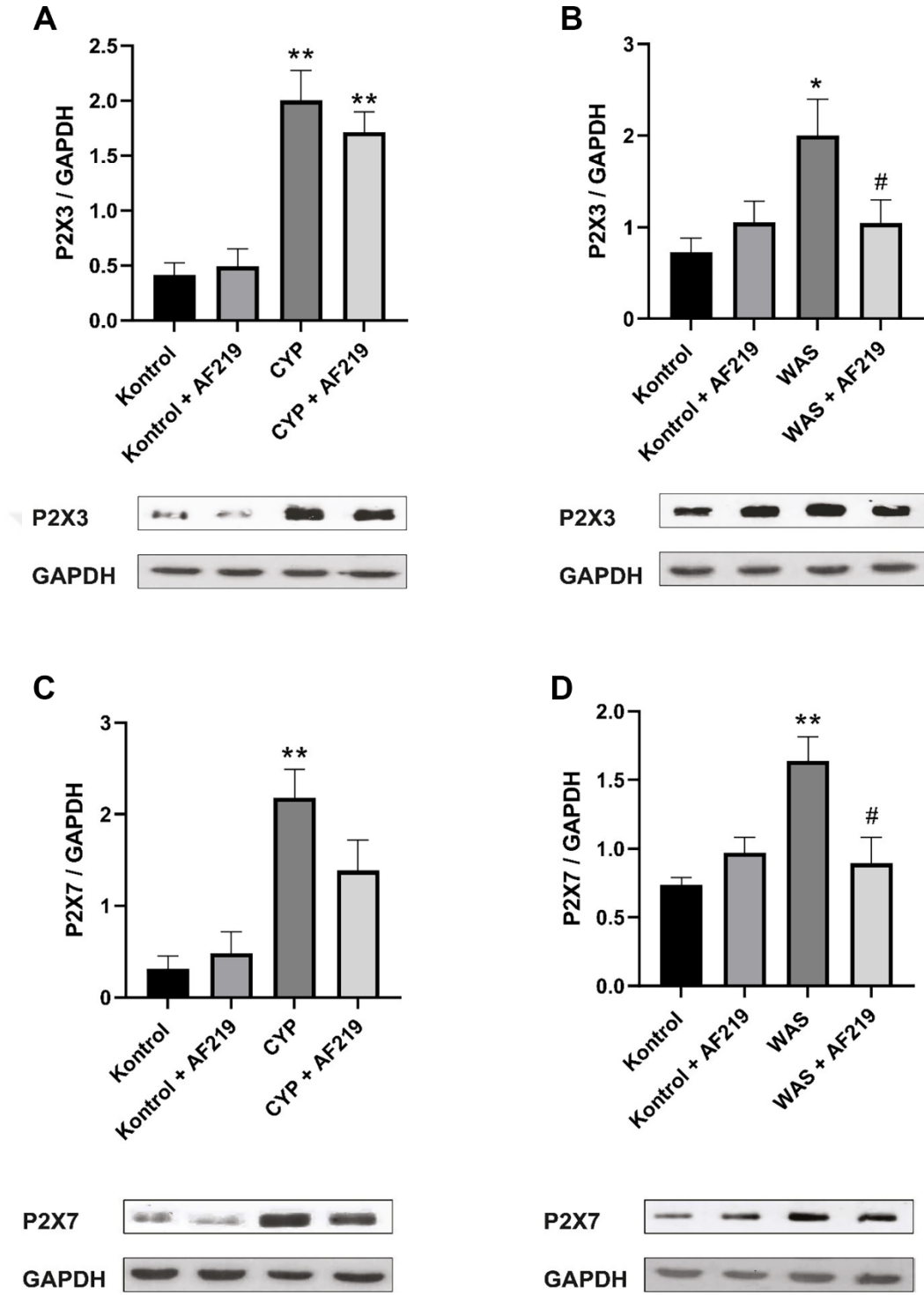
Not. Doku protein ekstraktları (n=64) toplamda 8 grup olacak şekilde örneklerden eşit konsantrasyonda alınarak gruplara ait protein havuzları (pooling) oluşturuldu ve her antikor için WB deneyleri üç kez tekrar edildi.

¶ One Way Anova – Post Hoc Tukey Testi; SS, Standart sapma

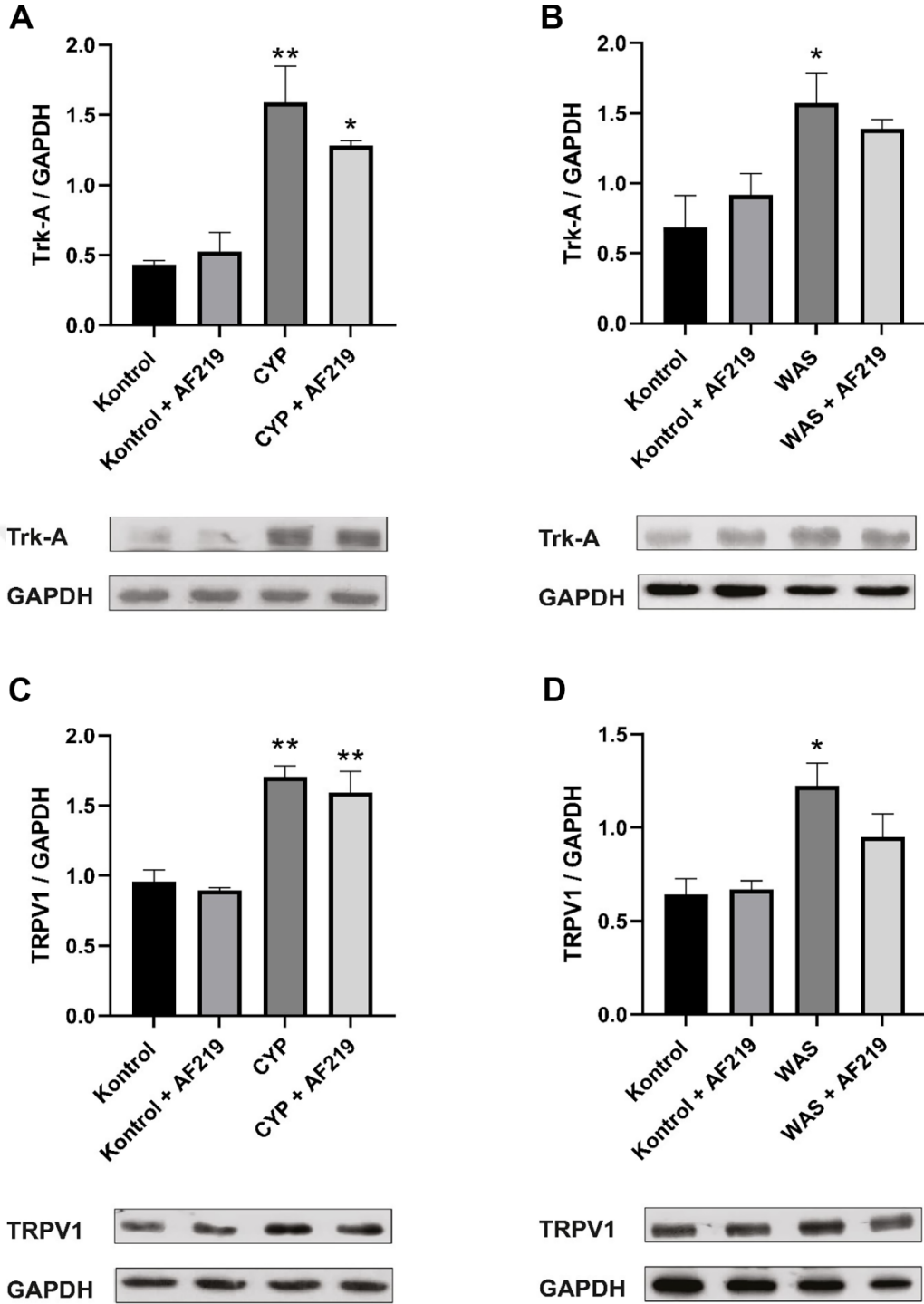
* İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol

İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS

* veya #: $p<0,05$ ** veya ##: $p<0,01$ *** veya ###: $p<0,001$



Şekil 4.8. P2X3 ve P2X7 pürinerjik reseptör proteinlerin WB analizine ait grafik ve membran bant görüntüleri. A. CYP modeli P2X3 / GAPDH grafiği; B. WAS modeli P2X3 / GAPDH grafiği; C. CYP modeli P2X7 / GAPDH grafiği; D. WAS modeli P2X7 / GAPDH grafiği. CYP ve WAS grup isimlendirmeleri İS/MAS'a karşılık gelmektedir. * İS/MAS vs. Kontrol, İS/MAS+AF219 vs. Kontrol; # İS/MAS+AF219 vs. İS/MAS; * veya #: $p<0,05$, ** veya ##: $p<0,01$, *** veya ###: $p<0,001$



Şekil 4.9. Trk-A ve TRPV1 reseptör proteinlerinin *WB* analizine ait grafik ve membran bant görüntüleri. A. CYP modeli Trk-A / GAPDH grafiği; B. WAS modeli Trk-A / GAPDH grafiği; C. CYP modeli TRPV1 / GAPDH grafiği; D. WAS modeli TRPV1 / GAPDH grafiği. CYP ve WAS grup isimlendirmeleri *İS/MAS*'a karşılık gelmektedir. * *İS/MAS* vs. Kontrol, *İS/MAS*+AF219 vs. Kontrol; # *İS/MAS*+AF219 vs. *İS/MAS*; * veya #: $p<0,05$, ** veya ##: $p<0,01$, *** veya ###: $p<0,001$

5. TARTIŞMA

Ürotelyumun bariyer özelliği dışında distansiyona iyi yanıt veren yapısı, idrar hissi ve detrusor kasılması üzerinde olan düzenleyici özellikleri bilinmektedir. Etiyolojisi bilinmeyen olarak tanımlanan İS/MAS'ın altta yatan mekanizmaları hakkında her gün daha fazla kanıt sunulmaktadır. Periferik ve merkezi duyarlılık İS/MAS'ın temel mekanizması gibi görünmektedir. Buna ek olarak, stresin bu mekanizma üzerindeki regülatör etkisi İS/MAS'ın daha kompleks bir hastalık olarak anlaşılmasına yol açmıştır. Bu mekanizmaların anlaşılmasında hem periferik hem de merkezi yollarda TRP, P2X, Trk, gibi reseptör ekspresyonundaki değişimlerin gösterilmesi tedavi için yeni hedefleri belirlemiştir.¹⁰⁶ Mesanenin kronik hasarı ya da inflamasyonu, bu proteinlerin değişen düzeyleri ile duysal yanıt değişikliklerine ve artmış nosiseptif tepkilere yol açabilmektedir.¹⁰² İlginç bir şekilde strese maruz bırakılmanın da bu proteinlerden bir kısmının ekspresyonunu artırdığına dair kanıtlar sunan araştırma sonuçları da mevcuttur. Bu sonuçlar kronik ağrı altında yatan mekanizmaları açıklayabilse de eşlik eden AÜSS'nin kaynağı hakkında çok fazla bilgi sunmamaktadır.¹⁷⁶ Hem stres hem de lokal etmenlerin mesanede benzer tablolar oluşturmaları, ürotelyumun bu iletim sisteminde kavşak noktası olabileceğini bize düşündürmüştür. Diğer yandan ürotelyumun girdi ve çıktı olmak üzere çift yönlü mekanizması sinir sistemi ile diğer mesane dokusuna ait hücreler arasında parakrin etki ile lokal düzenleyici etkisi olabileceği bildirilmiştir.¹⁰⁶ Bu nedenle daha önce aferent sinir terminalleri üzerinde gösterilen P2X3 reseptörlerinin bu kavşaktaki temel yapı ve patogeneze potansiyel mekanizma olabileceğini düşünerek, iki ayrı İS/MAS modelinde (hem stres hem de lokal etmenlerin senaryolaştırıldığı CYP ve WAS deneyleri), bu proteinin düzeyinin artabileceğini ve bu artmış protein ekspresyonunun patolojik bulgularla ilişkili olabileceğini, ayrıca P2X3 antagonisti olan AF219 ile bu etkilerin geri döndürülebileceği varsayımında bulunduk.

Deneyisel hayvan modellerinde, insanlardaki ağrıya eşdeğer kabul edilebilecek davranışsal tepkilerin nicelleştirilmesiyle ilgili zorluklar mevcuttur. Hayvanlar, insanlardan farklı olarak ağrıyı sözel olarak ifade edemezler. Bu nedenle hiçbir testin hayvanlardaki ağrıyı doğrudan ölçemeyeceği bilinmektedir.²³⁶ Bu nedenle hoş olmayan duygusal ağrı deneyimi; bir vücut parçasının bir uyarandan geri çekilmesi, etkilenen bölgenin tımarlanması, azalmış hareket ve huzursuzluk artışını içerebilen ağrı benzeri davranışlardan çıkarılır. Çalışmamızda ağrı benzeri davranış değerlendirilmesi için açık

alan, yükseltilmiş artı labirent, kuyruk çekme ve sıcak plaka testleri davranış deneyleri olarak kullanıldı. Ayrıca açık alan platformunda lokomotor aktiviteyi otomatik analiz eden sistem yardımıyla lokomotor skorlar elde edildi.

Açık alan testinde sıçanın açık alana konulmasıyla birlikte oluşan dışkılama sayısı ile ürkeklik arasındaki ilişki tanımlanmıştır. Deneklerin alışık olduğu ortamdan alınarak yeni çevreye konulmaları, grup ya da sürüden ayrılma ve açık alana bırakılma anksiyetesine yol açmaktadır. Anksiyetenin azalmasına bağlı olarak merkez bölgeye girme sayısı ve merkez bölgede geçirdiği süre artmaktadır. Aksine anksiyete artışı ile birlikte periferik bölgede geçen süre artmaktadır. Açık alana konan hayvanlarda anksiyete artışına bağlı olarak sınırları belirli testin duvar ve köşelerine kaçma, periferde vakit geçirme isteği görülür. Bu davranışa “*thigmotaxis*” denir. Ayrıca açık alana konan hayvanlarda yeni çevre hem merak uyandırmakta hem de anksiyeteye yol açmaktadır. Her iki duygunun çatışmasında merak duygusu daha ağır basması durumunda hayvan yeni çevreyi araştırma davranışı olarak iki ayağı üzerine kalkma (*rearing*) davranışını yapmaktadır.^{239,240} Bu tez çalışmasında, CYP modeli İS/MAS grubunda kontrol grubuna göre azalmış vertikal hareketi, WAS modelinde ise İS/MAS grubunda kontrol grubuna göre artmış dışkılama sayısını saptadık. Diğer yandan her iki modelde de İS/MAS’lı deneklerin merkez bölgede daha az zaman geçirdiklerini tespit ettik. Hem WAS modelinin hem de CYP modelinin sıçanlar üzerinde anksiyete oluşturduğu gözledik. Bunun nedeninin ise her iki deneyde de oluşturulan sistit’in mesane disfonksiyonu yaratarak farklı hayvan davranışlarına sebep olabileceği sonucunu çıkarmamıza neden olmuştur. Buna ek olarak WAS modelinde stres faktörünün hastalık patofizyolojisinde rol oynaması, sıçanlarda görülen anksiyete ile direk olarak ilişkilendirilebilir. Mesanenin kronik hasarlanmasının MSS’de birtakım değişikliklere (merkezi duyarlılaşma) neden olması bu etkinin altında yatan mekanizma olabilir.

Yükseltilmiş artı labirent testinde denek açık alan testinde olduğu gibi merkez bölgeye konulur. Merkez bölge iki açık iki kapalı kolun kesiştiği bölgedir. Yeni çevre ve yükseklik, kafesinden alınan denekte anksiyeteye yol açabilir. Artan anksiyeteye bağlı olarak kapalı kolda geçirilen süre artarken, anksiyetenin azalmasına bağlı olarak ise açık kolda geçirilen süre artmaktadır. Ayrıca deneklerin toplam kollara giriş sayıları, lokomotor aktivitenin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.^{243,252} Deneyimizde her iki modelde gruplar arasında total lokomotor aktivite skorları farklılık göstermemiş olup yükseltilmiş artı labirent testi

toplam kollara giriş sayılarında da farklılık olmaması bu sonucu desteklemiştir. Bunlara ek olarak her iki modelin İS/MAS gruplarında kontrol gruplarına göre açık kolda geçirilen sürenin daha az olması her iki yöntemin de denekler üzerinde anksiyeteyi artırdığı sonucunu doğrulamıştır. WAS modelinde uygulanan stresin anksiyete oluşmasında etkisi göz ardı edilemez ancak CYP modelinde de benzer davranışların tespit edilmesinden dolayı, ağrının kendisi de anksiyete gelişiminde bir etken olabilir.

Ağrılı uyaranlara verilen tepkinin şiddeti veya bu tepkiye kadar geçen zaman miktarı ile ağrı davranışları değerlendirilmektedir.²³⁸ Biz bu çalışmada kuyruk çekme ve sıcak plaka ile noksiyus uyarıya verilen tepkiye kadar geçen süreyi hesapladık. Bu nosiseptif tepki süreleri her iki test ve her iki model için de İS/MAS gruplarında daha kısaydı. Akut ve tekrarlanan kısıtlama stresinin, kuyruk hareketi gecikmesi ile ölçülen nosisepsiyon üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmada tek bir kısıtlama seansına maruz kaldıktan sonra hem erkek hem de dişi sıçanlarda, kuyruk çekme yanıtında artan bir gecikme tespit edilmiştir. Öte yandan, kronik olarak stresli dişiler, kontrol grubuna benzer bir performans sergilerken, kronik olarak stresli erkek sıçanlar, kısıtlamaya kuyruk hareketi tepki süresinde bir azalma ile yanıt vermiştir. Araştırmacılar akut stresin hem erkek hem de dişi sıçanlarda bir analjezik yanıtı indüklediği ve kronik stresin ise erkek sıçanlarda hiperaljezik etki oluşturduğu sonucuna varmıştır. Yine bu araştırmacılar tarafından, ani tehlike varlığında artan ağrı eşiğinin savaş ya da kaç tepkisine katkıda bulunabileceği ve ayrıca strese uzun süreli maruz kalmanın nörohumoral yanıtlar üzerinden nosiseptif davranış değişikliklerine neden olabileceği fikirleri ortaya atılmıştır.²⁵³ Kronik stresin sıçanların duyuşsal ve motor fonksiyonlarına etkisi üzerine yapılan bir çalışmada sıcak plaka testinde kronik strese maruz kalan deneklerin kontrollere kıyasla daha kısa tepki sürelerine sahip olduğu tespit edilmiş, kronik stresin ağrılı uyaranlara karşı aşırı duyarlılığa neden olabileceği bildirilmiştir.²⁵⁴ Çalışmamızda hem CYP hem WAS'ın dişi sıçanlar üzerinde hiperaljezik bir etki oluşturduğu, bu hiperaljezik etkinin AF219 tarafından geri döndürülmesi ile birlikte, bu etkiden P2X3 yolağının sorumlu olabileceğini bize düşündürmüştür. AF219 molekülünün kontrol gruplarında uygulanması ile analjezik herhangi bir etki gözlemlenmedi. Bu sebeple, AF219'un doğrudan bir analjezik etkisinden çok İS/MAS ile duyarlılığı artmış pürinerjik yolağın tedavi sonrası aktivitesinin azalması bu sonuca neden olmuş olabilir. Bunlara ek olarak her iki modelin denekler üzerinde anksiyeteyi artırması ancak İS/MAS+AF219 da bu etkinin kaybolması AF219 ile İS/MAS

semptomlarındaki iyileşmenin anksiyete üzerinde olumlu etki yarattığı sonucunu çıkarmamıza neden olmuştur. Yine Kontrol+AF219 gruplarında kontrol gruplarıyla benzer davranışların gözlemlenmesi molekülün direk anksiyolitik etkisinden çok patolojinin gerilemesi ve iyileşmenin doğal bir sonucu kabul edilebilir.

İS/MAS'lı hastalarda ağrıya eşlik eden AÜSS mevcuttur. Fenotiplendirmeye dayalı tedavi seçeneklerinde bu semptomları hafifletmek ve iyileştirmek amacıyla antimuskarinik tedaviler önerilmektedir. Yine bu hastaların idrarında ATP düzeyi sağlıklı insanlara göre daha yüksek oranda tespit edilmektedir. İS/MAS'ın mesane kasılmalarına etkilerini incelemek amacıyla bu çalışmada mesane dokuları izole organ in vitro deneyleri ile değerlendirildi. Her iki modelde de İS/MAS'lı sıçanların muskarinik bir ajan olan karbakol ile kasılma yanıtlarının artmış olduğu tespit edildi. Yine her iki modelin İS/MAS gruplarında kontrollere göre ATP'ye artmış kasılma yanıtları izlendi. Ayrıca kolinerjik ve adrenerjik blokaj altında EAU kasılma yanıtlarının yine İS/MAS gruplarında kontrollere göre artmış olması mesanede kolinerjik ve pürinerjik yolakların aktifleştiğini ve detrusorun bu yolaklara daha duyarlı hale geldiği sonucuna tarafımızca varılmıştır. İlginç bir şekilde İS/MAS+AF219 gruplarında hem kolinerjik hem de pürinerjik yanıtların kontrollerden farksız ve İS/MAS gruplarından anlamlı şekilde düşük olduğunu tespit ettik. Bir diğer yandan adrenerjik ve kolinerjik blokaj yanında AF219 ile pürinerjik blokaj sonrası daha önce yüksek kasılma yanıtları alınan İS/MAS gruplarında, kontrollere göre kasılma yanıtları arasında farklılık izlenmedi. Bu sonuç ile P2X3 reseptör antagonisti bir molekül olan AF219'un kolinerjik yolak üzerinde düzenleyici potansiyel bir etkisinden bahsedilebileceği kanaati oluştu.

Mesane, spontan aksiyon potansiyelleri, spontan geçici depolarizasyonlar ve spontan kasılmalar şeklinde spontan elektriksel ve mekanik aktivite sergilemektedir. Bu aktivitenin, TTX veya bir kolinerjik, adrenerjik ve pürinerjik reseptör antagonistleri kokteyline karşı duyarsızlığı nedeniyle, genellikle miyojenik kökenli olduğu kabul edilirdi.²²⁹ Bu aktivite tek başına işeme için yeterli kasılmalara yol açamayan ancak idrar boşaltımı için optimal mesane şeklini koruyabilen düşük amplitüdlü durumları temsil etmektedir.²³⁰ Spontan kasılmalar detrusor düz kasının fizyolojik bir özelliğidir. Kobay detrusor kasındaki spontan elektriksel dalga sıklığının ATP tarafından artırıldığı mikroelettrot kayıtlarında saptanmıştır. Fare mesanesinde ATP'nin spontan nöronal salınımı ile spontan aksiyon potansiyeli oluşumunun tetiklemesi, ATP'nin düz kas hücreleri üzerindeki NF449'a (P2X1

antagonisti) duyarlı P2X1 reseptörlerine bağlanması ardından katyon akışı ile depolarizasyonun sağlanması ve bu depolarizasyonun aynı zamanda L-tipi Ca^{2+} kanallarını aktive etmesine dayandırılmıştır.²³¹ Araştırmacılar, kayıtların alındığı fare mesanesinde, spontan aksiyon potansiyellerinin miyojenik kökenli olmaktan ziyade, ATP'nin spontan nöronal salınımı ile meydana geldiği sonucuna varmışlardır. Bununla tutarlı olarak, izole edilmiş kobay detrusor düz kasına (mukoza içermiyor) ilişkin iki ayrı çalışma, spontan kasılma sıklığının ve genliğinin ATP'deki geçici artışlarla, detrusordaki sinir terminallerinden ATP'nin spontan salınımı yoluyla ilişkili olduğunu göstermiştir^{232,233}. Spontan aktiviteyi etkilemeye ek olarak, pürinerjik aracılı mukozal sinyalizasyon, EAU aracılı detrusor kasılmalarının amplitüdünü de etkileyebilmektedir. Bir diğer çalışmada, EAU kasılmaları, *ex vivo* olarak ışınlanmış tam kalınlıkta kobay mesane şeritlerinde, ışınlanmamış şeritlere göre daha düşük amplitüdlü tespit edilmiş; mukozadan arındırılmış şeritlerle yapılan karşılaştırmalarda ise, araştırmacılar radyasyonun mukoza olmadığında EAU kasılmalarını etkilemediğini ve radyasyona duyarlı mukozal modülasyonu desteklediğini göstermiştir.²³⁴ Burnstock ve ark. ATP kaynaklı ATP salınım yolağını, ürotelyal ve endotelyal hücrelerde (ürotelyal hücrelerde daha belirgin olmak üzere) göstermiştir. Ürotelyum, ATP'nin daha fazla salınmasına katkıda bulunabilecek çeşitli P2X (P2X₁₋₇) ve P2Y (P2Y_{1,2,4}) pürinerjik reseptörlerini eksprese etmektedir.^{205,220} P2X3 reseptörlerinin detrusor kasılmaları üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmada, protamin sülfat ile ürotelyal tabaka ortadan kaldırılmış grup ve ürotelyumu intakt olan gruba P2X3 reseptör antagonisti (AF353) intravezikal uygulanarak hem sistometrik hem de *in vitro* mesane şeritlerinde kasılma yanıtları gözlemlenmiş ve mesane fonksiyonu değerlendirilmiştir. İmmunohistokimyasal inceleme ile ürotelyumun medial ve bazal katmanlarında yüksek P2X3 reseptör ekspresyonu gösterilmiş olmakla birlikte ürotelyal tabakanın çıkarılması P2X3 reseptör antagonistinin kasılma aralığını arttırma ve kasılma amplitüdünü azaltma üzerindeki etkilerini ortadan kaldırmıştır. Ürotelyumun çıkarılması KCl veya EAU ile mesane şeridi kontraktıl yanıtlarını etkilemezken, P2X3 reseptör inhibisyonunun yalnızca ürotelyumu intakt olan mesane şeritlerinde EAU kasılma yanıtlarını azalttığı gösterilmiştir. Araştırmacılar, ürotelyum üzerindeki P2X3 reseptörleri üzerinden ATP salınımındaki değişikliklerin P2X1 aracılı detrusor kasılmalarına duyarlılığı arttırabileceği sonucu çıkartmıştır.²⁵⁵ Sonuçlarımız literatür ile uyumlu olmakla birlikte, aktifleşen P2X3 yolağının hem ürotelyumdan hem de detrusor komşuluğundaki afferent

terminallerden ATP salınımını artırdığı bununla detrusor üzerindeki P2X1 ve kolinerjik reseptörler üzerinde artan aktivasyona neden olabileceğini bize düşündürmüştür. Buna ek olarak bu tez çalışması, AF219'un bu etkileri zayıflatması, kolinerjik yolak üzerinde düzenleyici bir etkisinin olabileceğini ve ayrıca ürotelyum üzerindeki ATP salınımında artış ve detrusorun bu yolağa duyarlılaşmasını engelleyerek mesane fonksiyonunu iyileştirebilecek potansiyelinin olabileceğini bize göstermiştir.

İS/MAS'ı taklit edebilecek ve bir İS/MAS deneysel modeli kabul görme şartı olan mesane dokusundaki patolojik değişiklikler bu tez çalışmasında hem CYP hem de WAS modelinde başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Her iki modelinde daha önceki çalışmalarından ödem inflamatuvar infiltrasyon, konjesyon, ürotelyumda erozyon gibi tablolara yol açtığı bilinmektedir. Çalışmamızda bu parametreleri kapsayan inflamasyon tabanlı bir skorlama sistemi kullanılmıştır.²⁵⁰ İS/MAS gruplarında kontrollere göre daha yüksek skorların tespit edilmesi ve bu sonuçların literatür ile uyum göstermesi her iki yöntemde de İS/MAS modeli oluşturmada başarılı olduğumuza kanıt oluşturmaktadır.^{246,256,257} Ayrıca her iki modelin İS/MAS+AF219 gruplarında kontroller ile farklı olmayan skorlar gözlemlenmiştir. Çalışmamızda İS/MAS'ın mesane dokusunda yarattığı inflamasyon tablosunu AF219'un hafiflettiği gösterilmiştir. Yine literatürle uyumlu olarak WAS modeline göre CYP'de daha az inflamatuvar infiltrasyon tespit ettik.²⁵⁷ CYP daha çok mesanede mekanik hasar ile etki gösterirken, WAS'ın ise daha çok inflamasyon aracılı mekanizmaları aktifleştirdiğini düşünmekteyiz. Yine her iki modelin mesane ağırlıkları ve vücuda oranlanmış değerleri, literatürle uyumlu olarak İS/MAS gruplarında daha yüksek bulundu.^{246,257} Ancak İS+AF219 gruplarında kontrollerle farklı olmayan değerler görüldü. CYP'de ise ödem ve mesane ağırlıklarının daha fazla arttığını gözlemledik. CYP modellerinde inflamasyon skorunu bizim çalışmamıza göre daha yüksek tespit eden bir çalışma sonucu da mevcuttur ancak bu çalışmada uygulanan CYP dozu çok daha yüksektir.²⁵⁶ İS/MAS modellerinin geliştirilmesiyle düşük dozlarda CYP uygulanmasının İS/MAS'ı taklit etmede daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır.⁹ Gerçektende inflamatuvar hücrelerin aşırı artışı normalde az oranda gördüğümüz hunner lezyonu eşlik eden İS/MAS'lı hastaları taklit etmektedir. Diğer İS/MAS'lı hastaların mesane dokularında daha hafif inflamasyon tespit edilmektedir. Dolayısıyla bizim modelimizde kullandığımız CYP dozu ve uygulama sıklığı, İS/MAS'ın histopatolojik özelliklerini daha iyi yansıtabileceği kanaatindeyiz.

Ürotelyum ve mesane afferent sinir terminalleri üzerinde bulunan P2X3, P2X7, Trk-A, TRPV1 ve TRPA1'in akut sistit ve İS/MAS patogenezinde rolü prelinik çalışmalarda araştırılmıştır. Bu çalışmalar daha çok CYP'nin, yüksek dozda tek seferlik uygulandığı akut sistit veya daha düşük dozlarda birkaç kez uygulandığı İS/MAS hayvan modelleri üzerinde gerçekleştirilmiştir.²⁵⁸⁻²⁶³ Bu tez çalışmasında, ilk kez hem WAS hem de CYP İS/MAS modellerinde P2X3, P2X7, Trk-A, TRPV1 ve TRPA1 protein düzeyleri *WB* deneyleri ile bir arada incelendi. Çalışmamıza ait her iki modelde de P2X3, P2X7, Trk-A, TRPV1 protein düzeylerinin İS/MAS ile arttığı tespit edildi. İS/MAS modelleri, TRPA1 protein düzeyinde yüksekliğe neden olsa da bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi. CYP ile oluşturulmuş sistit modelinin kullanıldığı bir çalışmada mesane dokusunda TRPA1 düzeyleri araştırılmıştır. Araştırmacılar, sıçanlarda intratekal TRPA1 antagonist uygulanması ile TRPA1 reseptörünün bloke edilmesinin afferent işeme yolları üzerindeki etkilerini incelemiştir. Tek doz CYP uygulaması sonrası L6-S1 dorsal kök ganglionlarında TRPA1 mRNA ve TRPA1 protein ekspresyonu düzeylerini sistit grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek saptamışlar ancak ürotelyal mukozada anlamlı bir farklılık tespit etmemişler. Tek doz CYP ile oluşturulmuş sistite sekonder mesane dokusundaki TRPA1 ekspresyon düzey farklılığı bizim sonucumuzla benzerlik göstermiş olsa da akut sistit ve İS/MAS mekanizmalarının farklılığı bu sonuçların bir arada yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca, başka bir çalışmaya ait CYP-İS/MAS modelinde, lumbosakral L6-S2 ve torakalomber T12-L2 DKG'de P2X2/3 ve P2X3 protein ekspresyon artışı immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Mesane dokusunda meydana gelen hasarın hem pelvik hem de lomber splanknik yollarda P2X reseptör ekspresyonunu arttırdığı veya nöronların aktivasyon eşiğinde azalmaya neden olarak bu yolları hassaslaştırdığı saptanmıştır.¹²⁹ Östrojenin İS/MAS üzerindeki terapötik etkisini inceleyen diğer bir çalışmada, östrojenin ürotelyum P2X3 reseptörlerinin ekspresyonunu ve bunun üzerinden ürotelyumdan salınan ATP'yi azaltarak mesane aşırı aktivitesini iyileştirdiği kanıtlanmıştır.²⁶² Bu bahsedilen iki çalışmada da, mesane kasılma / uyarılabilme potansiyelinin P2X reseptör ekspresyonunun seviyeleriyle doğru orantılı olması, bizim çalışmamıza ait sonuçlarının literatürle uyumlu olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan akut ve kronik CYP uygulamalarının ürotelyum ve detrusorda TRPV1 ekspresyonlarına etkisini inceleyen bir çalışmada ise, akut CYP uygulaması TRPV1 ekspresyon düzeyine etki etmemiş; kronik CYP uygulaması ise bu reseptörün aşırı ekspresyonuna neden olmuştur.²⁴⁸

Yine benzer bir araştırmada, CYP tabanlı İS/MAS modeli ile İS/MAS'lı grupta kontrol grubuna göre L6-S1 DKG'de TRPA1 ve TRPV1 ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiştir.²⁶³ Mesane nosiseptif duyarlılaşmada ilişkisi ispatlanmış bu proteinler ilk kez bu tez çalışmasında birlikte değerlendirildi. Daha önce CYP İS/MAS modellerinde P2X3 reseptör ekspresyonundaki değişimler incelenmiş WAS'ın bu reseptör üzerindeki etkisini gösteren bir çalışma sonucuna rastlanmamıştır. Uzun süreli strese maruz kalmanın P2X3 reseptörü üzerindeki etkileri ilk kez bu çalışmada incelenmiştir. Bu reseptörlerin hem mesane afferent sinirleri üzerinde hem de DKG'de kronik uyarı ile ekspresyonlarının regüle edildikleri iyi bilinmektedir. P2X3 yolağı bu reseptörlerin düzeyini ve duyarlılığını etkileyebildiği gibi ürotelyumun çift yönlü çalışma mekanizması sonucunda bu reseptörlerde pürinerjik yolak üzerinde düzenleyici etkileri vardır.^{102,106} Bizim çalışmamızda hem CYP hem WAS İS/MAS modellerinde bu proteinlerin düzeyleri artış trendi gösterirken, AF219 uygulaması sonrası bu proteinlerin düzeylerindeki düşüş sadece WAS İS/MAS modelinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. CYP/İSMAS modelinde ise istatistiksel bir düşüş gözlenmemiştir. Ancak her iki modelin İS/MAS gruplarında düzeyini anlamlı olarak yüksek tespit ettiğimiz P2X7, İS/MAS+AF219 gruplarında İS/MAS gruplarına göre her iki modelde de anlamlı olarak daha düşük düzeydeydi. Tek doz CYP ile indüklenmiş akut sistit modeli üzerine yapılan bir çalışmada, sistitli farelerin mesanelerinde, kontrollere göre daha yüksek düzeyde P2X7 proteini izlenmiş, mesane inflamasyonunun P2X7 reseptör antagonisti ile gerilediği gösterilmiştir. Araştırmacılar, sistit kaynaklı mesane inflamasyonunda temel mekanizmanın aktivasyonu artan ATP-P2X7 yolağı olabileceğini belirtmiştir.²⁶⁴ Diğer yandan, P2X7 reseptörleri, diğer pürinerjik reseptörlerden farklı olarak, daha yüksek konsantrasyonlarda ATP ile aktive edilmektedir. P2X7 reseptörlerinin ekspresyonun artması için ortamdaki ATP'nin çok yüksek düzeylere ulaşması gerekmektedir.²⁶⁵ Bu tez çalışmasında her iki modelde de İS/MAS gruplarında P2X7 reseptör düzeyi kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. CYP modeli İS/MAS+AF219 grubunda WAS modeli İS/MAS+AF219 grubundan farklı olarak AF219 ile P2X3 protein düzeyinde anlamlı bir azalma yoktu. Ancak her iki modelin İS/MAS+AF219 grupları kontrollerden farklı olmayan inflamasyon skorlarına sahipti. AF 219'un ürotelyum ve afferent sinir terminallerinde ATP salımına ve dolaylı yoldan P2X7 reseptörlerini aktive edecek ATP konsantrasyon düzeylerine etkisi ile P2X7 reseptörlerinin aktivasyonunu azaltmış olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada CYP ve WAS ile indüklenmiş iki farklı İS/MAS modelinde, İS/MAS'ın nosiseptif tepkileri artırdığı, mesane histolojisinde ve fonksiyonunda değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Mesane kasılma yanıtları ve nosisepsiyondaki bu değişiklikler P2X3 üzerinden aktiveşen pürinerjik yolağın bir sonucu olduğı ve bu yolağın afferent yolların duyarlılaşmasında rolü olan diğere proteinlerin ekspresyonu üzerinde düzenleyici bir etkisi olabileceğı sonucuna varılmıştır.

P2X3 reseptör antagonisti AF219 ile İS/MAS'a bağılı inflamasyon skorlarında düzelme ile birlikte ağrı/anksiyeteyi yansıtan davranış değişikliklerinde de iyileşme sağlanmıştır. Bu iyileştirici etkiye ilave olarak, mesane kasılma amplitüd ve frekans yanıtlarındaki düzelme de görölmüştür. İlacın bu iyileştirici etkisi iki farklı mekanizmaya sahip İS/MAS modelinde de kanıtlanmıştır. AF219'un semptomlar üzerindeki bu pozitif etkisi yanında afferent iletim sisteminin duyarlılaşmasında rolü olan reseptörlerin artmış ekspresyonu stres ile indüklenmiş İS/MAS'da geri döndürölebilmıştır. Ancak CYP modelinde semptomlardaki iyileşmeye bu proteinlerin azalma yönünde bir eğilimi eşlik etmemiştir. Bunun nedeni CYP'nin mesanede hedeflenenden daha fazla organik hasara yol açması veya AF219 uygulandığı gün sayısının az olması olabilir kanaatindeyiz.

Bu çalışmada AF219'un, stres ya da psikojenik semptomları belirgin veya organ spesifik inflamatuvar klinik bulguları olan İS/MAS hastalarının tedavisinde potansiyel olarak yararlı olabileceğı düşünölmüştür. İS/MAS'ın patofizyolojisini daha iyi anlayabilmek, prognostik faktörleri ve tedavi hedeflerini belirleyebilmek için ilerleyen zamanlarda P2X3 reseptörleri üzerine yapılacak preklinik ve klinik araştırmalar literatüre önemli katkılar sunabileceğini düşünmekteyiz.

7. TÜRKÇE ÖZET

Giriş ve Amaç:

Bu çalışmada, iki farklı deneysel İnterstisyel Sistit / Mesane Ağrı Sendromu (İS/MAS) modelinde pürinerjik yolağın İS/MAS mekanizmasındaki rolünü ve P2X3 reseptör antagonisti AF219'un terapötik etkilerini belirlemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntemler:

Siklofosfamid (CYP, n=32) ve kronik sudan kaçınma stres protokolü ile (WAS, n=32) ile indüklenmiş İS/MAS modelleri için toplam 64 adet yetişkin dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Her iki modelde de denekler 4'er gruba (n=8; her grup için) ayrıldı: (1) Kontrol, (2) Kontrol+AF219, (3) İS/MAS ve (4) İS/MAS+AF219. CYP 75 mg/kg, 1 ml, 3 günde bir (1, 4 ve 7. günlerde) toplam üç doz intraperitoneal (i.p.) uygulandı. WAS protokolü için sıçanlar 10 gün boyunca her gün 1 saat pleksiglas kutuların merkezine yerleştirilmiş platformun üzerinde bekletildi. İS/MAS'ın nosisepsiyon ve anksiyete üzerindeki etkileri davranış deneyleri ile değerlendirildi. Mesanedeki inflamasyon şiddeti histopatolojik inceleme ile skorlandı. Mesane kasılma ve gevşeme yanıtları izole *in vitro* organ deneyleri ile değerlendirildi. Western blot deneyleri ile mesane dokusunda P2X3, P2X7, Trk-A, TRPV1 ve TRPA1 protein düzeyleri analiz edildi.

Bulgular:

Her iki deney modelinde İS/MAS gruplarının kontrol gruplarına göre noksiyus uyarılara yanıt verme süreleri daha kısa ve sergilenen anksiyete benzeri davranışlar daha fazlaydı ($p<0,05$). İS/MAS grupları diğer gruplara göre daha yüksek inflamasyon tabanlı histolojik skor değerlerine sahipti ($p<0,05$). İS/MAS+AF219 gruplarında ise hem davranış deneylerine ait sonuçlar hem de histolojik skorlar kontroller ile farklılık göstermedi ($p>0,05$). Mesane şeritlerinin *in vitro* deneylerinde, her iki modelin İS/MAS gruplarında kontrol gruplarına göre Karbakol'e, ATP'ye ve Elektriksel Alan Uyarısı'na (EAU) karşı artmış kasılma yanıtları var iken ($p<0,05$) Karbakol ve ATP'nin kümülatif konsantrasyonlarında ve EAU'nun artan frekanslarında İS/MAS+AF219 ile kontrol grupları arasındaki kasılma yanıtlarında farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$). Buna ek olarak her iki modele ait tüm grupların mesane şeritleri, 10^{-5} M AF219 ile inkübe edildiğinde gruplar arasındaki EAU kasılma yanıtlarında istatistiksel olarak farklılık izlenmedi ($p>0,05$). Hem CYP hem de WAS ile oluşturulan İS/MAS modellerinde P2X3, P2X7, Trk-

A ve TRPV1 protein düzeyleri, İS/MAS gruplarında kontrol gruplarına göre önemli ölçüde daha yüksek izlendi ($p<0,05$). TRPA1 protein düzeyleri ise her iki modelde de gruplar arasında farklılık göstermedi ($p>0,05$). CYP modelinde, İS/MAS+AF219 grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında P2X3, Trk-A ve TRPV1 protein düzeyleri anlamlı olarak yüksek izlenirken ($p>0,05$), P2X7 proteini açısından fark izlenmedi ($p>0,05$). Diğer taraftan WAS modelinde ise, İS/MAS+AF219 grubu ile kontrol grubu arasında P2X3, P2X7, Trk-A ve TRPV1 açısından istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Yine WAS modelinde, İS/MAS grubuna göre İS/MAS+AF219 grubunda P2X3 ve P2X7 protein düzeylerinin önemli ölçüde daha düşük olması dikkat çekti ($p<0,05$).

Sonuç:

Bu çalışmada CYP ve WAS ile indüklenmiş iki farklı İS/MAS modelinde, İS/MAS'ın nosiseptif tepkileri artırdığı, mesane histolojisinde ve fonksiyonunda değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Mesane kasılma yanıtları ve nosisepsiyondaki bu değişikliklerin P2X3 üzerinden aktifleşen pürinerjik yolağın bir sonucu olduğu ve bu yolağın afferent yollarının duyarlılaşmasında rolü olan diğer proteinlerin ekspresyonu üzerinde düzenleyici bir etkisi olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca AF219 ile bu etkiler geri döndürülebilmektedir. AF219'un her iki fenotipteki İS/MAS hastalarının tedavisinde potansiyel olarak yararlı olabileceği kanaati oluşmuştur.

Anahtar Kelimeler: Mesane ağrı sendromu, İnterstisyel Sistit, P2X3, AF219, Pürinerjik yolak

8. İNGİLİZCE ÖZET / ABSTRACT

Introduction:

In this study, we aimed to determine the function of the purinergic pathway in the development of Interstitial Cystitis / Bladder Pain Syndrome (IC/BPS) and the therapeutic effect of P2X3 receptor antagonist AF219 in two experimental models of IC/BPS.

Materials and Methods:

Sixty-four adult female Wistar albino rats were utilized for IC/BPS models induced by cyclophosphamide (CYP, n=32) and water avoidance stress (WAS, n=32). In both models subjects were divided into four groups (n=8; for each group): (1) Control, (2) Control+AF219, (3) IC/BPS, and (4) IC/BPS+AF219. CYP 75 mg/kg/ml was administered intraperitoneally (i.p.), qd in three (days 1, 4, and 7) days for a total of three doses. For the WAS protocol, rats were placed every day on the platform in the center of the plexiglass boxes for 1 hour for ten days. The effects of IC/BPS on nociception and anxiety were evaluated with behavioral experiments. The severity of inflammation in the bladder was scored by histopathological examination. Bladder contraction and relaxation responses were evaluated in *in-vitro* isolated organ-bath experiments. Protein levels of P2X3, P2X7, Trk-A, TRPV1, and TRPA1 in bladder tissue were analyzed by western blot experiments.

Results:

In both experimental models, the IC/BPS groups had shorter response times to noxious stimuli and more anxiety-like behaviors than the control groups ($p<0.05$). The IC/BPS groups had higher inflammation-based histological scores than the other groups ($p<0.05$). In the IC/BPS+AF219 groups, both behavioral test results and histological scores did not differ from controls ($p>0.05$). In the *in-vitro* experiments of bladder strips, while there was increased contractile responses to Carbachol, ATP, and Electrical Field Stimulation (EFS) ($p<0.05$) in the comparisons between IC/BPS groups of both models and the control groups, there was no difference ($p>0.05$) between IC/BPS+AF219 and control groups at cumulative concentrations of Carbachol and ATP and at increased frequencies of EFS. In addition, when the bladder strips of all groups of both models were incubated with 10^{-5} M AF219, no statistical difference was observed in the EFS contractile responses between the groups ($p>0.05$). Levels of P2X3, P2X7, Trk-A, and TRPV1 proteins were significantly higher in both CYP and WAS IC/BPS groups when compared with their control groups ($p<0.05$). TRPA1 protein levels did not differ between groups in both models ($p>0.05$). In

the CYP model, P2X3, Trk-A, and TRPV1 protein levels were significantly higher in the IC/BPS+AF219 group compared with the control group ($p>0.05$), while no difference was observed in terms of P2X7 protein ($p>0.05$). On the other hand, in the WAS model, no statistically significant difference was observed between the IC/BPS+AF219 group and the control group in terms of P2X3, P2X7, Trk-A, and TRPV1 ($p>0.05$). Also, in the WAS model, the P2X3 and P2X7 protein levels were significantly lower in the IC/BPS+AF219 group compared with the IC/BPS group ($p<0.05$).

Conclusions:

In this study, it has been shown in both models of CYP and WAS that IC/BPS increases nociceptive responses and causes changes in bladder histology and function. It was concluded that these changes in bladder contractile responses and nociception result from the purinergic pathway activated via P2X3, and this pathway may regulate the expression of other proteins that have a role in the sensitization of afferent pathways. In addition, these effects were reversible with AF219. AF219 may potentially be useful in treating IC/BPS patients with both phenotypes.

Keywords: Bladder pain syndrome, Interstitial Cystitis, P2X3, AF219, Purinergic pathway

9. KAYNAKÇA

1. Kim SH, Kim TB, Kim SW, Oh SJ. Urodynamic findings of the painful bladder syndrome/interstitial cystitis: a comparison with idiopathic overactive bladder. *J. Urol.* 2009;181:2550-2554.
2. Yoshimura N, Oguchi T, Yokoyama H ve ark. Bladder afferent hyperexcitability in bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Int. J. Urol.* 2014;21:18-25.
3. de Groat WC, Yoshimura N. Anatomy and physiology of the lower urinary tract. *Handb. Clin. Neurol.* 2015;130:61-108.
4. Goldstein HB, Safaeian P, Garrod K, Finamore PS, Kellogg-Spadt S, Whitmore KE. Depression, abuse and its relationship to interstitial cystitis. *Int. Urogynecol. J.* 2008;19:1683-1686.
5. Leue C, Kruiemel J, Vrijens D, Masclee A, Van Os J, Van Koeveringe G. Functional urological disorders: a sensitized defence response in the bladder–gut–brain axis. *Nat. Rev. Urol.* 2017;14:153-163.
6. McKernan LC, Walsh CG, Reynolds WS, Crofford LJ, Dmochowski RR, Williams DA. Psychosocial co-morbidities in interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS): a systematic review. *Neurourol. Urodyn.* 2018;37:926-941.
7. Brierley SM, Linden DR. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014;11:611-627.
8. Grundy L, Erickson A, Brierley SM. Visceral pain. *Annu. Rev. Physiol.* 2019;81:261-284.
9. Birder L, Andersson KE. Animal modelling of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Int. Neurourol. J.* 2018;22:S3.
10. Andersson KE. Purinergic signalling in the urinary bladder. *Auton. Neurosci.* 2015;191:78-81.
11. Burnstock G. Purine and purinergic receptors. *Brain and neuroscience advances.* 2018;2:2398212818817494.
12. Durnin L, Kwok B, Kukadia P ve ark. An ex vivo bladder model with detrusor smooth muscle removed to analyse biologically active mediators released from the suburothelium. *J. Physiol.* 2019;597:1467-1485.
13. Coutts AA, Jorizzo JL, Eady RA, Greaves MW, Burnstock G. Adenosine triphosphate-evoked vascular changes in human skin: mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 1981;76:391-401.
14. Lewis C, Neidhart S, Holy C, North R, Buell G, Surprenant A. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature.* 1995;377:432-435.
15. Chen C-C, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature.* 1995;377:428-431.
16. Chopra B, Barrick SR, Meyers S ve ark. Expression and function of bradykinin B1 and B2 receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. *J. Physiol.* 2005;562:859-871.
17. Smith CP, Vemulakonda VM, Kiss S, Boone TB, Somogyi GT. Enhanced ATP release from rat bladder urothelium during chronic bladder inflammation: effect of botulinum toxin A. *Neurochem. Int.* 2005;47:291-297.

18. Sun Y, Chai TC. Up-regulation of P2X3 receptor during stretch of bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. *J. Urol.* 2004;171:448-452.
19. Jhang J-F, Hsu Y-H, Kuo H-C. Urothelial functional protein and sensory receptors in patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome with and without Hunner's lesion. *Urology.* 2016;98:44-49.
20. Winder M, Tobin G, Zupančič D, Romih R. Signalling molecules in the urothelium. *Biomed Res. Int.* 2014;2014:
21. Michel MC. Therapeutic modulation of urinary bladder function: multiple targets at multiple levels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015;55:269-287.
22. Honore P, Kage K, Mikusa J ve ark. Analgesic profile of intrathecal P2X3 antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. *Pain.* 2002;99:11-19.
23. Jarvis MF. Contributions of P2X3 homomeric and heteromeric channels to acute and chronic pain. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2003;7:513-522.
24. Dorn G, Patel S, Wotherspoon G ve ark. siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic acids research.* 2004;32:e49-e49.
25. Cook S, McCleskey E. Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain.* 2002;95:41-47.
26. Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu Q-M ve ark. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature.* 2000;407:1011-1015.
27. Xu G-Y, Huang L-YM. Peripheral inflammation sensitizes P2X receptor-mediated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 2002;22:93-102.
28. Souslova V, Cesare P, Ding Y ve ark. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors. *Nature.* 2000;407:1015-1017.
29. Fabbretti E. ATP P2X3 receptors and neuronal sensitization. *Front. Cell. Neurosci.* 2013;7:236.
30. Fabbretti E, D'Arco M, Fabbro A, Simonetti M, Nistri A, Giniatullin R. Delayed upregulation of ATP P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons by calcitonin gene-related peptide. *J. Neurosci.* 2006;26:6163-6171.
31. Jarvis MF, Burgard EC, McGaraughty S ve ark. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002;99:17179-17184.
32. Marucci G, Dal Ben D, Buccioni M ve ark. Update on novel purinergic P2X3 and P2X2/3 receptor antagonists and their potential therapeutic applications. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 2019;29:943-963.
33. Moldwin R, Kitt M, Mangel J ve ark. A phase 2 study in women with interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS) of the novel P2X3 antagonist AF-219. in *Neurourol. Urodyn.*, Vol. 34 S50-S50 (Wiley-Blackwell 111 River St, Hoboken 07030-5774, NJ, USA, 2015).
34. Richards D, Gever JR, Ford AP, Fountain SJ. Action of MK-7264 (gefapixant) at human P2X3 and P2X2/3 receptors and in vivo efficacy in models of sensitisation. *Br. J. Pharmacol.* 2019;176:2279-2291.
35. Moldwin R, Hanno P. Interstitial cystitis/bladder pain syndrome and related disorders. *Campbell-Walsh-Wein Urology.* 12th ed. Philadelphia, PA: Elsevier. 2021;
36. Birdler LA. Pathophysiology of interstitial cystitis. *Int. J. Urol.* 2019;26:12-15.

37. Malde S, Palmisani S, Al-Kaisy A, Sahai A. Guideline of guidelines: bladder pain syndrome. *BJU Int.* 2018;122:729-743.
38. Hanno PM, Erickson D, Moldwin R, Faraday MM. Diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome: AUA guideline amendment. *J. Urol.* 2015;193:1545-1553.
39. Konkle KS, Berry SH, Elliott MN ve ark. Comparison of an interstitial cystitis/bladder pain syndrome clinical cohort with symptomatic community women from the RAND Interstitial Cystitis Epidemiology study. *J. Urol.* 2012;187:508-512.
40. Fall M, Baranowski AP, Elneil S ve ark. EAU guidelines on chronic pelvic pain. *Eur. Urol.* 2010;57:35-48.
41. Metts JF. Interstitial cystitis: urgency and frequency syndrome. *Am. Fam. Physician.* 2001;64:1199.
42. Kim A, Han JY, Ryu CM ve ark. Histopathological characteristics of interstitial cystitis/bladder pain syndrome without Hunner lesion. *Histopathology.* 2017;71:415-424.
43. Lubeck DP, Whitmore K, Sant GR, Alvarez-Horine S, Lai C. Psychometric validation of the O'Leary-Sant interstitial cystitis symptom index in a clinical trial of pentosan polysulfate sodium. *Urology.* 2001;57:62-66.
44. Evans RJ, Sant GR. Current diagnosis of interstitial cystitis: an evolving paradigm. *Urology.* 2007;69:S64-S72.
45. Keay SK, Zhang C-O, Shoenfelt J ve ark. Sensitivity and specificity of antiproliferative factor, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, and epidermal growth factor as urine markers for interstitial cystitis. *Urology.* 2001;57:9-14.
46. Payne CK, Joyce GF, Wise M, Clemens JQ, Project UDiA. Interstitial cystitis and painful bladder syndrome. *J. Urol.* 2007;177:2042-2049.
47. Sant GR, Hanno PM. Interstitial cystitis: current issues and controversies in diagnosis. *Urology.* 2001;57:82-88.
48. Keay S, Takeda M, Tamaki M, Hanno P. Current and future directions in diagnostic markers in interstitial cystitis. *Int. J. Urol.* 2003;10:S27-S30.
49. Parsons CL, Stein PC, Bidair M, Lebow D. Abnormal sensitivity to intravesical potassium in interstitial cystitis and radiation cystitis. *Neurourol. Urodyn.* 1994;13:515-520.
50. Sairanen J, Tammela TL, Leppilahti M, Onali M, Forsell T, Ruutu M. Potassium sensitivity test (PST) as a measurement of treatment efficacy of painful bladder syndrome/interstitial cystitis: a prospective study with cyclosporine A and pentosan polysulfate sodium. *Neurourol. Urodyn.: Official Journal of the International Continence Society.* 2007;26:267-270.
51. Denson MA, Griebeling TL, Cohen MB, Kreder KJ. Comparison of cystoscopic and histological findings in patients with suspected interstitial cystitis. *J. Urol.* 2000;164:1908-1911.
52. Nordling J, Anjum F, Bade J ve ark. Primary evaluation of patients suspected of having interstitial cystitis (IC). *Eur. Urol.* 2004;45:662-669.
53. Nickel JC, Shoskes D, Irvine-Bird K. Clinical phenotyping of women with interstitial cystitis/painful bladder syndrome: a key to classification and potentially improved management. *J. Urol.* 2009;182:155-160.
54. Cox A, Golda N, Nadeau G ve ark. CUA guideline: Diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Can. Urol. Assoc. J.* 2016;10:E136.
55. Sant GR. Etiology, pathogenesis, and diagnosis of interstitial cystitis. *Reviews in urology.* 2002;4:S9.

56. Peeker R, Fall M. Toward a precise definition of interstitial cystitis: further evidence of differences in classic and nonulcer disease. *J. Urol.* 2002;167:2470-2472.
57. Van de Merwe JP, Nordling J, Bouchelouche P ve ark. Diagnostic criteria, classification, and nomenclature for painful bladder syndrome/interstitial cystitis: an ESSIC proposal. *Eur. Urol.* 2008;53:60-67.
58. Ozkurkcugil C, Teke K, (ed. Dogan HS)) Mesane Ağrı Sendromu (İnterstisyel Sistit),(1. Basım). İstanbul: Galenos Yayınevi.2020:161-179.
59. Chaiken DC, Blaivas JG, Blaivas ST. Behavioral therapy for the treatment of refractory interstitial cystitis. *J. Urol.* 1993;149:1445-1448.
60. Doggweiler-Wiygul R, Wiygul PJ. Interstitial cystitis, pelvic pain, and the relationship to myofascial pain and dysfunction: a report on four patients. *World J. Urol.* 2002;20:310-314.
61. van Ophoven A, Heinecke A, Hertle L. Safety and efficacy of concurrent application of oral pentosan polysulfate and subcutaneous low-dose heparin for patients with interstitial cystitis. *Urology.* 2005;66:707-711.
62. McGwin G, MacLennan P, Owsley C. Association between pentosan polysulfate sodium and retinal disorders. *JAMA ophthalmology.* 2022;140:37-42.
63. Doiron RC, Bona M, Nickel JC. Possible drug-induced, vision-threatening maculopathy secondary to chronic pentosan polysulfate sodium (Elmiron®) exposure. *Can. Urol. Assoc. J.* 2020;14:10.
64. Theoharides TC. Hydroxyzine in the treatment of interstitial cystitis. *Urol. Clin. North Am.* 1994;21:113-119.
65. Thilagarajah R, Witherow RON, Walker M. Oral cimetidine gives effective symptom relief in painful bladder disease: a prospective, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *BJU Int.* 2001;87:207-212.
66. Sairanen J, Tammela TL, Leppilahti M ve ark. Cyclosporine A and pentosan polysulfate sodium for the treatment of interstitial cystitis: a randomized comparative study. *J. Urol.* 2005;174:2235-2238.
67. Engeler D, Baranowski A, Berghmans B, Borovicka J, Cottrell A, Dinis-Oliveira P. at al. EAU guidelines on chronic pelvic pain. Edn. in EAU Annual Congress Amsterdam (2020).
68. Adams K, Denman MA. Bladder pain syndrome: a review. *Female Pelvic Med. Reconstr. Surg.* 2011;17:279-289.
69. Cervigni M, Natale F, Nasta L, Mako A. Intravesical hyaluronic acid and chondroitin sulphate for bladder pain syndrome/interstitial cystitis: long-term treatment results. *Int. Urogynecol. J.* 2012;23:1187-1192.
70. Madersbacher H, van Ophoven A, van Kerrebroeck PE. GAG layer replenishment therapy for chronic forms of cystitis with intravesical glycosaminoglycans—a review. *Neurourol. Urodyn.* 2013;32:9-18.
71. Peters KM, Diokno AC, Steinert BW, Gonzalez JA. The efficacy of intravesical bacillus Calmette-Guerin in the treatment of interstitial cystitis: long-term followup. *J. Urol.* 1998;159:1483-1487.
72. Pinto R, Lopes T, Frias B ve ark. Trigonal injection of botulinum toxin A in patients with refractory bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Eur. Urol.* 2010;58:360-365.
73. Pape J, Falconi G, De Mattos Lourenco TR, Doumouchsis SK, Betschart C. Variations in bladder pain syndrome/interstitial cystitis (IC) definitions, pathogenesis, diagnostics and

- treatment: a systematic review and evaluation of national and international guidelines. *Int. Urogynecol. J.* 2019;30:1795-1805.
74. Maher CF, Carey MP, Dwyer PL, Schluter PL. Percutaneous sacral nerve root neuromodulation for intractable interstitial cystitis. *J. Urol.* 2001;165:884-886.
 75. Gajewski JB, Al-Zahrani AA. The long-term efficacy of sacral neuromodulation in the management of intractable cases of bladder pain syndrome: 14 years of experience in one centre. *BJU Int.* 2011;107:1258-1264.
 76. Zagorodnyuk VP, Costa M, Brookes SJ. Major classes of sensory neurons to the urinary bladder. *Auton. Neurosci.* 2006;126:390-397.
 77. Costa M, Brookes SJ, Gibbins IL, Zagorodnyuk VP, Gregory SJ. Properties of the major classes of mechanoreceptors in the guinea pig bladder. 2007;
 78. Zagorodnyuk VP, Brookes SJ, Spencer NJ, Gregory S. Mechanotransduction and chemosensitivity of two major classes of bladder afferents with endings in the vicinity to the urothelium. *J. Physiol.* 2009;587:3523-3538.
 79. Erickson A, Deiteren A, Harrington AM ve ark. Voltage-gated sodium channels:(NaV) igating the field to determine their contribution to visceral nociception. *J. Physiol.* 2018;596:785-807.
 80. Fowler CJ, Griffiths D, De Groat WC. The neural control of micturition. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008;9:453-466.
 81. Griffiths D. Neural control of micturition in humans: a working model. *Nat. Rev. Urol.* 2015;12:695-705.
 82. Lovick TA. Central control of visceral pain and urinary tract function. *Auton. Neurosci.* 2016;200:35-42.
 83. Spencer NJ, Greenheigh S, Kyloh M ve ark. Identifying unique subtypes of spinal afferent nerve endings within the urinary bladder of mice. *J. Comp. Neurol.* 2018;526:707-720.
 84. Birder L, Andersson K-E. Urothelial signaling. *Physiol. Rev.* 2013;93:653-680.
 85. Hurst RE, Greenwood-Van Meerveld B, Wisniewski AB ve ark. Increased bladder permeability in interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Transl. Androl. Urol.* 2015;4:563.
 86. Liu H-T, Shie J-H, Chen S-H, Wang Y-S, Kuo H-C. Differences in mast cell infiltration, E-cadherin, and zonula occludens-1 expression between patients with overactive bladder and interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Urology.* 2012;80:225. e213-225. e218.
 87. Lai MC, Kuo YC, Kuo HC. Intravesical hyaluronic acid for interstitial cystitis/painful bladder syndrome: a comparative randomized assessment of different regimens. *Int. J. Urol.* 2013;20:203-207.
 88. Keay SK, Birder LA, Chai TC. Evidence for bladder urothelial pathophysiology in functional bladder disorders. *Biomed Res. Int.* 2014;2014:
 89. Parsons CL, Greenberger M, Gabal L, Bidair M, Barne G. The role of urinary potassium in the pathogenesis and diagnosis of interstitial cystitis. *J. Urol.* 1998;159:1862-1867.
 90. MacDiarmid SA, Sand PK. Diagnosis of interstitial cystitis/painful bladder syndrome in patients with overactive bladder symptoms. *Reviews in urology.* 2007;9:9.
 91. Chung MK, Butrick CW, Chung CW. The overlap of interstitial cystitis/painful bladder syndrome and overactive bladder. *JSLs.* 2010;14:83.
 92. Nickel JC, Hanno P, Kumar K, Thomas H. Second multicenter, randomized, double-blind, parallel-group evaluation of effectiveness and safety of intravesical sodium chondroitin

- sulfate compared with inactive vehicle control in subjects with interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Urology*. 2012;79:1220-1225.
93. Oliveira P, Tarricone R, Guzman S. Glycosaminoglycan-replenishment therapy: rationale for use and current evidence. *EMJ Urol*. 2014;1:41-47.
 94. Chiang G, Patra P, Letourneau R ve ark. Pentosanpolysulfate inhibits mast cell histamine secretion and intracellular calcium ion levels: an alternative explanation of its beneficial effect in interstitial cystitis. *J. Urol*. 2000;164:2119-2125.
 95. Anderson VR, Perry CM. Pentosan polysulfate. *Drugs*. 2006;66:821-835.
 96. Sanden C, Mori M, Jogdand P ve ark. Broad Th2 neutralization and anti-inflammatory action of pentosan polysulfate sodium in experimental allergic rhinitis. *Immunity, Inflammation and Disease*. 2017;5:300-309.
 97. Lavelle J, Meyers S, Ramage R, Bastacky S, Doty D, Apodaca G, Zeidel ML. Bladder permeability barrier: recovery from selective injury of surface epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283:F242-F253.
 98. Shin K, Lee J, Guo N ve ark. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature*. 2011;472:110-114.
 99. Grundy L, Caldwell A, Brierley SM. Mechanisms underlying overactive bladder and interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Front. Neurosci*. 2018;12:931.
 100. Everaerts W, Vriens J, Owsianik G ve ark. Functional characterization of transient receptor potential channels in mouse urothelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2010;298:F692-F701.
 101. Everaerts W, Zhen X, Ghosh D ve ark. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107:19084-19089.
 102. Merrill L, Gonzalez EJ, Girard BM, Vizzard MA. Receptors, channels, and signalling in the urothelial sensory system in the bladder. *Nat. Rev. Urol.*. 2016;13:193-204.
 103. Grundy L, Chess-Williams R, Brierley SM ve ark. NKA enhances bladder-afferent mechanosensitivity via urothelial and detrusor activation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2018;315:F1174-F1185.
 104. Sun Y, Chai TC. Augmented extracellular ATP signaling in bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2006;290:C27-C34.
 105. Kim J, Park EY, Seo SI, Park YH, Hwang TK. Nerve growth factor and prostaglandins in the urine of female patients with overactive bladder. *J Urol*. 2006;175:1773-1776.
 106. Dalghi MG, Montalbetti N, Carattino MD, Apodaca G. The urothelium: life in a liquid environment. *Physiol. Rev*. 2020;100:1621-1705.
 107. Giglio D, Ryberg A, To K, Delbro D, Tobin G. Altered muscarinic receptor subtype expression and functional responses in cyclophosphamide induced cystitis in rats. *Auton. Neurosci*. 2005;122:9-20.
 108. Giglio D, Tobin G. Muscarinic receptor subtypes in the lower urinary tract. *Pharmacology*. 2009;83:259-269.
 109. Andersson K-E. Muscarinic acetylcholine receptors in the urinary tract. *Urinary Tract*. 2011;319-344.
 110. McDermott C, Chess-Williams R, Mills K ve ark. Alterations in acetylcholine, PGE2 and IL6 release from urothelial cells following treatment with pyocyanin and lipopolysaccharide. *Toxicol. In Vitro*. 2013;27:1693-1698.

111. Ochodnický P, Michel MB, Butter JJ, Seth J, Panicker JN, Michel MC. Bradykinin modulates spontaneous nerve growth factor production and stretch-induced ATP release in human urothelium. *Pharmacol. Res.* 2013;70:147-154.
112. Arms L, Vizzard MA. Neuropeptides in lower urinary tract function. *Urinary Tract.* 2011;395-423.
113. Leiby BE, Landis JR, Propert KJ, Tomaszewski JE, Group ICDBS. Discovery of morphological subgroups that correlate with severity of symptoms in interstitial cystitis: a proposed biopsy classification system. *J. Urol.* 2007;177:142-148.
114. Hauser PJ, Dozmorov MG, Bane BL, Slobodov G, Culkin DJ, Hurst RE. Abnormal expression of differentiation related proteins and proteoglycan core proteins in the urothelium of patients with interstitial cystitis. *J. Urol.* 2008;179:764-769.
115. Jacobs BL, Smaldone MC, Tyagi V ve ark. Increased nerve growth factor in neurogenic overactive bladder and interstitial cystitis patients. *Can. J. Urol.* 2010;17:4989-4994.
116. Jhang J-F, Kuo H-C. Pathomechanism of interstitial cystitis/bladder pain syndrome and mapping the heterogeneity of disease. *Int. Neurourol. J.* 2016;20:S95.
117. Furuta A, Yamamoto T, Suzuki Y, Gotoh M, Egawa S, Yoshimura N. Comparison of inflammatory urine markers in patients with interstitial cystitis and overactive bladder. *Int. Urogynecol. J.* 2018;29:961-966.
118. Davidson S, Copits BA, Zhang J, Page G, Ghatti A, Gereau IV RW. Human sensory neurons: Membrane properties and sensitization by inflammatory mediators. *PAIN®.* 2014;155:1861-1870.
119. Abernethy MG, Rosenfeld A, White JR, Mueller MG, Lewicky-Gaupp C, Kenton K. Urinary microbiome and cytokine levels in women with interstitial cystitis. *Obstetrics & Gynecology.* 2017;129:500-506.
120. Takezawa K, Kondo M, Kiuchi H ve ark. Combination of bladder ultrasonography and novel cystometry method in mice reveals rapid decrease in bladder capacity and compliance in LPS-induced cystitis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2014;307:F234-F241.
121. Liu Q, Dong X. The role of the Mrgpr receptor family in itch. *Pharmacology of itch.* 2015;71-88.
122. Hughes Jr FM, Kennis JG, Youssef MN, Lowe DW, Shaner BE, Purves JT. The NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome mediates inflammation and voiding dysfunction in a lipopolysaccharide-induced rat model of cystitis. *J. Clin. Cell. Immunol.* 2016;7:
123. Abdi SAH, Najmi AK, Raisuddin S. Cyclophosphamide-induced Down-Regulation of Uroplakin II in the Mouse Urinary Bladder Epithelium is Prevented by S-Allyl Cysteine. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2016;119:598-603.
124. Fry C, Daneshgari F, Thor K ve ark. Animal models and their use in understanding lower urinary tract dysfunction. *Neurourol. Urodyn.: Official Journal of the International Continence Society.* 2010;29:603-608.
125. Lai HH, Qiu C-S, Crock LW, Morales MEP, Ness TJ, Gereau IV RW. Activation of spinal extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 is associated with the development of visceral hyperalgesia of the bladder. *Pain.* 2011;152:2117-2124.
126. DeBerry JJ, Schwartz ES, Davis BM. TRPA1 mediates bladder hyperalgesia in a mouse model of cystitis. *PAIN®.* 2014;155:1280-1287.

127. DeBerry JJ, Robbins MT, Ness TJ. The amygdala central nucleus is required for acute stress-induced bladder hyperalgesia in a rat visceral pain model. *Brain Res.* 2015;1606:77-85.
128. Groat WC, Yoshimura N. Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease. *Sensory nerves.* 2009;91-138.
129. Dang K, Lamb K, Cohen M, Bielefeldt K, Gebhart GF. Cyclophosphamide-induced bladder inflammation sensitizes and enhances P2X receptor function in rat bladder sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 2008;99:49-59.
130. Buffington CT. Idiopathic cystitis in domestic cats—beyond the lower urinary tract. *J. Vet. Intern. Med.* 2011;25:784-796.
131. Manríquez V, Castro Caperan D, Guzmán R, Naser M, Iglesia V, Lagos N. First evidence of neosaxitoxin as a long-acting pain blocker in bladder pain syndrome. *Int. Urogynecol. J.* 2015;26:853-858.
132. Cvach K, Rosamilia A. Review of intravesical therapies for bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Transl. Androl. Urol.* 2015;4:629.
133. Liu HT, Kuo HC. Increased expression of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 in the bladder predicts the response to intravesical instillations of resiniferatoxin in patients with refractory idiopathic detrusor overactivity. *BJU Int.* 2007;100:1086-1090.
134. Daly D, Rong W, Chess-Williams R, Chapple C, Grundy D. Bladder afferent sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice. *J. Physiol.* 2007;583:663-674.
135. Wang Z-Y, Wang P, Merriam FV, Bjorling DE. Lack of TRPV1 inhibits cystitis-induced increased mechanical sensitivity in mice. *Pain.* 2008;139:158-167.
136. Yoshiyama M, Mochizuki T, Nakagomi H ve ark. Functional roles of TRPV1 and TRPV4 in control of lower urinary tract activity: dual analysis of behavior and reflex during the micturition cycle. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2015;308:F1128-F1134.
137. DeBerry JJ, Saloman JL, Dragoo BK, Albers KM, Davis BM. Artemin immunotherapy is effective in preventing and reversing cystitis-induced bladder hyperalgesia via TRPA1 regulation. *J. Pain.* 2015;16:628-636.
138. Grundy L, Daly DM, Chapple C, Grundy D, Chess-Williams R. TRPV1 enhances the afferent response to P2X receptor activation in the mouse urinary bladder. *Sci. Rep.* 2018;8:1-10.
139. Grundy L, Erickson A, Caldwell A ve ark. Tetrodotoxin-sensitive voltage-gated sodium channels regulate bladder afferent responses to distension. *Pain.* 2018;159:2573-2584.
140. Hayashi Y, Takimoto K, Chancellor MB ve ark. Bladder hyperactivity and increased excitability of bladder afferent neurons associated with reduced expression of Kv1. 4 α -subunit in rats with cystitis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009;296:R1661-R1670.
141. Chen X, Gebhart G. Advance online publication. Differential purinergic signaling in bladder sensory neurons of naive and bladder inflamed mice. *Pain.* 2010;
142. Merrill L, Girard BM, May V, Vizzard MA. Transcriptional and translational plasticity in rodent urinary bladder TRP channels with urinary bladder inflammation, bladder dysfunction, or postnatal maturation. *J. Mol. Neurosci.* 2012;48:744-756.
143. Hedlund P, Gratzke C. The endocannabinoid system—a target for the treatment of LUTS? *Nat. Rev. Urol.* 2016;13:463-470.
144. Hedlund P. Cannabinoids and the endocannabinoid system in lower urinary tract function and dysfunction. *Neurourol. Urodyn.* 2014;33:46-53.

145. Peters KM, Killinger KA, Ibrahim IA. Childhood symptoms and events in women with interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Urology*. 2009;73:258-262.
146. Randich A, Uzzell T, DeBerry JJ, Ness TJ. Neonatal urinary bladder inflammation produces adult bladder hypersensitivity. *J. Pain*. 2006;7:469-479.
147. DeBerry J, Ness TJ, Robbins MTRandich A. Inflammation-induced enhancement of the visceromotor reflex to urinary bladder distention: modulation by endogenous opioids and the effects of early-in-life experience with bladder inflammation. *J. Pain*. 2007;8:914-923.
148. Ness T, Randich A. Neonatal bladder inflammation alters activity of adult rat spinal visceral nociceptive neurons. *Neurosci. Lett*. 2010;472:210-214.
149. Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J. Pain*. 2013;14:1255-1269.
150. DeBerry J, Randich A, Shaffer AD, Robbins MT, Ness TJ. Neonatal bladder inflammation produces functional changes and alters neuropeptide content in bladders of adult female rats. *J. Pain*. 2010;11:247-255.
151. Vizzard MA. Alterations in neuropeptide expression in lumbosacral bladder pathways following chronic cystitis. *J. Chem. Neuroanat*. 2001;21:125-138.
152. Qiao LY, Vizzard MA. Cystitis-induced upregulation of tyrosine kinase (TrkA, TrkB) receptor expression and phosphorylation in rat micturition pathways. *J. Comp. Neurol*. 2002;454:200-211.
153. Fantozzi R, Rosa AC. Histamine and neurogenic inflammation. *Br. J. Pharmacol*. 2013;170:38-45.
154. Chen W, Ye D-Y, Han D-J ve ark. Elevated level of nerve growth factor in the bladder pain syndrome/interstitial cystitis: a meta-analysis. *Springerplus*. 2016;5:1-6.
155. Schnegelsberg B, Sun T-T, Cain G ve ark. Overexpression of NGF in mouse urothelium leads to neuronal hyperinnervation, pelvic sensitivity, and changes in urinary bladder function. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2010;298:R534-R547.
156. Boudes M, Uvin P, Pinto S ve ark. Crucial role of TRPC1 and TRPC4 in cystitis-induced neuronal sprouting and bladder overactivity. *PLoS One*. 2013;8:e69550.
157. Ekman M, Zhu B, Swärd K, Uvelius B. Neurite outgrowth in cultured mouse pelvic ganglia-Effects of neurotrophins and bladder tissue. *Auton. Neurosci*. 2017;205:41-49.
158. Christmas T, Rode J, Chapple C, Milroy E, Turner-Warwick R. Nerve fibre proliferation in interstitial cystitis. *Virchows Archiv A*. 1990;416:447-451.
159. Lundeberg T, Liedberg H, Nordling L, Theodorsson E, Owzarski A, Ekman P. Interstitial cystitis: correlation with nerve fibres, mast cells and histamine. *Br. J. Urol*. 1993;71:427-429.
160. Drake MJ, Morris N, Apostolidis A, Rahnema'i MS, Marchesi JR. The urinary microbiome and its contribution to lower urinary tract symptoms; ICI-RS 2015. *Neurourol. Urodyn*. 2017;36:850-853.
161. Yoshikawa S, Kawamorita N, Oguchi T ve ark. Pelvic organ cross-sensitization to enhance bladder and urethral pain behaviors in rats with experimental colitis. *Neuroscience*. 2015;284:422-429.
162. Persson R, Wensaas K-A, Hanevik K, Eide GE, Langeland N, Rortveit G. The relationship between irritable bowel syndrome, functional dyspepsia, chronic fatigue and overactive bladder syndrome: a controlled study 6 years after acute gastrointestinal infection. *BMC Gastroenterol*. 2015;15:1-7.

163. Grundy L, Harrington AM, Castro J ve ark. Chronic linaclotide treatment reduces colitis-induced neuroplasticity and reverses persistent bladder dysfunction. *JCI insight*. 2018;3:
164. Qiao L, Grider JR. Up-regulation of calcitonin gene-related peptide and receptor tyrosine kinase TrkB in rat bladder afferent neurons following TNBS colitis. *Exp Neurol*. 2007;204:667-679.
165. Liang R, Ustinova EE, Patnam R, Fraser MO, Gutkin DW, Pezzone MA. Enhanced expression of mast cell growth factor and mast cell activation in the bladder following the resolution of trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) colitis in female rats. *Neurourol. Urodyn.: Official Journal of the International Continence Society*. 2007;26:887-893.
166. Pan X-Q, Gonzalez JA, Chang S, Chacko S, Wein AJ, Malykhina AP. Experimental colitis triggers the release of substance P and calcitonin gene-related peptide in the urinary bladder via TRPV1 signaling pathways. *Exp. Neurol*. 2010;225:262-273.
167. Kawamori N, Yoshikawa S, Kashyap M ve ark. Liposome based intravesical therapy targeting nerve growth factor ameliorates bladder hypersensitivity in rats with experimental colitis. *J. Urol*. 2016;195:1920-1926.
168. Xia C, Shen S, Hashmi F, Qiao L-Y. Colitis-induced bladder afferent neuronal activation is regulated by BDNF through PLC γ pathway. *Exp. Neurol*. 2016;285:126-135.
169. Sorkin LS, Eddinger KA, Woller SA, Yaksh TL. Origins of antidromic activity in sensory afferent fibers and neurogenic inflammation. in *Seminars in immunopathology*, Vol. 40 237-247 (Springer, 2018).
170. Lai H, Gardner V, Vetter J, Andriole GL. Correlation between psychological stress levels and the severity of overactive bladder symptoms. *BMC Urol*. 2015;15:1-7.
171. Pierce AN, Christianson JA. Stress and chronic pelvic pain. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*. 2015;131:509-535.
172. Fuentes IM, Christianson JA. The influence of early life experience on visceral pain. *Front. Syst. Neurosci*. 2018;12:2.
173. Farmer MA, Huang L, Martucci K ve ark. Brain white matter abnormalities in female interstitial cystitis/bladder pain syndrome: a MAPP network neuroimaging study. *J. Urol*. 2015;194:118-126.
174. Wang Z, Chang HH, Gao Y ve ark. Effects of water avoidance stress on peripheral and central responses during bladder filling in the rat: a multidisciplinary approach to the study of urologic chronic pelvic pain syndrome (MAPP) research network study. *PloS one*. 2017;12:e0182976.
175. Pierce AN, Di Silvestro ER, Eller OC, Wang R, Ryals JM, Christianson JA. Urinary bladder hypersensitivity and dysfunction in female mice following early life and adult stress. *Brain Res*. 2016;1639:58-73.
176. Gao Y, Rodríguez LV. The Effect of Chronic Psychological Stress on Lower Urinary Tract Function: An Animal Model Perspective. *Front. Physiol.*. 2022;431.
177. Song PH, Chun SY, Chung J-W ve ark. Comparison of 5 different rat models to establish a standard animal model for research into interstitial cystitis. *Int. Neurourol. J.*. 2017;21:163.
178. Kato K, Kitada S, Longhurst PA, Wein AJ, Levin RM. Time-course of alterations of bladder function following acetone-induced cystitis. *J. Urol*. 1990;144:1272-1276.
179. Bjorling DE, Elkahwaji JE, Bushman W ve ark. Acute acrolein-induced cystitis in mice. *BJU Int*. 2007;99:1523-1529.

180. Abelli L, Conte B, Somma V, Maggi CA, Giuliani S, Meli A. A method for studying pain arising from the urinary bladder in conscious, freely-moving rats. *J. Urol.* 1989;141:148-151.
181. McMahon SB, Abel C. A model for the study of visceral pain states: chronic inflammation of the chronic decerebrate rat urinary bladder by irritant chemicals. *Pain.* 1987;28:109-127.
182. Stein PC, Pham H, Ito T, Parsons C. Bladder injury model induced in rats by exposure to protamine sulfate followed by bacterial endotoxin. *J. Urol.* 1996;155:1133-1138.
183. Tambaro S, Casu MA, Mastinu A, Lazzari P. Evaluation of selective cannabinoid CB1 and CB2 receptor agonists in a mouse model of lipopolysaccharide-induced interstitial cystitis. *Eur. J. Pharmacol.* 2014;729:67-74.
184. Bjorling DE, Wang ZY, Bushman W. Models of inflammation of the lower urinary tract. *Neurourol. Urodyn.* 2011;30:673-682.
185. Montalbetti N, Rued AC, Clayton DR ve ark. Increased urothelial paracellular transport promotes cystitis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2015;309:F1070-F1081.
186. Keay S, Leitzell S, Ochrcin A, Clements G, Zhan M, Johnson D. A mouse model for interstitial cystitis/painful bladder syndrome based on APF inhibition of bladder epithelial repair: a pilot study. *BMC Urol.* 2012;12:1-9.
187. Juszczak K, Gil K, Wyczolkowski M, Thor P. Functional, histological structure and mastocytes alterations in rat urinary bladders following acute and chronic cyclophosphamide treatment. *J. Physiol. Pharmacol.* 2010;61:477.
188. Boudes M, Uvin P, Kerselaers S, Vennekens R, Voets T, De Ridder D. Functional characterization of a chronic cyclophosphamide-induced overactive bladder model in mice. *Neurourol. Urodyn.* 2011;30:1659-1665.
189. Golubeva AV, Zhdanov AV, Mallel G, Dinan TG, Cryan JF. The mouse cyclophosphamide model of bladder pain syndrome: tissue characterization, immune profiling, and relationship to metabotropic glutamate receptors. *Physiological reports.* 2014;2:e00260.
190. Johansen C, Verheul A, Gram L, Gill T, Abee T. Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63:1155-1159.
191. Lin YH, Liu G, Kavran M ve ark. Lower urinary tract phenotype of experimental autoimmune cystitis in mouse: a potential animal model for interstitial cystitis. *BJU Int.* 2008;102:1724-1730.
192. Marson L, Giamberardino MA, Costantini R, Czakanski P, Wesselmann U. Animal models for the study of female sexual dysfunction. *Sexual medicine reviews.* 2013;1:108-122.
193. Fariello JY, Moldwin RM. Similarities between interstitial cystitis/bladder pain syndrome and vulvodynia: implications for patient management. *Transl. Androl. Urol.* 2015;4:643.
194. Wang X, Liu W, O'Donnell M ve ark. Evidence for the role of mast cells in cystitis-associated lower urinary tract dysfunction: a multidisciplinary approach to the study of chronic pelvic pain research network animal model study. *PLoS One.* 2016;11:e0168772.
195. Hunter H, Momen SE, Kleyn CE. The impact of psychosocial stress on healthy skin. *Clin. Exp. Dermatol.* 2015;40:540-546.
196. Powell N, Walker MM, Talley NJ. The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut–brain communications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;14:143-159.

197. Smith AL, Leung J, Kun S ve ark. The effects of acute and chronic psychological stress on bladder function in a rodent model. *Urology*. 2011;78:967. e961-967. e967.
198. Lee UJ, Ackerman AL, Wu A ve ark. Chronic psychological stress in high-anxiety rats induces sustained bladder hyperalgesia. *Physiol. Behav.* 2015;139:541-548.
199. Matos R, Serrão P, Rodriguez L, Birder LA, Cruz F, Charrua A. The water avoidance stress induces bladder pain due to a prolonged alpha1A adrenoceptor stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2017;390:839-844.
200. Charrua A, Pinto R, Taylor A ve ark. Can the adrenergic system be implicated in the pathophysiology of bladder pain syndrome/interstitial cystitis? A clinical and experimental study. *Neurourol. Urodyn.* 2015;34:489-496.
201. Lai H, Gereau IV RW, Luo Y ve ark. Animal models of urologic chronic pelvic pain syndromes: findings from the multidisciplinary approach to the study of chronic pelvic pain research network. *Urology*. 2015;85:1454-1465.
202. Clemens JQ, Mullins C, Kusek JW ve ark. The MAPP research network: a novel study of urologic chronic pelvic pain syndromes. *BMC Urol.* 2014;14:1-6.
203. Bayliss M, Wu C, Newgreen D, Mundy A, Fry C. A quantitative study of atropine-resistant contractile responses in human detrusor smooth muscle, from stable, unstable and obstructed bladders. *J. Urol.* 1999;162:1833-1839.
204. Vlaskovska M, Kasakov L, Rong W ve ark. P2X3 knock-out mice reveal a major sensory role for urothelially released ATP. *J. Neurosci.* 2001;21:5670-5677.
205. Birder L, Ruan H, Chopra B ve ark. Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2004;287:F1084-F1091.
206. Lee HY, Bardini M, Burnstock G. Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J. Urol.* 2000;163:2002-2007.
207. Apostolidis A, Popat R, Yiangou Y ve ark. Decreased sensory receptors P2X3 and TRPV1 in suburothelial nerve fibers following intradetrusor injections of botulinum toxin for human detrusor overactivity. *J. Urol.* 2005;174:977-983.
208. Ruan HZ, Birder LA, Xiang Z ve ark. Expression of P2X and P2Y receptors in the intramural parasympathetic ganglia of the cat urinary bladder. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006;290:F1143-F1152.
209. Moore KH, Ray FR, Barden JA. Loss of purinergic P2X3 and P2X5 receptor innervation in human detrusor from adults with urge incontinence. *J. Neurosci.* 2001;21:RC166-RC166.
210. Takezawa K, Kondo M, Kiuchi H ve ark. Authentic role of ATP signaling in micturition reflex. *Sci. Rep.* 2016;6:1-9.
211. Apodaca G, Balestreire E, Birder L. The uroepithelial-associated sensory web. *Kidney Int.* 2007;72:1057-1064.
212. Matsumoto-Miyai K, Kagase A, Murakawa Y, Momota Y, Kawatani M. Extracellular Ca²⁺ regulates the stimulus-elicited ATP release from urothelium. *Auton. Neurosci.* 2009;150:94-99.
213. Ferguson D, Kennedy I, Burton T. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism? *J. Physiol.* 1997;505:503.
214. Birder L, Nakamura Y, Kiss S ve ark. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat. Neurosci.* 2002;5:856-860.

215. Araki I, Du S, Kobayashi H ve ark. Roles of mechanosensitive ion channels in bladder sensory transduction and overactive bladder. *Int. J. Urol.* 2008;15:681-687.
216. Cheng Y-R, Jiang B-Y, Chen C-C. Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemo-sensing and mechano-sensing. *J. Biomed. Sci.* 2018;25:1-14.
217. Coste B, Mathur J, Schmidt M ve ark. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science.* 2010;330:55-60.
218. Miyamoto T, Mochizuki T, Nakagomi H ve ark. Functional role for Piezo1 in stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in urothelial cell cultures. *J. Biol. Chem.* 2014;289:16565-16575.
219. Sadananda P, Shang F, Liu L, Mansfield K, Burcher E. Release of ATP from rat urinary bladder mucosa: role of acid, vanilloids and stretch. *Br. J. Pharmacol.* 2009;158:1655-1662.
220. Bodin P, Burnstock G. ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1996;27:872-875.
221. Chess-Williams R, Sellers DJ, Brierley SM, Grundy D, Grundy L. Purinergic receptor mediated calcium signalling in urothelial cells. *Sci. Rep.* 2019;9:1-10.
222. Sui G, Fry CH, Montgomery B, Roberts M, Wu R, Wu C. Purinergic and muscarinic modulation of ATP release from the urothelium and its paracrine actions. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2014;306:F286-F298.
223. Sun Y, Keay S, Lehrfeld TJ, Chai TC. Changes in adenosine triphosphate-stimulated ATP release suggest association between cytokine and purinergic signaling in bladder urothelial cells. *Urology.* 2009;74:1163-1168.
224. Mills KA, West EJ, Grundy L ve ark. Hypersensitivity of bladder low threshold, wide dynamic range, afferent fibres following treatment with the chemotherapeutic drugs cyclophosphamide and ifosfamide. *Arch. Toxicol.* 2020;94:2785-2797.
225. Cheng Y, Mansfield K, Allen W, Chess-Williams R, Burcher E, Moore K. ATP during early bladder stretch is important for urgency in detrusor overactivity patients. *Biomed Res. Int.* 2014;2014:
226. Munoz A, Smith CP, Boone TB, Somogyi GT. Overactive and underactive bladder dysfunction is reflected by alterations in urothelial ATP and NO release. *Neurochem. Int.* 2011;58:295-300.
227. Salas NA, Somogyi GT, Gangitano DA, Boone TB, Smith CP. Receptor activated bladder and spinal ATP release in neurally intact and chronic spinal cord injured rats. *Neurochem. Int.* 2007;50:345-350.
228. Silva-Ramos M, Silva I, Oliveira JC, Correia-de-Sá P. Increased urinary adenosine triphosphate in patients with bladder outlet obstruction due to benign prostate hyperplasia. *The Prostate.* 2016;76:1353-1363.
229. Drake MJ, Fry CH, Hashitani H ve ark. What are the origins and relevance of spontaneous bladder contractions? ICI-RS 2017. *Neurourol. Urodyn.* 2018;37:S13-S19.
230. Heppner TJ, Hennig GW, Nelson MT, Vizzard MA. Rhythmic calcium events in the lamina propria network of the urinary bladder of rat pups. *Front. Syst. Neurosci.* 2017;11:87.
231. Young JS, Meng E, Cunnane TC, Brain KL. Spontaneous purinergic neurotransmission in the mouse urinary bladder. *J. Physiol.* 2008;586:5743-5755.

232. McCarthy CJ, Ikeda Y, Skennerton D ve ark. Characterisation of nerve-mediated ATP release from bladder detrusor muscle and its pathological implications. *Br. J. Pharmacol.* 2019;176:4720-4730.
233. McCarthy CJ, Marangos C, Fry CH, Ikeda Y. ATP transients accompany spontaneous contractions in isolated guinea-pig detrusor smooth muscle. *Exp. Physiol.* 2019;104:1717-1725.
234. McDonnell BM, Buchanan PJ, Prise KM, McCloskey KD. Acute radiation impacts contractility of guinea-pig bladder strips affecting mucosal-detrusor interactions. *PLoS One.* 2018;13:e0193923.
235. Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009;10:283-294.
236. Sandkuhler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol. Rev.* 2009;89:707-758.
237. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation.* 2010;120:3760-3772.
238. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in molecular neuroscience.* 2017;10:284.
239. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol.* 1934;18:385.
240. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology.* 2003;463:3-33.
241. Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology.* 1984;327:1-5.
242. File SE, Pellow S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *Br. J. Pharmacol.* 1985;86:729-735.
243. Arantes R, Tejada J, Bosco GG, Morato S, Roque AC. Mathematical methods to model rodent behavior in the elevated plus-maze. *Journal of neuroscience methods.* 2013;220:141-148.
244. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1941;72:74-79.
245. MacDonald A, Woolfe G, Bergel F, Morrison A, Rinderknecht H. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1946;1:4.
246. Ko I-G, Jin J-J, Hwang L ve ark. Adenosine A2A receptor agonist polydeoxyribonucleotide alleviates interstitial cystitis-induced voiding dysfunction by suppressing inflammation and apoptosis in rats. *Journal of Inflammation Research.* 2021;14:367.
247. Chen C-L, Kao C-C, Yang M-H ve ark. A Novel Intravesical Dextrose Injection Improves Lower Urinary Tract Symptoms on Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome. *Front. Pharmacol.* 2021;12:
248. Beča KI, Girard BM, Heppner TJ ve ark. The Role of PIEZO1 in Urinary Bladder Function and Dysfunction in a Rodent Model of Cyclophosphamide-Induced Cystitis. *Frontiers in Pain Research.* 2021;2:
249. Dias B, Serrão P, Cruz F, Charrua A. Effect of water avoidance stress on serum and urinary NGF levels in rats: diagnostic and therapeutic implications for BPS/IC patients. *Scientific Reports.* 2019;9:1-8.

250. Starkman JS, Martinez-Ferrer M, Iturregui JM, Uwamariya C, Dmochowski RR, Bhowmick NA. Nicotinic signaling ameliorates acute bladder inflammation induced by protamine sulfate or cyclophosphamide. *J. Urol.* 2008;179:2440-2446.
251. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.* 1976;72:248-254.
252. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods.* 1985;14:149-167.
253. Gamaro G, Xavier M, Denardin J ve ark. The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiology & behavior.* 1998;63:693-697.
254. Metz GA, Schwab ME, Welzl H. The effects of acute and chronic stress on motor and sensory performance in male Lewis rats. *Physiology & behavior.* 2001;72:29-35.
255. Ferguson AC, Sutton BW, Boone TB, Ford AP, Munoz A. Inhibition of urothelial P2X3 receptors prevents desensitization of purinergic detrusor contractions in the rat bladder. *BJU Int.* 2015;116:293-301.
256. Luo J, Yang C, Luo X ve ark. Chlorogenic acid attenuates cyclophosphamide-induced rat interstitial cystitis. *Life sciences.* 2020;254:117590.
257. Augé C, Gamé X, Vergnolle N, Lluet P, Chabot S. Characterization and validation of a chronic model of cyclophosphamide-induced interstitial cystitis/bladder pain syndrome in rats. *Front. Pharmacol.* 2020;11:1305.
258. Murray E, Malley SE, Qiao L-Y, Hu VY, Vizzard MA. Cyclophosphamide induced cystitis alters neurotrophin and receptor tyrosine kinase expression in pelvic ganglia and bladder. *J. Urol.* 2004;172:2434-2439.
259. Chen Z, Du S, Kong C, Zhang Z, Mokhtar A-d. Intrathecal administration of TRPA1 antagonists attenuate cyclophosphamide-induced cystitis in rats with hyper-reflexia micturition. *BMC urology.* 2016;16:1-9.
260. Yang Y, Zhang H, Lu Q ve ark. Suppression of adenosine A2a receptors alleviates bladder overactivity and hyperalgesia in cyclophosphamide-induced cystitis by inhibiting TRPV1. *Biochemical Pharmacology.* 2021;183:114340.
261. Lu Q, Yang Y, Zhang H ve ark. Activation of GPR18 by resolvin D2 relieves pain and improves bladder function in cyclophosphamide-induced cystitis through inhibiting TRPV1. *Drug Design, Development and Therapy.* 2021;15:4687.
262. Liu X, Yang Y, Gao Y ve ark. Estrogen inhibits bladder overactivity in rats with cyclophosphamide-induced cystitis via downregulating the expression of P2X3 receptors in bladder epithelium cells. *Neurourol. Urodyn.* 2022;41:174-187.
263. Zhao M, Liu L, Chen Z ve ark. Upregulation of transient receptor potential cation channel subfamily M member-3 in bladder afferents is involved in chronic pain in cyclophosphamide-induced cystitis. *Pain.* 2022;10.1097.
264. Martins J, Silva R, Coutinho-Silva R ve ark. The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. *Br. J. Pharmacol.* 2012;165:183-196.
265. Illes P, Müller CE, Jacobson KA ve ark. Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. *Br. J. Pharmacol.* 2021;178:489-514.