

**T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANDA MESANE KAYNAKLI DÜZ KAS GEVŞETİCİ
FAKTÖRÜN SALIVERİLMESİNİN VE ETKİ MEKANİZMASININ
ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Ecz. Turgut Emrah BOZKURT

**Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İnci ŞAHİN-ERDEMLİ**

**ANKARA
2009**

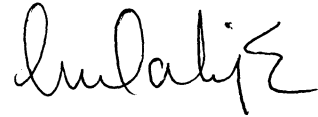
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmakoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Serdar Uma
Hacettepe Üniversitesi



Danışman: Prof. Dr. İnci Şahin-Erdemli
Hacettepe Üniversitesi



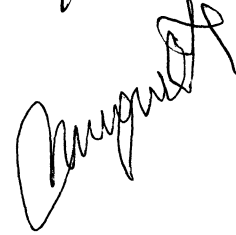
Üye: Prof. Dr. Mustafa İlhan
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Can Pekiner
Hacettepe Üniversitesi

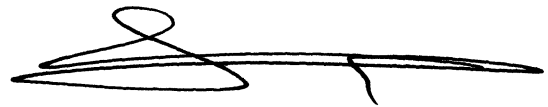


Üye: Doç. Dr. Müge Tecder Ünal
Başkent Üniversitesi



Onay:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer (v.)
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımda bana yol gösteren, destekleyen ve hiçbir konuda yardımını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. İnci Şahin-Erdemli'ye,

Değerli görüşleri ile tezimin gelişmesindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Mustafa İlhan ve Prof. Dr. Serdar Uma'ya,

Her zaman yanımda olan ve beni her konuda destekleyen eşim Nihan Burul-Bozkurt'a ve aileme,

Aynı laboratuvarı paylaőtığımız çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araőtırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 05D03301001, Proje No: 09T06102001, (4916)).

ÖZET

Bozkurt, T.E., Sıçanda mesane kaynaklı düz kas gevşetici faktörün saliverilmesinin ve etki mekanizmasının araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2009. Bu çalışmada mesane kaynaklı gevşetici faktörün saliverilmesi ve etki mekanizması sıçan mesanesinin donör, sıçan anokoksigeus kasının essey doku olarak kullanıldığı bir koaksiyel biyoessey sistemi ile araştırıldı. Koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin gevşeme yanıtı oluşturdu ve bu yanıt kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP 8-37), vazoaaktif intestinal peptid (VIP 6-28) antagonistleri, taşikinin NK1 (L-732138), NK2 (MEN-10376) ve NK3 (SB-218795), pürinerjik P2 (PPADS) ve adenosin (CGS 15943) reseptör antagonistleri yanı sıra kapsaisin ve α -kimotripsin ile değişmedi. Muskarinik antagonistler telenzepin, AF-DX 116, darifenasin, 4-DAMP, tropikamid ve atropin asetilkolin yanıtlarını inhibe etmiştir. Muskarinik agonistler betanekol, pilokarpin, McN-A-343 ve antikolinesteraz fizostigmin de asetilkoline benzer şekilde gevşeme yanıtı oluşturmuştur. Adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 ve protein kinaz A inhibitörü KT-5720 asetilkolin yanıtlarını inhibe ederken guanilat siklaz inhibitörü ODQ ve protein kinaz C inhibitörü H-7 etkilememiştir. P2X agonisti α,β -metilen ATP de koaksiyel biyoessey sistemde gevşeme oluşturmaktadır ve bu yanıt PPADS, SQ-22536 ve KT-5720 ile inhibe olmuştur. Mesane striplerinde ise asetilkolin ve α,β -metilen ATP ile kasılma yanıtı elde edilmiş ve bu yanıtlar SQ-22536 ve KT-5720 ile değişmemiştir. Sonuç olarak mesane kaynaklı gevşetici faktör bir nöropeptid ya da pürinerjik mediyatör değildir. Bu faktörün saliverilmesine M_1 - ve M_3 - muskarinik reseptörler aracılık etmektedir ve adenilat siklaz-protein kinaz A saliverilmesinde ve/veya gevşetici etkisinde rol oynamaktadır. Ayrıca bu faktör detrusörün kasılması ve endojen asetilkolin ile de saliverilebilir.

Anahtar kelimeler: mesane, mesane-kaynaklı gevşetici faktör, koaksiyel biyoessey sistem, sıçan, *in vitro*

ABSTRACT

Bozkurt, T.E., The Investigation of the Release and Mechanism of Action of the Urinary Bladder-derived Relaxant Factor in Rat, Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Pharmacology, Ankara, 2009. In the present study, the release and mechanism of action of the urinary bladder-derived relaxant factor was investigated by a coaxial bioassay system consisting of rat bladder as the donor and anococcygeus muscle as the assay tissue. Acetylcholine elicited a relaxation response that was not altered by the antagonists of calcitonin gene-related peptide (CGRP 8-37), vasoactive intestinal peptide (VIP 6-28), tachykinin NK1 (L-732138), NK2 (MEN-10376), NK3 (SB-218795), purinergic P2 (PPADS) and adenosine (CGS 15943) receptors as well as capsaicin and α -chymotrypsin in the coaxial bioassay system. The muscarinic antagonists telenzepine, AF-DX 116, darifenacin, 4-DAMP, tropicamide, and atropine antagonized the acetylcholine response. Muscarinic agonists bethanechol, pilocarpin, McN-A-343 and the anticholinesterase agent physostigmine also induced relaxation like acetylcholine. Adenylate cyclase inhibitor SQ-22536 and protein kinase A inhibitor KT-5720 inhibited the acetylcholine response while guanylate cyclase inhibitor ODQ, and protein kinase C inhibitor H-7 did not have any effect. The P2X agonist α,β -methylene ATP also produced relaxation that was inhibited by PPADS, SQ-22536 and KT-5720 in the coaxial bioassay system. In bladder strips, acetylcholine and α,β -methylene ATP elicited contractions that were not altered by SQ-22536 and KT-5720. In conclusion, the urinary bladder-derived relaxant factor is neither a neuropeptide nor a purinergic mediator. M_1 - and M_3 - muscarinic receptors mediate the release of this factor and adenylate cyclase and protein kinase A are involved in its release and/or relaxant effect. Furthermore, the contraction of the detrusor and the endogeneous acetylcholine are also capable of releasing this factor.

Keywords: urinary bladder, urinary bladder-derived relaxant factor, coaxial bioassay system, rat, *in vitro*

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mesanenin Fonksiyonel Anatomisi	3
2.1.1. Ürotelyum	3
2.1.2. Detrüsr	3
2.1.3. Afferent Sinirler	4
2.1.4. Efferent Sinirler	5
2.2. Kolinerjik Mekanizmalar	6
2.2.1. Kolinerjik Sinirler	6
2.2.2. Muskarinik Reseptörler	6
2.3. Adrenerjik Mekanizmalar	7
2.3.1. Adrenerjik Sinirler	7
2.3.2. α -Adrenoseptörler	7
2.3.3. β -Adrenoseptörler ve cAMP Yolağı	8
2.4. Nonadrenerjik, Nonkolinerjik (NANK) Mekanizmalar	8
2.4.1. ATP	9
2.4.2. Nitrik Oksit	9
2.4.3. Nöropeptidler	10
2.4.3.1. Taşikininler ve Kapsaisine Duyarlı Primer Afferentler	10
2.4.3.2. Kalsitonin Geni ile İlişkili Peptid (CGRP)	11
2.4.3.3. Vazoaktif İntestinal Polipeptid (VIP)	11

2.5. Aminler	12
2.5.1. 5-Hidroksitriptamin (Serotonin)	12
2.5.2. Histamin	12
2.6. Prostanoidler ve Lökotrienler	12
2.7. Bilinmeyen Faktörler	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Koaksiyel Biyoessey Sistemi Deneyleri	14
3.1.1. Deney Protokolü	14
3.1.1.1. Nöropeptid ve Pürinerjik Reseptör Antagonistleri	15
3.1.1.2. Muskarinik Reseptör Antagonistleri	15
3.1.1.3. Muskarinik Reseptör Agonistleri	16
3.1.1.4. İkinci Ulakların İnhibitörleri	16
3.1.1.5. Fizostigmin	16
3.1.1.6. α,β -metilen-ATP	16
3.2. İzole Mesane Strip Deneyleri	16
3.2.1. Deney Protokolü	17
3.3. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz	17
3.4. Deneylerde Kullanılan Solüsyonlar ve İlaçlar	18
4. BULGULAR	20
4.1. Koaksiyel Biyoessey Sistemde Elde Edilen Bulgular	20
4.1.1. Nöropeptid ve Pürinerjik Reseptör Antagonistleri ile Elde Edilen Bulgular	21
4.1.2. Muskarinik Reseptör Antagonistleri ile Elde Edilen Bulgular	23
4.1.3. Muskarinik Reseptör Agonistleri ile Elde Edilen Bulgular	28
4.1.4. İkinci Ulakların İnhibitörleri ile Elde Edilen Bulgular	30
4.1.5. Fizostigmin ile Elde Edilen Bulgular	34
4.1.6. α,β -metilen ATP ile Elde Edilen Bulgular	36
4.2. İzole Mesane Striplerinde Elde Edilen Bulgular	39
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ VE YORUM	49
7. KAYNAKLAR	50
8. EK	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
CGRP	Kalsitonin geni ile ilişkili peptid
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDHF	Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
K _{ATP}	ATP-duyarlı potasyum kanalı
NANK	Nonadrenerjik nonkolinerjik
NKA	Nörokinin A
NKB	Nörokinin B
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NPY	Nöropeptid Y
VIP	Vazoaktif intestinal polipeptid

ŞEKİLLER

	Sayfa
4.1. Koaksiyel biyoessey sistemde (A) ve tek başına anokoksigeus kasında (B) fenilefrin ön-kasılması sonrası elde edilen asetilkolin yanıtlarına ait deney traseleri	20
4.1.2.1 Koaksiyel biyoessey sistemde telenzepin (A) ve AF-DX 116 (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	24
4.1.2.2 Koaksiyel biyoessey sistemde darifenasin (A) ve 4-DAMP (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	25
4.1.2.3 Koaksiyel biyoessey sistemde tropikamid (A) ve atropin (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	26
4.1.3.1 Koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin, betanekol, pilokarpin ve McN-A-343 ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	28
4.1.4.1 Koaksiyel biyoessey sistemde ODQ (A) ve H-7 (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	31
4.1.4.2 Koaksiyel biyoessey sistemde SQ-22536 (A) ve KT-5720 (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	32
4.1.5.1 Koaksiyel biyoessey sistemde fenilefrin ile ön kasılma sonrası fizostigmin ile elde edilen gevşeme yanıtına ait deney trasesi	34
4.1.5.2 Fizostigmin (10 uM)'in koaksiyel biyoessey sistemde elde edilen gevşeme yanıtına atropin (100 nM)' in etkisi ve mesane ile çevrelenmemiş (mesane (-)) anokoksigeus kasında fizostigmin (10 uM) yanıtı	35

4.1.6.1	Koaksiyel biyoessey sistemde fenilefrin ile ön kasılma sonrası α,β -metilen ATP ile elde edilen gevşeme yanıtına ait deney trasesi	36
4.1.6.2	Koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin ve α,β -metilen ATP ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	37
4.1.6.3	Koaksiyel biyoessey sistemde PPADS ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrasında α,β -metilen ATP ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	37
4.1.6.4	Koaksiyel biyoessey sistemde SQ-22536 (A) ve KT-5720 (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrasında α,β -metilen ATP ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	38
4.2.1	Sıçan mesane striplerinde SQ-22536 ve KT-5720 ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin (A) ve α,β -metilen ATP (B) ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	40

TABLULAR

	Sayfa
4.1.1. Koaksiyel biyoessey sistemde CGRP 8-37, VIP 6-28, L-732138, MEN-10376, SB-218795, PPADS ve CGS-15943 inkübasyonundan önce (kontrol) ve sonra (antagonist) asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pD_2 ve E_{max} değerleri	22
4.1.2.1 Koaksiyel biyoessey sistemde, muskarinik reseptör antagonistleri telenzepin, AF-DX 116, darifenasin, 4-DAMP, tropikamid ve atropin için asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pK_B değerleri	27
4.1.3.1 Koaksiyel biyoessey sistemde muskarinik reseptör agonistleri asetilkolin, betanekol, pilokarpin ve McN-A-343 için konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pD_2 değerleri	29
4.1.4.1 Koaksiyel biyoessey sistemde SQ-22536, KT-5720, ODQ ve H-7 inkübasyonundan önce (kontrol) ve sonra (inhibitör) asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pD_2 ve E_{max} değerleri	33

1. GİRİŞ

Mesane fonksiyonel kapasiteye ulaşana kadar idrarı intravezikal basınçta anlamlı bir artış olmayacak şekilde depolar. İdrarın depolanması sırasında detrüsör düz kasının gevşemesinde birçok mekanizma rol oynamaktadır. Mesane düz kasının vizkoelastik özellikleri [1], parasempatik yolakların inhibisyonu, inhibitör sempatik veya non-adrenerjik, non-kolinerjik aktivite [2], detrüsörün gerilmesi sonucu oluşan prostanoidler [3], mesanedeki duyusal sinir uçlarında bulunan nöropeptidler [4] gibi birçok faktör mesanenin dolumu sırasındaki gevşemesine katkıda bulunmaktadır. Mesane epiteli (ürotelyum)'nden salıverilen mediyatörler (nitrik oksit (NO), prostaglandinler, adenozin trifosfat (ATP) v.b.) de detrüsör düz kasının kasılma yanıtlarını etkilemektedir.

Tüm bu mekanizmaların yanı sıra Fovaeus ve diğerleri [5] muskarinik reseptör stimülasyonu ile bir düz kas gevşetici faktörün sıçan mesanesinden salıverildiğini koaksiyel biyoessey yöntemi ile göstermişlerdir. Mesane duvarından salıverilen ancak ürotelyumdan kaynaklanmayan ve henüz yapısı aydınlatılmamış olan bu gevşetici faktörün de detrüsörün gevşemesine katkısı olabileceği düşünülmektedir. Sıçan mesanesi ile çevrelenmiş endotelsiz sıçan torasik aortası kullanarak hazırlanan koaksiyel biyoessey sisteminde bu faktörün NO ya da bir siklooksijenaz ürünü olmadığı ve salıverilmesine potasyum kanallarının aracılık etmediği belirtilmiştir [5]. Daha sonra essey doku olarak endotelsiz sıçan torasik aortası yerine sıçan anokoksigeus kası kullanılarak aynı biyoessey sisteminde laboratuvarımızda yapılan bir çalışma ile bu bulgular desteklenmiş ve mesane inflamasyonunun bu faktörün sentezi ya da salıverilmesi üzerinde etkisiz olduğu gösterilmiştir [6]. Bir çalışmamızda ise mesane kaynaklı gevşetici faktörün reaktif oksijen bileşiklerinden etkilenmediği, endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) benzeri aktivite göstermediği ve salıverilmesinde tetrodotoksine rezistan sodyum kanallarının rolü olduğu, bu nedenle de salıverilmenin intramural duyusal nöronlardan olabileceği ileri sürülmüştür [7].

Bu çalışmada, sıçan mesanesinin donör organ, sıçan anokoksigeus kasının essey doku olarak kullanıldığı bir koaksiyel biyoessey sistemi ile mesane kaynaklı gevşetici faktörün tanımlanmış endojen mediyatörlerden biri olup olmadığı, salıverilmesine aracılık eden muskarinik reseptör alt-tipleri ve yaptığı düz kas gevşemesinin mekanizması araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Alt üriner sistemin iki önemli fonksiyonel ünitesi vardır. Bunlardan birincisi rezervuar kısmı yani mesane, diğeri ise çıkış kısmı yani mesane boynu ve üretranın düz ve çizgili kaslarıdır [2, 8]. İdrarın depolanması sırasında çıkış kapalı, mesane düz kası intravezikal basıncı geniş bir hacim aralığında düşük seviyede tutacak şekilde gevşektir. İdrarın boşaltılması sırasında ise çıkış kısmını oluşturan kaslar gevşer ve mesane düz kası kasılarak idrarın çıkışını sağlar.

2.1. Mesanenin Fonksiyonel Anatomisi

2.1.1. Ürotelyum

Mesane epiteli (ürotelyum) uzun bir süre idrarın depolanmasında koruyucu bir bariyer olarak nitelendirilmiştir. Ancak son yıllardaki çalışmalar ürotelyum hücrelerinin basınç gibi mekanik uyarıları algıladığı ve yanıt verdiğini, ayrıca bunları sinir sistemine ilettiğine işaret etmektedir [9]. Dolayısıyla bu hücreler NO, ATP, asetilkolin ve diğer mediyatörleri üreterek afferent sinirlerin aktivitelerini kontrol edebilir ve bir mekanosensör olarak görev yaparak miksiyon refleksini başlatabilir [10].

2.1.2. Detrüsör

Detrüsörde üç düz kas tabakası tanımlanmıştır. Bunlardan en dıştaki ve en içteki longitudinal, orta tabakadaki ise sirküler olarak yerleşmiştir. Düz kas hücreleri diğer organlardakiler ile benzer yapıdadır. Kas demetleri insan detrüsöründe karmaşık düzendedir ve kollajenden zengin bir bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Tavşan, sıçan gibi daha küçük hayvanlarda ise kas demetleri daha basit organize olmuşlardır [11].

2.1.3. Afferent Sinirler

Afferent sinir gövdeleri dorsal kök gangliyonlarından mesaneye ve spinal korda projeksiyon yaparlar. Retrograd işaretleme ile yapılan çalışmalar mesane ve üretranın afferent inervasyonunun büyük kısmının sakral bölgedeki dorsal kök gangliyonlarından kaynaklandığını ve pelvik sinir içerisinde seyrettiğini göstermiştir [12]. Bazı afferentler ise sempatik çıkış seviyesinden kaynaklanır ve hipogastrik sinir içerisinde seyrederek. Sakral afferent sinir uçları detrüör ve üretranın bütün bölgelerine düzenli bir şekilde dağılırken, lomber afferent sinir uçları trigonda yoğun, mesane gövdesinde ise seyrek olarak bulunur. Afferent hipogastrik ve pelvik yolaklar mesanenin normal dolumu ve mesanedeki ağrı ile ilgili duyulara aracılık eder. Pelvik ve pudental yolaklar ise miksiyon refleksi ve üretranın termal duyuları ile ilişkilidir [12].

İnsanlarda ve deney hayvanlarında afferent sinirler detrüör kasında ve subütötyal bölgede bulunurlar [13]. Gabella ve Davis, [14] afferent aksonların dört farklı bölgede dağıldığını göstermişlerdir. Bunlar; epitel tabakasının tabanı, epitelin içi, kan damarları (hem arter, hem de venlerde) ve kas lifleridir. Kas tabakasının afferent inervasyonu diffüz ve tüm mesane boyunca tekdüze bir yapı gösterir. Ancak mesanenin tepe kısmındaki epitel ve lamina propriada afferent akson yoktur.

Miksiyonun gerçekleşmesinde rol oynayan en önemli afferentler pelvik sinir içerisinde seyreden ve mesane duvarındaki reseptörlerden spinal korda bilgi taşıyan miyelinli A δ ve miyelinsiz C lifleridir. A δ lifleri pasif gerilmeye ve aktif kontraksiyona yanıt vererek mesanenin doluluğu hakkında bilgi verirler [15]. C-liflerinin ise mekanik uyarılma eşiği yüksektir, primer olarak mesane mukozasının kimyasal irritasyonuna ya da soğuğa duyarlıdır [16, 17]. Bu lifler normalde inaktiftir ve "sessiz lifler" olarak adlandırılırlar. C-liflerinin bazıları nosiseptiftir, kimyasal uyarılara duyarlıdır ve daha sonra mekanosensitif olabilirler. Epitelyal ve subütötyal afferentlerin idrarın kimyasal kompozisyonundaki değişikliklere ya da NO, prostaglandinler ve

ATP gibi epitelden saliverilen faktörlere karşı da yanıt oluşturduğuna ilişkin bilgiler vardır [10].

2.1.4. Efferent Sinirler

Mesanenin boşaltılması ve idrarın depolanması parasempatik, sempatik ve somatik sinirlerin içerisindeki efferent ve afferent uyarılardan oluşan kompleks bir düzen içerir. Bu sinirler mesanenin gevşek halde tutularak idrarın düşük intravezikal basınçta depolanmasından, sonra da sfinkteri gevşeterek ve mesane düz kasının kasılması ile miksiyonu fasilite etmekten sorumludur. Detrüsörün kontraksiyonu ve sfinkterin gevşemesi spinal kordun S2-S4 seviyesindeki sakral parasempatik nükleuslarda bulunan parasempatik nöronların aktivasyonu ile olur [8]. Aksonlar pelvik sinir içerisinde seyrederek ve pelvik pleksusta, mesane üzerindeki gangliyonlarda ya da mesane ve üretra duvarı içerisindeki gangliyonlardaki postganglionik sinirlerle sinaps yaparlar. Preganglionik nörotransmisyon nikotinik reseptörler üzerine etki eden asetilkolin aracılığı ile olurken, ayrıca adrenerjik, muskarinik, pürinerjik ve peptiderjik presinaptik reseptörlerle de modüle edilebilir [12]. Pelvik sinirdeki postganglionik nöronlar ise asetilkolin salıvererek detrüsör düz kasına eksitatör uyarılar gönderir.

Mesane ve üretranın sempatik inervasyonunun çoğu spinal kordun torakolumbar bölgesindeki (T10-L2) intermediyalateral nükleuslardan kaynaklanır. Aksonlar ya inferior mezenterik ganglion üzerinden hipogastrik sinirde ya da paravertebral gangliyonlar üzerinden pelvik sinirde seyrederek. Böylece sempatik sinyaller hem hipogastrik hem de pelvik sinirler aracılığı ile taşınır [12].

İnsanlarda alt üriner sistemin sempatik inervasyonunun primer etkileri spinal ve ganglion düzeyinde parasempatik yolların inhibisyonu ve mesane tabanının ve üretranın kontraksiyonudur. Ancak birçok memelide detrüsörün adrenerjik inervasyonu noradrenalin salıvererek detrüsörün gevşemesine aracılık etmektedir [2]. İzole mesane dokusu, sinirlerin

elektriksel stimülasyonu ile saliverilen ya da eksojen olarak verilen noradrenaline gevşeme yanıtı verir [2, 18].

2.2. Kolinergik Mekanizmalar

2.2.1. Kolinergik Sinirler

Kolinergik sinir uçları sıçan mesanesinde düz kas lifleri içerisinde yoğun olarak bulunmaktadır. Bu sinir uçlarında asetilkolinin yanı sıra nöropeptid Y (NPY), nitrik oksit sentaz (NOS) ve vazoaaktif intestinal polipeptid (VIP) de bulunur [12]. Bu sinirler ayrıca mesanede subürotelyal bölgede de bulunurlar ancak fonksiyonları belli değildir [19].

2.2.2. Muskarinik Reseptörler

Muskarinik reseptörler beş farklı gen ile kodlanan, farmakolojik olarak tanımlanmış ve M_1 'den M_5 'e kadar isimlendirilen beş alt-tipten oluşmaktadır [20]. Muskarinik reseptörler G-proteinleri ile kenetlidirler fakat sinyal transdüksiyon sistemleri değişebilir. M_1 , M_3 ve M_5 reseptörleri $G_{q/11}$ ile kenetlidirler ve fosfoinozitol hidrolizini aktive ederek hücre içi kalsiyumu mobilize ederler. M_2 ve M_4 reseptörleri ise pertusis toksine duyarlı $G_{i/o}$ ile kenetlidir ve adenilat siklazı inhibe ederler.

İnsan mesanesinde bütün muskarinik reseptör alt-tiplerinin mRNA'sı gösterilmiştir [21] ancak insanda ve bir çok hayvan türünde detrüsröz düz kasında en fazla M_2 ve M_3 alt-tipleri eksprese edilmektedir [22-25].

Normal miksiyon kontraksiyonlarından sorumlu olan alt-tip M_3 'tür [11]. Detrüsrözdeki M_3 muskarinik reseptörlerin aktivasyonundaki ana yolak L-tipi kalsiyum kanallarından kalsiyum influksü ve Rho-kinaz aktivasyonu ile miyozin hafif zincir fosfatazın inhibisyonu sonucu kontraktil mekanizmanın kalsiyum duyarlılığının artmasıdır [12].

M_2 -muskarinik reseptörlerin fonksiyonel rolü henüz tam olarak aydınlatılmamıştır, ancak bu reseptörlerin sempatik sistem üzerinden oluşan

β -adrenerjik reseptörler aracılı düz kas gevşemesini tersine çevirdikleri düşünülmektedir [26]. M_2 reseptör aktivasyonu aynı zamanda non-spesifik kation kanallarını aktive [27] ya da protein kinaz C aktivasyonu ile ATP-duyarlı potasyum kanallarını (K_{ATP}) inhibe edebilir [28, 29]. Diğer taraftan birçok hastalık durumunda M_2 reseptörler mesane kontraksiyonuna katkıda bulunabilir [30]. Ancak çıkış obstrüksiyonu olan mesanelerde bile detrüsör kontraksiyonundan primer olarak M_3 reseptörler sorumludur.

Muskarinik reseptörler presinaptik sinir ucunda da bulunurlar ve transmitter salıverilmesini düzenlerler. İnhibitör presinaptik reseptörler tavşan, sıçan, kobay ve insanda M_2 ve M_4 'tür [31-35]. Presinaptik fasilitatör reseptörler ise M_1 'lerdir [31, 32].

Muskarinik reseptörler ürotelyumda da gösterilmiştir ancak fonksiyonel önemleri henüz belli değildir. Bilinmeyen bir inhibitör faktörün salıverilmesinden sorumlu olabilirler [36].

Muskarinik reseptörlerin fonksiyonu mesane çıkış obstrüksiyonu, nörojenik mesane, aşırı aktif mesane ve diyabet gibi hastalıklarda değişir. Ancak bu değişikliklerin detrüsör fonksiyonundaki önemi tam olarak anlaşılamamıştır.

2.3. Adrenerjik Mekanizmalar

2.3.1. Adrenerjik Sinirler

Mesane gövdesi oldukça dağınık bir noradrenerjik inervasyona sahiptir. Noradrenerjik sinirlerin yoğunluğu düz kasta mesane boynuna doğru artar. Bu sinirler lamina propria da vardır, ancak fonksiyonel önemleri henüz bilinmemektedir [37].

2.3.2. α -Adrenoseptörler

İnsan detrüsöründe β -adrenoseptörler α -adrenoseptörlerden daha fazladır ve noradrenaline verilen yanıt gevşemedir [2]. Goepel ve diğerleri

[38] insan detrüsründe α -adrenoseptörlerin sayısının düşük olduğunu, sıralamanın ise $\beta > \alpha_2 > \alpha_1$ şeklinde olduğunu göstermiştir. α -adrenoseptörlerin mesane kontraksiyonunda önemli bir rollerinin olmamasına rağmen, mesane çıkış obstrüksiyonu ve aşırı aktif mesane gibi patolojilerde bu durumun değişebileceği kanıtlanmıştır [12].

2.3.3. β -Adrenoseptörler ve cAMP Yolağı

Noradrenalinin detrüsrdeki gevşetici etkisi hem presinaptik hem de postsinaptik olarak gerçekleşebilir [39]. Kolinerjik sinirlerdeki α_2 -adrenoseptörlerin uyarılması asetilkolin salıverilmesinin azalmasına neden olmaktadır. Mesanede β -adrenoseptörler α -adrenoseptörlerden postsinaptik olarak daha fazla olduğundan noradrenalin β -adrenoseptörler aracılığıyla detrüsrde gevşeme yapar [2, 18]. Mesanede β_1 , β_2 , ve β_3 adrenoseptör alt-tiplerinin varlığı gösterilmiştir [40, 41]. Birçok türde β_2 -adrenoseptörler dominanttır fakat kobay detrüsründe hem β_1 hem de β_2 alt-tipinin bulunduğu ve gevşetici etkinin esas olarak β_1 -adrenoseptörler aracılığı ile olduğu bildirilmiştir [42, 43]. İnsan mesanesinde β -adrenoseptör yanıtlarının β_3 -adrenoseptörler aracılığı ile olduğu düşünülmektedir [12]. Dolayısıyla bu reseptörlerin dolum sırasında mesanenin gevşek durumda kalmasında kısmen rolü olduğu ileri sürülebilir. Ancak sempatektominin ya da β -adrenoseptör blokajının mesanenin dolumu üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir [44].

2.4. Nonadrenerjik, Nonkolinerjik (NANK) Mekanizmalar

Birçok memeli türünde elektriksel sinir stimülasyonu ile oluşan mesane kontraksiyonlarının bir kısmı atropine rezistandır [2]. NANK aracılı yanıtların total kontraksiyon içerisindeki oranı türe ve uyarı frekansına göre değişmektedir.

2.4.1. ATP

İnsan detrusöründe elektriksel uyarı ile oluşan kontraksiyonun atropine rezistan kısmının α,β -metilen-ATP ile ortadan kaldırılabildiği dolayısıyla da bu yanıtta NANK mediyatörünün ATP olduğu ileri sürülmektedir [45]. Husted ve diğerleri [46] ATP'nin izole insan detrusöründe konsantrasyona-bağımlı kasılma oluşturduğunu ve sinir stimülasyonu ile oluşan yanıtları presinaptik ve postsinaptik düzeyde etkilediğini göstermiştir. ATP'nin kontraktıl etkileri P2X stimülasyonu aracılığı ile olmaktadır. İnsan mesanesinde P2X₁ reseptör alt-tipinin varlığı ve bu reseptörün aktivasyonunun kasılma oluşmasında önemli olduğu bildirilmiştir. P2X₃ alt-tipi ise mesanenin hacim değişiklikleri ile ilgili reflekslerini kontrol eden periferik afferent yollarda önemli rol oynamaktadır [47].

Bugüne kadar yapılan çalışmalar ATP'nin mesanedeki eksitatör nörotransmisyona hem detrusörün hem de afferent sinirlerin stimülasyonu ile katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

2.4.2. NO

Deney hayvanları ve insanların alt üriner sistem (mesane ve üretra) düz kaslarında NOS enziminin hem yapısal hem de indüklenebilir (iNOS) tiplerinin varlığı gösterilmiştir. iNOS stimüle edilmemiş detrusör hücrelerinde bulunmamaktadır ancak üriner sistem infeksiyonlarında ve lipopolisakkarit ya da sitokinlerle uyarı sonucu bu enzim eksprese edilmektedir [12].

NO alt üriner sistemin inhibitör NANK yanıtlarının büyük kısmından sorumludur. NO'nun detrusördeki fonksiyonel rolünün henüz tam olarak anlaşılabilmesi ile birlikte dolum sırasında mesanenin gevşemesinde önemli bir faktör olduğu ileri sürülmektedir [48, 49]. Diğer taraftan NO donörleri ve dibütil-cGMP'nin izole insan detrusör kasında ön-kasılma sonrası gevşeme, kasılma ya da bifazik kompleks bir yanıt oluşturduğu bildirilmiştir [50].

2.4.3. Nöropeptidler

2.4.3.1. Taşikinler ve Kapsaisine Duyarlı Primer Afferentler:

Mesane ve üretradaki kapsaisine duyarlı primer afferentlerde P maddesi, nörokinin A (NKA) ve nörokinin B (NKB)'nin de içinde olduğu taşikinler bulunmaktadır. Bu peptidlerin duyuşal fonksiyonlarının yanı sıra lokal efektör ya da efferent fonksiyonları da vardır [51, 52]. Ayrıca mesane gangliyonlarında ve nöromüsküler kavşakta nörotransmitter ve/veya nöromodülatör olarak da rol oynuyor olabilirler. Bu peptidlerin mikşiyon refleksinin aktivasyonu, düz kas kasılması, efferent nörotransmisyonun potansiyalizasyonu ve nörojenik inflamasyonda gözlenen vasküler tonus ve permeabilite değişikliklerine katkıları olabileceği bildirilmiştir [12].

Taşikinler etkilerini kendi NK reseptörleri üzerinden gösterirler. Taşikinlerden P maddesi NK1 reseptörü, NKA NK2 reseptörü ve NKB de NK3 reseptörü üzerine en yüksek afiniteyi göstermektedirler. Bu reseptörlerin hepsi farklı memeli türlerinin mesanelerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir [51, 52]. Sıçan detrüsöründe her üç reseptör de bulunurken hamster, fare, köpek ve insan detrüsöründe NK2 reseptörü daha dominanttır [52]. İnsan detrüsöründe de taşikinler, reseptörleri ve kasıcı etkileri gösterilmiş ve kasılmadan sorumlu olan reseptörün NK2 alt-tipi olduğu bildirilmiştir [12]. Bu peptidlerin potensleri ise NKA>NKB>>P maddesi şeklindedir [51, 53].

Vanilloidler ve vanilloid reseptörleri: Kapsaisin ve resiniferatoksin mesane fonksiyon bozukluklarının tedavisinde başarı ile uygulanmaktadır [10]. Bu maddelerin her ikisi de etkilerini VR1 reseptörü üzerinden göstermektedir. VR1 reseptörleri nonselektif katyon kanallarıdır ve nosiseptif nöronların periferik uçlarında bulunmaktadır, ancak normal mesane fonksiyonu ve aşırı aktif mesane patogeneziindeki rolleri bilinmemektedir. Ancak deneysel ve klinik çalışmalar kapsaisine duyarlı afferentlerin nörojenik ve diğer sebeplere bağlı aşırı aktif mesane patogeneziinde katkısı olduğunu göstermiştir [54-56]. Antimuskarinik tedaviye dirençli aşırı aktif mesanesi olan

hastalarda intravezikal resiniferatoksin uygulanarak yapılan klinik çalışmalarda, tek bir uygulamanın başlangıçta hafif bir rahatsızlık (ağrı) oluşturduğunu ancak 3 aylık değerlendirme sonucunda 12 hastanın 11'inde semptomlarda belirgin düzelme olduğu saptanmıştır [55].

2.4.3.2. Kalsitonin Geni ile İlişkili Peptid (CGRP): Sıçan mesanesinde CGRP-immünoreaktivitesi düz kas ve kan damarları çevresinde ve ürotelyumda gösterilmiştir [14]. İnsan mesanesinde CGRP reseptörleri arter ve arteriollerin düz kasları üzerinde ve az miktarda da venüllerin üzerinde bulunurken düz kas üzerinde gözlenmemektedir [57]. Mesanedeki CGRP içeriği primer afferent kaynaklıdır ancak salıverildiğinde düz kas gevşemesi ve vazodilatasyon gibi efferent fonksiyonu da vardır. CGRP'nin etkisinin şiddeti üriner sistemin değişik bölgelerinde farklılık gösterir [58]. Kobay ve köpek mesanesinde CGRP potent gevşetici etki gösterirken sıçan mesanesinde çok belirgin bir etkisi yoktur [59].

2.4.3.3. Vazoaktif İntestinal Polipeptid (VIP): VIP-içeren sinirler subepitelyal ve detrüör kas lifleri arasında bulunur [60]. VIP'in izole detrüördeki etkileri türler arası değişkenlik göstermektedir. Kedilerde VIP *in vivo* olarak pelvik sinir stimülasyonu sonucu salıverilir [61]. İnsan izole detrüöründe bu peptid spontan kontraktıl aktiviteyi inhibe ederken muskarinik reseptör stimülasyonu ya da elektriksel stimülasyonla indüklenen kasılmaları çok az etkilemektedir [62, 63]. Sıçan ve kobay detrüör striplerinde VIP ya etkisizdir ya da çok küçük bir kasılmaya neden olur. Tavşan detrüöründe ise gevşeme oluşturur ve spontan kontraksiyonları inhibe eder [2].

Bunların yanı sıra NPY, endotelinler, anjiotensinler, bradikinin gibi peptidler de detrüör üzerinde kasıcı etki gösterir [12].

2.5. Aminler

2.5.1. 5-Hidroksitriptamin (Serotonin)

Serotonin birçok türün mesane düz kasında kasılmaya neden olur. Bu yanıt serotoninin düz kas üzerindeki direkt etkilerinden ya da otonom sinir sistemi üzerinden gerçekleşen indirekt etkilerinden kaynaklanmaktadır [12].

Kedi, sıçan ve insan mesane düz kaslarında serotonin ile oluşan kontraksiyonlar 5-HT₂ reseptörlerinin stimülasyonu ile olmaktadır [64-68]. Kedi, fare, kobay, tavşan, domuz ve insanda mesanedeki eksitatör nöronlar üzerinde bulunan 5-HT₃ reseptörlerin aktivasyonu da kasılmaya neden olmaktadır [65, 69-75].

2.5.2. Histamin

Histamin mesane düz kasını kasar ve interstisyel sistitte görülen semptomlara aracılık eder [2]. Tavşan ve kobay mesanesinde histamin düz kas üzerindeki H₁-reseptörleri üzerinden kasılma oluşturmaktadır. Ancak tavşan mesanesinde bu kasılmanın bir kısmını histaminin asetilkolin salıverilmesine neden olarak oluşturduğu ileri sürülmüştür [76].

2.6. Prostanoidler ve Lökotrienler

PGF_{2α}, PGE₁ ve PGE₂'nin izole insan ve hayvan detrüsöründe kasılma yaptığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir [2]. Bu bulgular prostanoidlerin detrüsör tonusunun düzenlenmesinde önemli olduğunu düşündürmektedir. İskemik durumlarda ise lökotrienler mesane tonusunun düzenlenmesinde önem kazanır ve artmış düz kas kasılmasında ve aşırı aktif mesanede rol oynarlar [77]. Kobay mesanesinde LTD₄ ve LTE₄ kasılma oluştururken sıçanda bu etki gözlenmemektedir [78, 79]. LTD₄ reseptörleri insan detrüsöründe gösterilmiştir ve LTD₄'ün insan detrüsör düz kas hücrelerinde kasılma yaptığı belirtilmektedir [80].

2.7. Bilinmeyen Faktörler

Fovaeus ve diğerleri [5] sıçan mesanesini donör organ, endotelsiz sıçan aort striplerini de essey doku olarak kullandıkları koaksiyel biyoessey sisteminde, muskarinik reseptör stimülasyonu ile bir düz kas gevşetici faktörün salıverildiğini göstermişlerdir. Mesaneden salıverilen ancak ürotelyum kaynaklı olmayan bu gevşetici faktörün de detrusörün gevşemesine katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Mesane kaynaklı bir diğer inhibitör faktörün varlığı izole domuz mesane striplerinde yapılan bir çalışma ile ileri sürülmüştür. Bu düz kas gevşetici faktörün ürotelyumdan kaynaklandığı ancak NO, sikloksijenaz ürünü, adenosin, kateşolamin, GABA ya da EDHF benzeri bir madde olmadığı gösterilmiştir [36].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada erkek Sprague-Dawley sıçanlar (200-300 g) kullanıldı. Araştırma Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar No:2004/72-2).

3.1. Koaksiyel Biyoessey Sistemi Deneyleri

Çalışmamızda donör organ olarak sıçan mesanesi, essey doku olarak da sıçan anokoksigeus kası kullandığımız bir *in vitro* koaksiyel biyoessey sisteminden yararlanıldı. Bunun için sıçanlar kanatılarak öldürüldü ve mesane ve anokoksigeus kasları izole edildi. Koaksiyel biyoessey sistemini hazırlamak için izole anokoksigeus kası, tepe ve boyun kısımları kesilmiş olan mesanenin içerisinden geçirildi. Bu şekilde mesane ile çevrelenmiş olan anokoksigeus kası organ askısı yardımı ile 37°C'de %95 O₂-%5 CO₂ karışımı ile gazlandırılan ve Krebs-Heinseleit solüsyonu içeren organ banyolarına yerleştirildi. Anokoksigeus kasındaki gerim değişiklikleri bir izometrik kuvvet transdüseri aracılığı ile "MAY 95-Transducer Data Acquisition System" kullanılarak bilgisayara kaydedildi. Dokular yanıtlardan önce 15'er dakika aralıklarla bir saat boyunca Krebs-Heinseleit solüsyonu ile yıkanarak dinlendirildi.

3.1.1. Deney Protokolü

Mesane ile çevrelenmiş anokoksigeus kasında fenilefrin (1-3 µM) ile ön-kasılma sonrası asetilkolin (10⁻⁸-10⁻³ M) ile kümülatif konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları (kontrol) alındı. Daha sonra dokular yıkanarak dinlendirildi ve çeşitli antagonist ve inhibitörler ile 30 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yine fenilefrin (1-3 µM) ile ön-kasılma uygulandı ve asetilkolin (10⁻⁸-10⁻³ M) ile elde edilen gevşeme yanıtı tekrarlandı. Kapsaisin inkübasyonu diğer antagonist ve inhibitörlerden farklı

olarak 20 dakika süre ile yapıldı ve dokular asetilkolin yanıtı alınmadan önce 30 dakika yıkandı.

Asetilkolinin yanısıra diğer muskarinik agonistlerin koaksiyel biyoessey sistemdeki etkilerinin incelenmesi için önce kontrol asetilkolin yanıtı elde edildi. Dokular yıkanarak dinlendirildi ve yine fenilefrin ön-kasılması sonrası incelenecek agonist ile konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtı alındı.

3.1.1.1. Nöropeptid ve Pürinerjik Reseptör Antagonistleri: Mesane kaynaklı gevşetici faktörün duyuşal nöronlarda bulunan endojen peptidlerden biri olup olmadığını araştırmak için bu peptidlerin etkilerine aracılık eden reseptörlerin antagonistlerinin asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtına etkisi incelendi. Bu amaçla CGRP antagonisti CGRP fragment 8-37 (1 μ M), VIP antagonisti VIP 6-28 (1 μ M), NK1 reseptör antagonisti L-732138 (5 μ M), NK2 reseptör antagonisti MEN-10376 (1 μ M) ve NK3 reseptör antagonisti SB-218795 (1 μ M) kullanıldı. Bunların yanı sıra duyuşal sinirlerin toksini olan kapsaisin (10 μ M) ve bir endopeptidaz olan α -kimotripsin'in (10 Ü/ml) de asetilkolin yanıtı üzerine olan etkileri değerlendirildi. Mesane kaynaklı gevşetici faktörün pürinerjik sistemle ilişkisi olup olmadığını araştırmak için de purinerjik P2 reseptör antagonisti olan PPADS (50 μ M) ve adenozin antagonisti CGS 15943'nin (1 μ M) asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtı üzerine olan etkileri incelendi.

3.1.1.2. Muskarinik Reseptör Antagonistleri: Koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtına hangi muskarinik reseptör alt-tiplerinin aracılık ettiği incelendi. Bu amaçla muskarinik reseptörlerin selektif antagonistleri varlığındaki gevşeme yanıtları değerlendirildi. Bunun için M₁ reseptör antagonisti telenzepin (100 nM), M₂-M₄ antagonisti AF-DX 116 (10 μ M), M₃ antagonisti darifenasin (10 nM), M₁-M₃ antagonisti 4-DAMP (10 nM), M₄ antagonisti tropikamid (10 μ M) ve selektif olmayan antagonist atropin (10 nM) kullanıldı.

3.1.1.3. Muskarinik Reseptör Agonistleri: Bu grupta betanekol, pilokarpin ve M₁ agonisti McN-A-343 ile koaksiyel biyoessey sistemde konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtları elde edildi ve bu yanıtlar asetilkolin yanıtı ile karşılaştırıldı.

3.1.1.4. İkinci Ulakların İnhibitörleri: Koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtındaki ikinci ulak mekanizmalar da incelendi. Bu amaçla adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 (100 µM), guanilat siklaz inhibitörü ODQ (100 µM), protein kinaz A inhibitörü KT-5720 (1 µM) ve protein kinaz C inhibitörü H-7 (30 µM) ile inkübasyonun asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtına etkileri değerlendirildi.

3.1.1.5. Fizostigmin: Asetilkolinesteraz inhibitörü olan fizostigmin'in koaksiyel biyoessey sistemdeki etkisi incelendi. Bu amaçla kontrol asetilkolin yanıtı sonrasında yine fenilefrin ile ön-kasılma uygulandı ve 10 µM konsantrasyonda fizostigmin yanıtı elde edildi. Bu yanıt muskarinik reseptör antagonisti atropin varlığında da incelendi. Ayrıca izole organ banyosunda mesane ile çevrelenmemiş anokoksigeus kasında da ön-kasılma sonrası fizostigminin etkisi değerlendirildi.

3.1.1.6. α,β-metilen-ATP: Koaksiyel biyoessey sistemde ATP analogu α,β-metilen-ATP'nin etkisi değerlendirildi. Kontrol asetilkolin yanıtı alındıktan sonra fenilefrin ile ön-kasılma uygulandı ve α,β-metilen-ATP (10⁻⁸-10⁻⁴ M)'nin konsantrasyona-bağımlı yanıtı elde edildi. Farklı koaksiyel biyoessey preparatlarında α,β-metilen-ATP yanıtı adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 (100 µM) ve protein kinaz A inhibitörü KT-5720 (1 µM) varlığında tekrarlandı.

3.2. İzole Mesane Strip Deneyleri

Kanatılarak öldürülen sıçanların mesaneleri izole edildi ve bu dokulardan 1.5 mm genişliğinde ve 10 mm uzunluğunda mesane stripleri hazırlandı. Her mesaneden 3 preparat hazırlandı. Preparatlar 1 g bazal gerim

uygulanarak organ askısı yardımı ile 37°C'de %95 O₂-%5 CO₂ karışımı ile gazlandırılan ve Krebs-Heinseleit solüsyonu içeren organ banyolarına konuldu. Dokulardaki gerim değişiklikleri bir izometrik kuvvet transdüseri aracılığı ile "MAY 95-Transducer Data Acquisition System" kullanılarak bilgisayara kaydedildi.

3.2.1. Deney Protokolü

Dokular yanıtlardan önce 15'er dakika aralıklarla 1 saat boyunca Krebs-Heinseleit solüsyonu ile yıkanarak dinlendirildi. Bu sürenin sonunda 60 mM potasyum klorür (KCl) çözeltisi ile kasılma yanıtı alındı. Daha sonra dokular yine yıkanarak dinlendirildi ve asetilkolin (10 nM-1 mM) ve α,β -metilen-ATP (10 nM-0.1 mM) ile konsantrasyona-bağımlı kasılma yanıtları elde edildi. Ayrıca bu kasılma yanıtları adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 (100 μ M) ve protein kinaz A inhibitörü KT-5720 (1 μ M) ile 30 dakika inkübasyon sonrasında incelendi.

3.3. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz

Koaksiyel biyoessey sistemde elde edilen gevşeme yanıtları papaverin (10⁻⁴ M) gevşemesinin %'si olarak ifade edildi ve konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edildi. Papaverin organ banyosuna asetilkolin ya da α,β -metilen-ATP ile maksimum gevşeme elde edildikten sonra eklendi.

Mesane striplerinde elde edilen kasılmalar 60 mM KCl kasılmasının %'si olarak ifade edildi. 60 mM KCl çözeltisinin izozmolar olması için, krebsten aynı miktarda NaCl uzaklaştırıldı.

Her bir koaksiyel biyoessey preparatında ve mesane stripinde en fazla iki konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edildi.

Agonistlerin potensini değerlendirmek amacıyla konsantrasyon-yanıt eğrilerinden EC₅₀ değeri hesaplandı. Bulgular EC₅₀ değerinin negatif logaritması olan pD₂ değeri olarak sunuldu.

Konsantrasyon-yanıt eğrilerinden agonist ile elde edilen maksimum yanıt hesaplandı ve E_{max} değeri olarak sunuldu.

Muskarinik reseptör antagonistleri ile yapılan deneylerde antagonistlerin pK_B değerleri " $pK_B = -\log([antagonist]/(KO-1))$ " formülüne göre hesaplandı [81]. Bu formülde KO konsantrasyon oranını belirtmektedir.

Değerler ortalama \pm standart hata olarak sunuldu ve yanıtlardaki değişiklikler kendi kontrolleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu amaçla Student's t test ve tek yönlü ANOVA/Newman-Keuls testleri kullanıldı. $P < 0.05$ ise ortalamalar arası fark anlamlı kabul edildi. Veriler GraphPad Prism 3 programı kullanılarak analiz edildi.

3.4. Deneylerde Kullanılan Solüsyonlar ve İlaçlar

Krebs-Heinseleit Solüsyonu (mM): NaCl, 113; KCl, 4.7; MgSO₄, 1.2; CaCl₂, 2.5; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25.0; glukoz, 11.6.

Deneylerde kullanılan ilaçlar:

Asetilkolin klorür, fenilefrin hidroklorür, atropin sülfat monohidrat, papaverin hidroklorür, CGRP 8-37 (Kalsitonin geni ile ilişkili peptid fragment 8-37), VIP 6-28 (Vazoaktif intestinal peptid fragment 6-28), MEN-10376, PPADS (Piridoksal fosfat-6-azo(benzen-2,4-disülfonik asit) tetrasodyum hidrat), ODQ (1H-[1,2,4]Oksadiazolo[4,3-a]kinoksalin-1-on), SQ-22536 (9-(Tetrahidro – 2 - furanil) - 9H – pürin – 6 - amin), H-7 dihidroklorür (1-(5-Isokinolinilsülfonil)-2-metilpiperazin dihidroklorür), KT-5720 ((9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12- Hekzahidro – 10 – hidroksi – 9 -metil-1-okso-9,12-epoksi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirolo[3,4-i][1,6]benzodiazosin – 10 -karboksilik asit heksil ester), α -kimotripsin, kapsaisin, α,β -metilen ATP, fizostigmin salisilat, telenzepin dihidroklorür hidrat, 4-DAMP (4-Difenilasetoksi -N- metilpiperidin) metiyodit, McN-A-343 ((4 – Hidroksi – 2 - bütinil) – 1 – trimetilamonyum – 3 - klorokarbanilat klorür) Sigma (St. Louis, MO)'dan alınmıştır.

AF-DX 116 (11-[[2-[(Dietilamino)metil]-1-piperidinil]asetil]-5,11-dihidro-6H-pirido[2,3-b][1,4]benzodiazepin-6-on), tropikamid (N-Etil-3-hidroksi-2-fenil-N-(piridinilmetil)propanamit), L-732138 (N-Asetil-L-triptofan 3,5-bis

(triflorometil) benzil ester), SB-218795 ((*R*)-[[2-Fenil-4-kinolinil]karbonil] amino] -metil ester benzen asetik asit) ve CGS-15943 (9-Kloro-2-(2-furanil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]kinazolin-5-amin) Tocris'den alınmıştır.

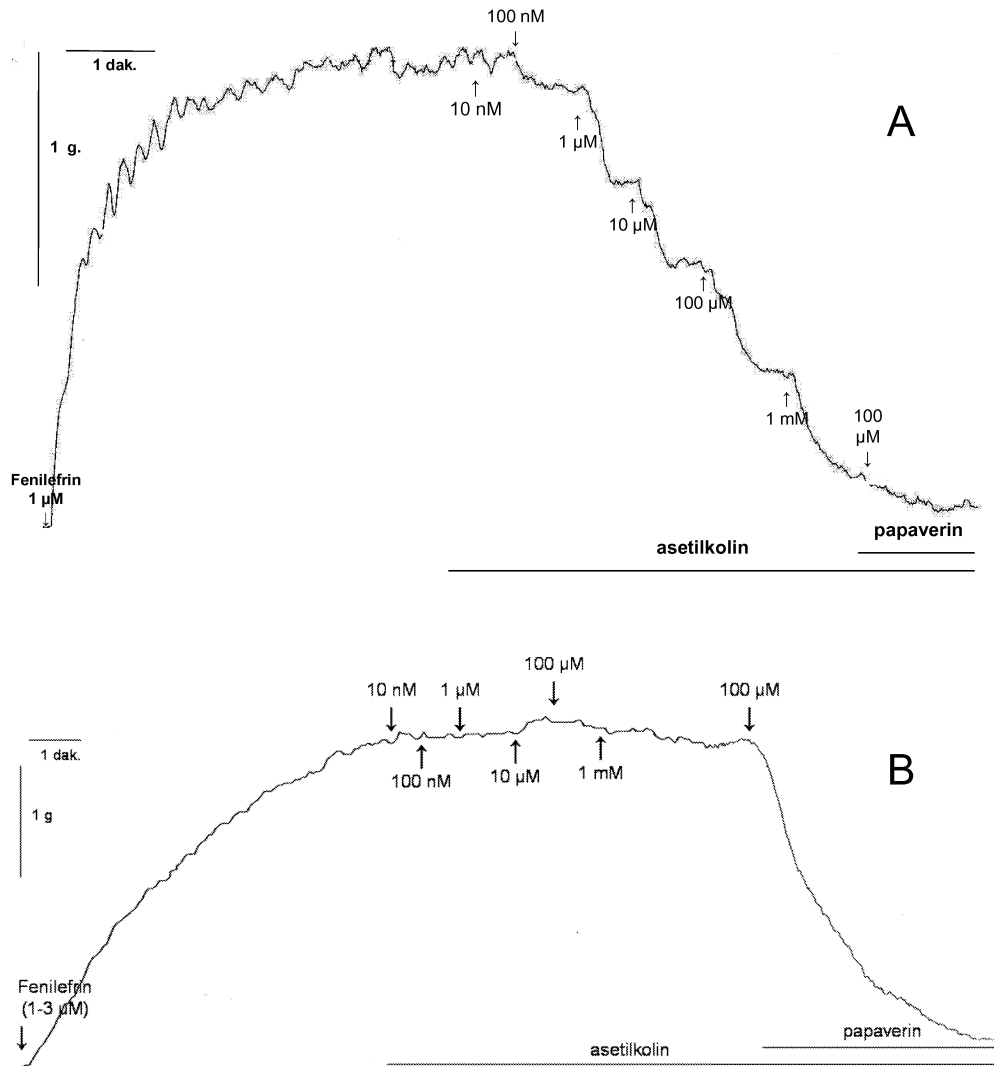
Darifenasin Novartis (İstanbul, Türkiye)'den temin edilmiştir.

AF-DX 116, tropikamid, SB-218795, CGS-15943, ODQ ve KT-5720 dimetilsülfoksit (DMSO)'te, L-732138 ve kapsaisin etanolde diğer tüm ilaçlar distile suda çözülmüştür. DMSO ve etanol, kullanılan konsantrasyonlarda gevşeme yanıtlarını etkilememiştir.

4. BULGULAR

4.1. Koaksiyel Biyoessey Sistemde Elde Edilen Bulgular

Koaksiyel biyoessey sistemde fenilefrin ile ön-kasılma oluşturulan anoksigeus kasında asetilkolin (10^{-8} - 10^{-3} M) konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtı oluşturmaktadır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Koaksiyel biyoessey sistemde (A) ve tek başına anoksigeus kasında (B) fenilefrin ile ön-kasılma sonrası elde edilen asetilkolin yanıtlarına ait deney traseleri.

4.1.1. Nöropeptid ve Pürinerjik Reseptör Antagonistleri ile Elde Edilen Bulgular

Mesane duyuşal sinir uçlarında bulunan peptidlerin antagonistleri; CGRP antagonisti CGRP 8-37 (1 μ M), VIP antagonisti VIP 6-28 (1 μ M), NK1 reseptör antagonisti L-732138 (5 μ M), NK2 reseptör antagonisti MEN-10376 (1 μ M) ve NK3 reseptör antagonisti SB-218795 (1 μ M)'nin koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin yanıtlarına etkileri değeriendirilmiştir. Bu antagonistlerle inkübasyon sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pD_2 ve E_{max} değeri inkübasyon öncesi elde edilen kontrol değeri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($P>0.05$) (Tablo 4.1.1).

Duyuşal sinirlerin toksini olan kapsaisin (10 μ M) ve bir endopeptidaz olan α -kimotripsin (10 Ü/ml) ile inkübasyon da koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin gevşeme yanıtlarını etkilememiştir. Kapsaisin varlığında asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisinden hesaplanan pD_2 değeri 5.22 ± 0.12 iken bu değeri kontrol asetilkolin yanıtı için 5.46 ± 0.16 olarak hesaplanmıştır. α -Kimotripsin varlığındaki pD_2 değeri ise 5.83 ± 0.34 ve kontrolde 5.99 ± 0.25 'tir. Kapsaisin ve α -kimotripsin ile inkübasyon sonrasında elde edilen pD_2 değeri kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında bu değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

Pürinerjik sistem mediyatörlerinin mesane kaynaklı gevşetici faktör yanıtı ile ilişkisi pürinerjik P2 reseptör antagonisti PPADS ve adozin reseptör antagonisti CGS-15943 kullanılarak incelenmiştir. Gerek PPADS (50 μ M), gerekse CGS-15943 (1 μ M) koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarını değeriştirmemiştir. Bu antagonistlerle inkübasyon öncesi ve sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pD_2 ve E_{max} değeri istatistiksel olarak farklı değildir ($P>0.05$) (Tablo 4.1.1).

Tablo 4.1.1: Koaksiyel biyoessey sistemde CGRP 8-37, VIP 6-28, L-732138, MEN-10376, SB-218795, PPADS ve CGS-15943 inkübasyonundan önce (kontrol) ve sonra (antagonist) asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pD_2 ve E_{max} değerleri.

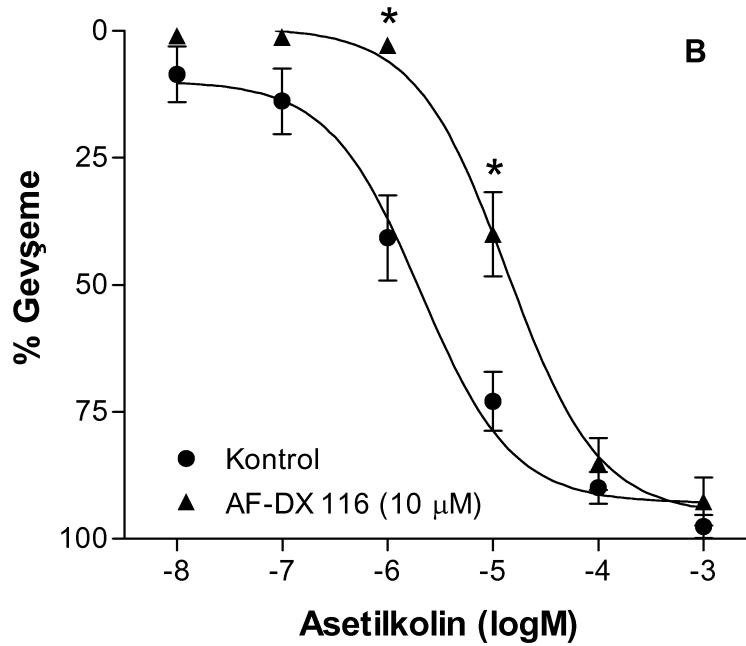
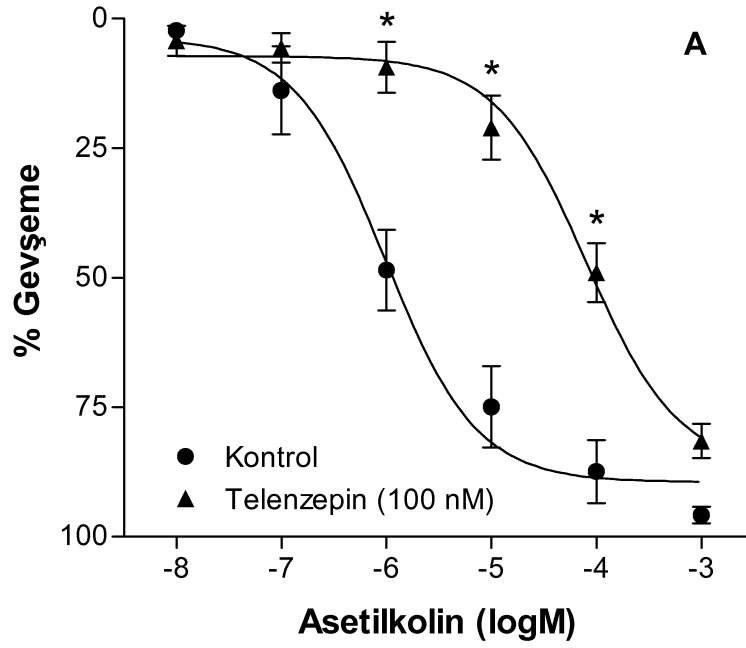
Gruplar	n	pD_2		E_{max}	
		Kontrol	antagonist	kontrol	antagonist
CGRP 8-37 (1 μ M)	6	6.23 \pm 0.18	5.89 \pm 0.24	99.80 \pm 0.20	99.78 \pm 0.13
VIP 6-28 (1 μ M)	6	5.58 \pm 0.26	5.32 \pm 0.19	87.20 \pm 6.63	83.27 \pm 6.64
L-732138 (5 μ M)	6	5.59 \pm 0.37	5.39 \pm 0.14	90.68 \pm 4.72	89.00 \pm 6.16
MEN-10376 (1 μ M)	5	5.93 \pm 0.10	5.88 \pm 0.14	99.25 \pm 0.48	97.60 \pm 1.84
SB-218795 (1 μ M)	6	5.51 \pm 0.20	5.20 \pm 0.28	93.70 \pm 2.12	92.43 \pm 2.37
PPADS (50 μ M)	6	5.68 \pm 0.14	5.47 \pm 0.19	91.16 \pm 2.05	90.69 \pm 3.92
CGS-15943 (1 μ M)	6	5.84 \pm 0.16	5.58 \pm 0.20	90.68 \pm 2.54	86.63 \pm 2.85

pD_2 : EC_{50} değerinin negatif logaritması

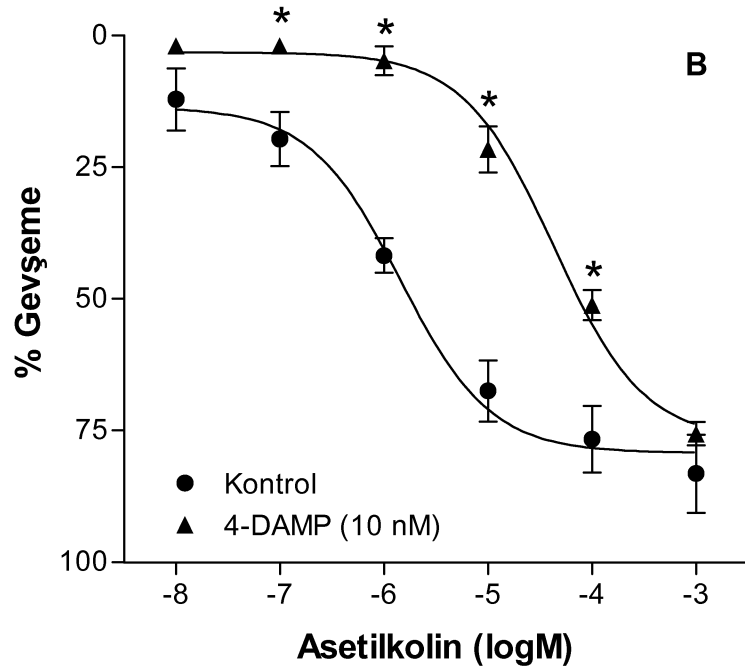
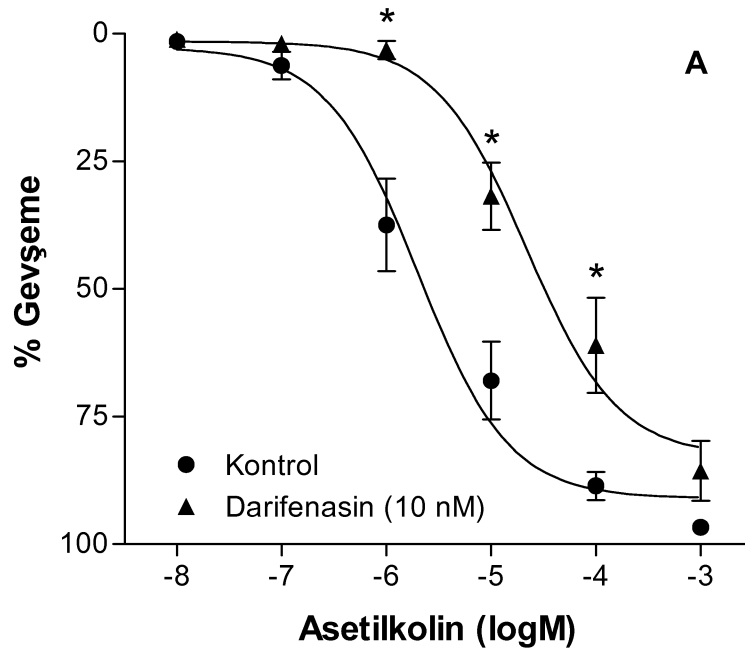
E_{max} : Maksimum gevşeme yanıtı

4.1.2. Muskarinik Reseptör Antagonistleri ile Elde Edilen Bulgular

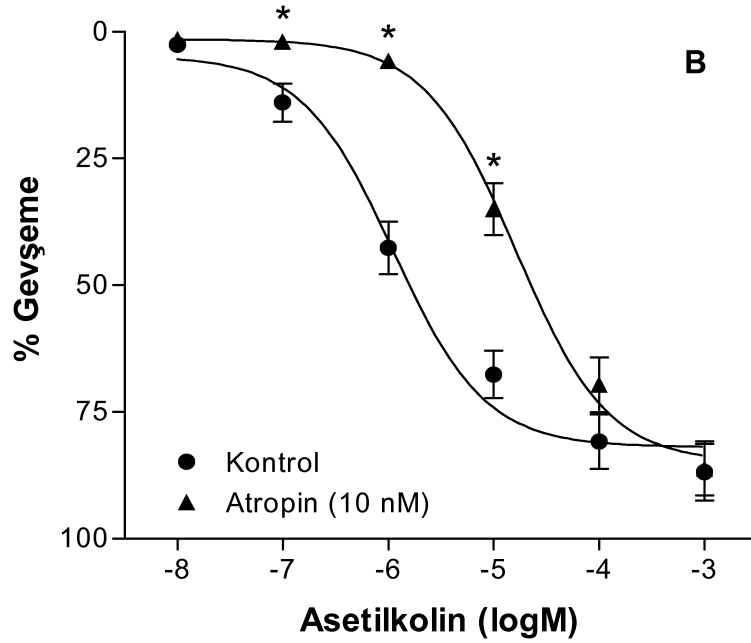
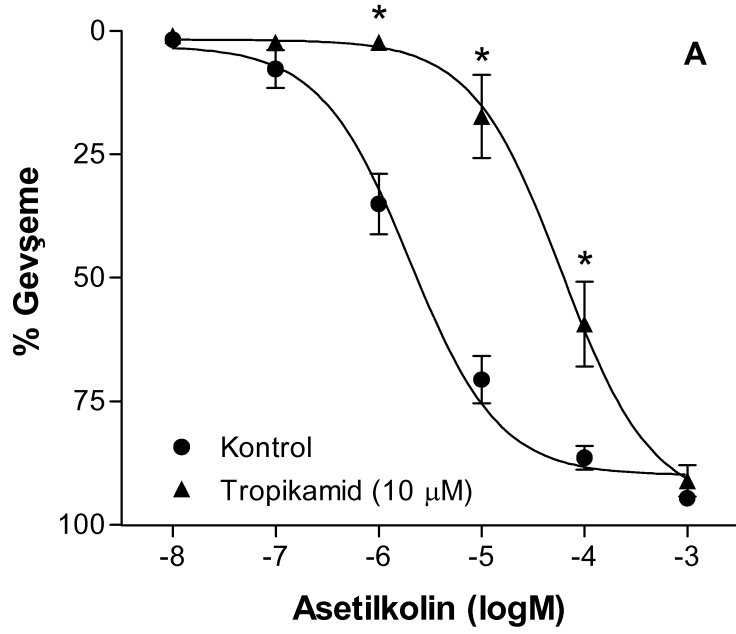
Mesane kaynaklı gevşetici faktörün salıverilmesine aracılık eden muskarinik reseptör alt-tiplerinin belirlenmesi için koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtları M_1 antagonisti telenzepin (100 nM), M_2 antagonisti AF-DX 116 (10 μ M), M_3 antagonisti darifenasin (10 nM), M_1 - M_3 antagonisti 4-DAMP (100 nM), M_4 antagonisti tropikamid (10 μ M) ve selektif olmayan antagonist atropin (10 nM) varlığında incelenmiştir. Bu antagonistlerle inkübasyon sonrasında asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrileri anlamlı olarak sağa kaymıştır ($P<0.05$) (Şekil 4.1.2.1, 4.1.2.2 ve 4.1.2.3). Bu antagonistlerle inkübasyon öncesi ve sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pK_B değerleri Tablo 4.1.2.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1.2.1: Koaksiyel biyoessey sistemde telenzepin (A) ve AF-DX 116 (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri. * kontrolde anlamlı olarak farklı, $P < 0.05$.



Şekil 4.1.2.2: Koaksiyel biyoessey sistemde darifenasin (A) ve 4-DAMP (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri. * kontrolden anlamlı olarak farklı, $P < 0.05$.



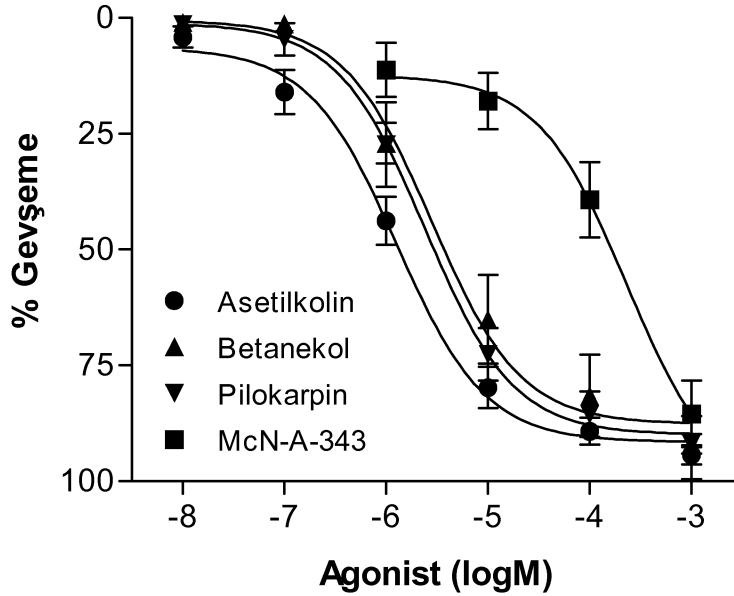
Şekil 4.1.2.3: Koaksiyel biyoessey sistemde tropikamid (A) ve atropin (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri. * kontrolden anlamlı olarak farklı, $P < 0.05$.

Tablo 4.1.2.1: Koaksiyel biyoessey sistemde, muskarinik reseptör antagonistleri telenzepin, AF-DX 116, darifenasin, 4-DAMP, tropikamid ve atropin için asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pK_B değerleri.

Antagonist	pK_B	n
Telenzepin (100 nM)	8.56 ± 0.21	6
AF-DX 116 (10 μ M)	6.01 ± 0.21	6
Darifenasin (10 nM)	9.36 ± 0.17	6
4-DAMP (10 nM)	9.30 ± 0.11	6
Tropikamid (10 μ M)	6.63 ± 0.17	6
Atropin (10 nM)	9.20 ± 0.10	6

4.1.3. Muskarinik Reseptör Agonistleri ile Elde Edilen Bulgular

Koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolinin yanı sıra farklı muskarinik reseptör agonistlerinden betanekol, pilokarpin ve M_1 agonisti McN-A-343'ün de etkileri incelenmiştir. Her üç agonist de asetilkoline benzer şekilde konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtına neden olmaktadır (Şekil 4.1.3.1). Bu agonistlerden betanekol ve pilokarpin için hesaplanan pD_2 değerleri asetilkolinden farklı değil iken McN-A-343'ün pD_2 değeri daha düşük bulunmuştur (Tablo 4.1.3.1).



Şekil 4.1.3.1: Koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin, betanekol, pilokarpin ve McN-A-343 ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri.

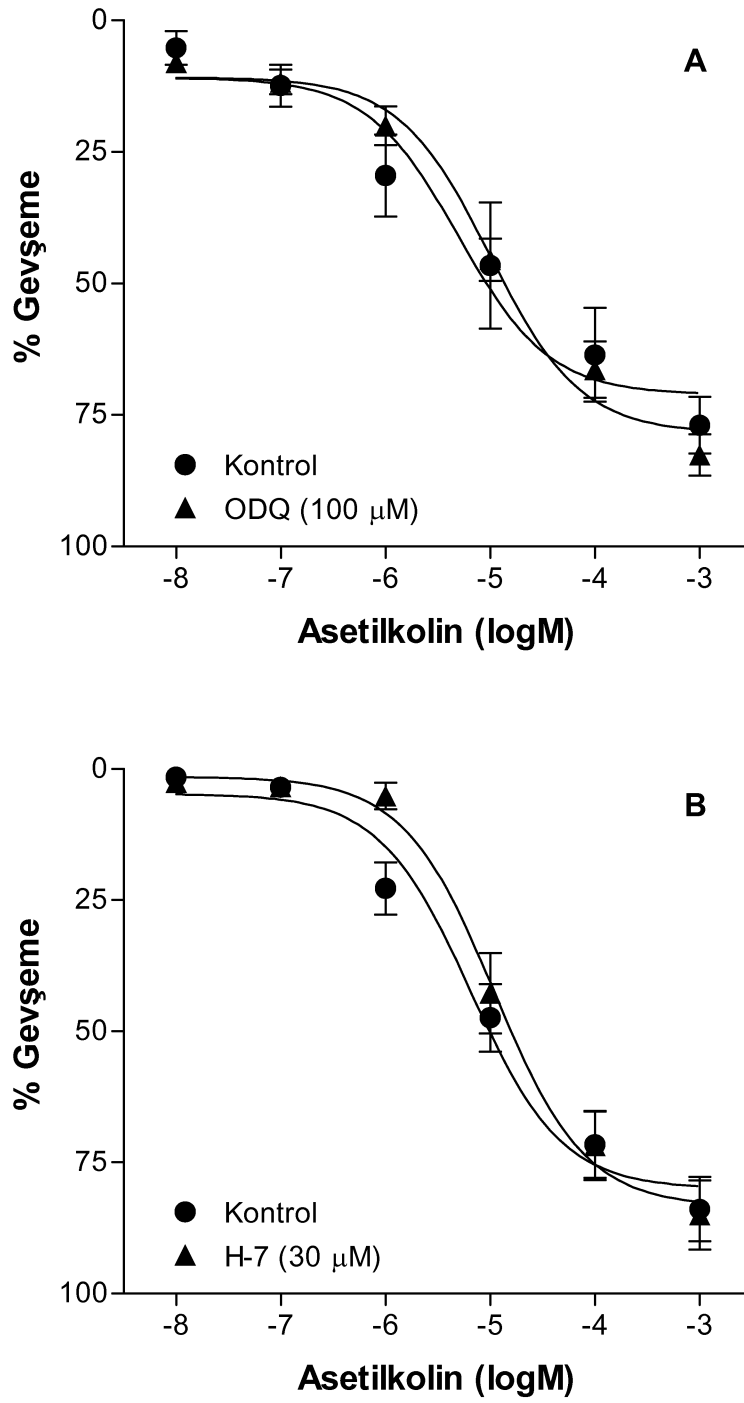
Tablo 4.1.3.1: Koaksiyel biyoessey sistemde muskarinik reseptör agonistleri asetilkolin, betanekol, pilokarpin ve McN-A-343 için konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pD_2 değerleri. * asetilkolinden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$.

Agonist	pD_2
Asetilkolin	5.89 ± 0.08
Betanekol	5.54 ± 0.25
Pilokarpin	5.63 ± 0.18
McN-A-343	$3.63 \pm 0.09^*$

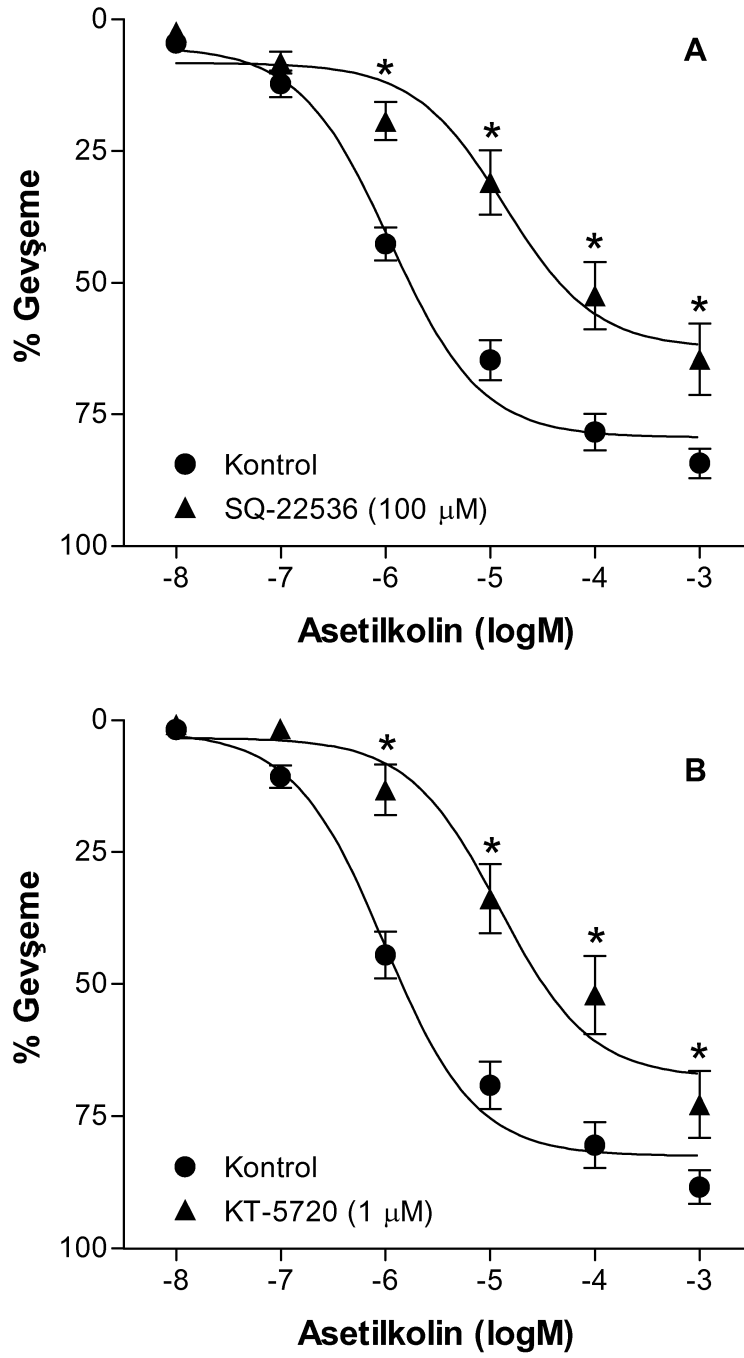
pD_2 : EC_{50} değerinin negatif logaritması

4.1.4. İkinci Ulakların İnhibitörleri ile Elde Edilen Bulgular

Koaksiyel biyoessey sistemde guanilat siklaz, adenilat siklaz, protein kinaz C ve protein kinaz A inhibitörlerinin etkileri incelenmiştir. Guanilat siklaz inhibitörü ODQ (100 μ M) ve protein kinaz C inhibitörü H-7 (30 μ M) asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarını değiştirmemiştir ($P>0.05$) (şekil 4.1.4.1). Adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 (100 μ M) ve protein kinaz A inhibitörü KT-5720 (1 μ M) ise gevşeme yanıtlarını anlamlı olarak inhibe etmiştir ($P<0.05$) (şekil 4.1.4.2). Bu inhibitörlerle inkübasyon öncesi ve sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pD_2 ve E_{max} değerleri Tablo 4.1.4.1'de verilmektedir.



Şekil 4.1.4.1: Koaksiyel biyoessey sistemde ODQ (A) ve H-7 (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri.



Şekil 4.1.4.2: Koaksiyel biyoessey sistemde SQ-22536 (A) ve KT-5720 (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri. * kontrolden anlamlı olarak farklı, $P < 0.05$.

Tablo 4.1.4.1: Koaksiyel biyoessey sistemde ODQ, H-7, SQ-22536 ve KT-5720 inkübasyonundan önce (kontrol) ve sonra (inhibitör) asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan pD_2 ve E_{max} değerleri. * kontrolden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$.

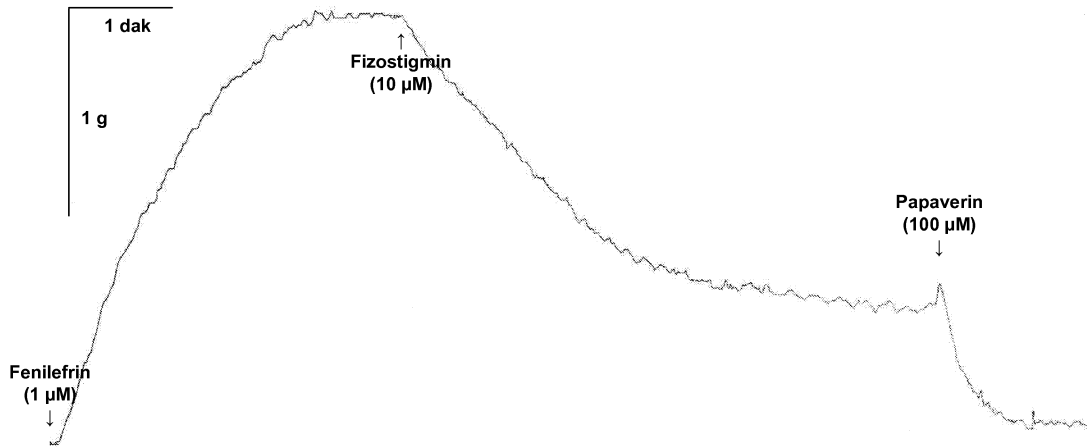
Gruplar	n	pD_2		E_{max}	
		kontrol	inhibitör	kontrol	inhibitör
ODQ (100 μ M)	6	5.25 \pm 0.48	5.06 \pm 0.08	79.45 \pm 6.15	82.00 \pm 4.99
H-7 (30 μ M)	6	5.17 \pm 0.28	5.02 \pm 0.10	88.62 \pm 4.87	91.14 \pm 3.09
SQ-22536 (100 μ M)	10	5.91 \pm 0.10	4.94 \pm 0.29*	84.32 \pm 2.85	64.55 \pm 6.78*
KT-5720 (1 μ M)	8	5.99 \pm 0.17	4.80 \pm 0.32*	88.41 \pm 3.17	72.77 \pm 6.31*

pD_2 : EC_{50} değerinin negatif logaritması

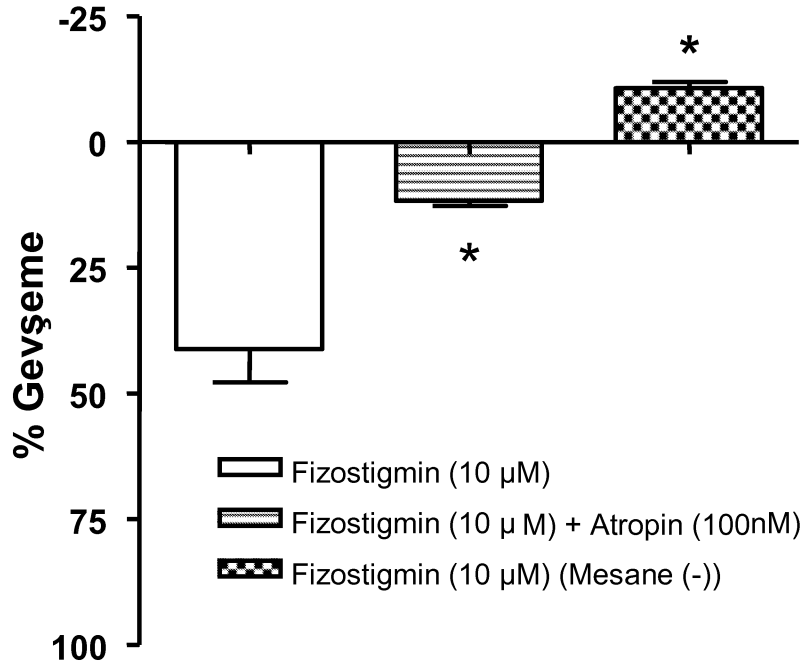
E_{max} : Maksimum gevşemenin yüzdesi

4.1.5. Fizostigmin ile Elde Edilen Bulgular

Asetilkolinesteraz enzim inhibitörü fizostigmin (10 μ M) koaksiyel biyoessey sistemde, fenilefrin ile ön-kasılma oluşturulmuş anokoksigeus kasında gevşeme yanıtına neden olmakta, mesane ile çevrelenmemiş anokoksigeus kasında ise bu gevşeme yanıtı gözlenmemektedir (Şekil 4.1.5.1, 4.1.5.2). Koaksiyel biyoessey sistemde elde edilen fizostigmin gevşemesi asetilkolin ile karşılaştırıldığında daha yavaş gelişen ve maksimuma daha uzun sürede ulaşan bir yanıttır (Şekil 4.1.5.1). Fizostigmin yanıtı muskarinik reseptör antagonisti atropin ile inhibe olmaktadır ($P<0.05$) (Şekil 4.1.5.2).



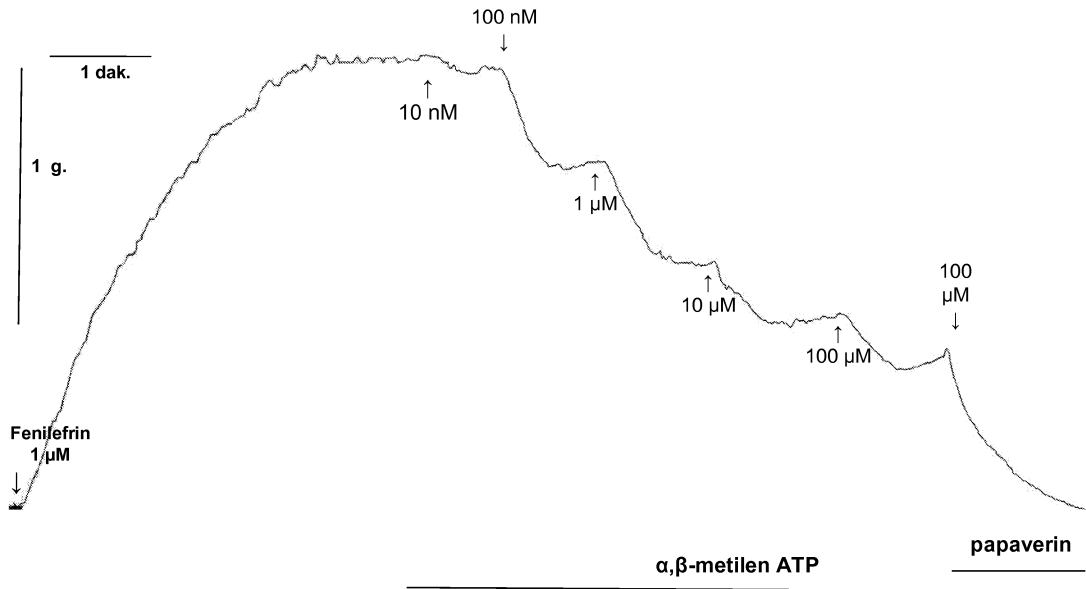
Şekil 4.1.5.1: Koaksiyel biyoessey sistemde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası fizostigmin ile elde edilen gevşeme yanıtına ait deney trasesi.



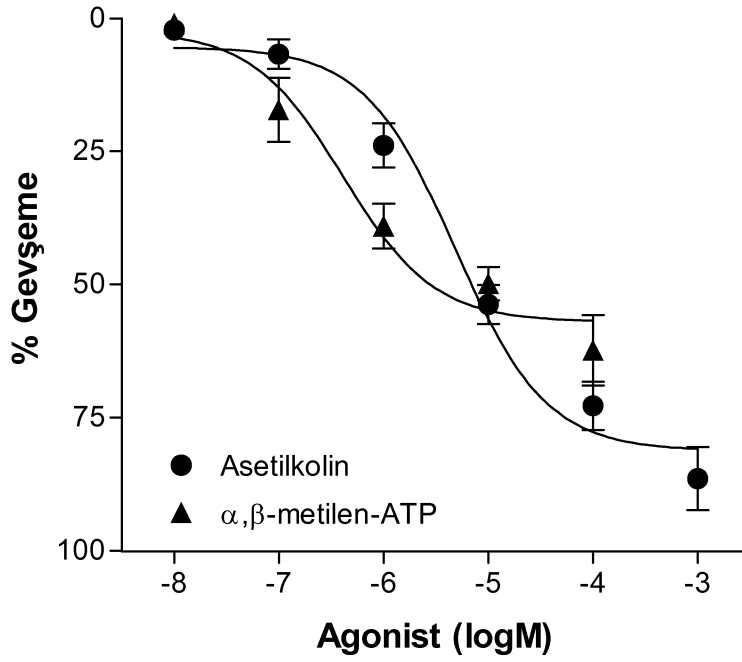
Şekil 4.1.5.2: Fizostigmin (10 µM) ile koaksiyel biyoessey sistemde elde edilen gevşeme yanıtına atropin (100 nM)'in etkisi ve mesane ile çevrelenmemiş (Mesane (-)) anoksigeus kasında fizostigmin (10 µM) yanıtı. * koaksiyel biyoessey sistemdeki fizostigmin yanıtından anlamlı olarak farklı, $P < 0.05$.

4.1.6. α,β -metilen ATP ile Elde Edilen Bulgular

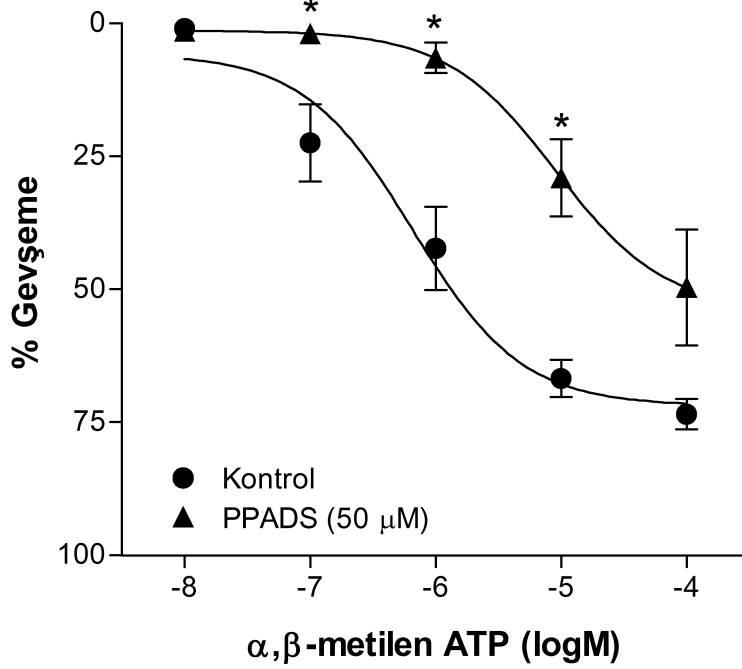
Koaksiyel biyoessey sistemde fenilefrin ile ön-kasılma oluşturulmuş anoksigeous kasında α,β -metilen ATP (10 nM-0.1 mM) asetilkoline benzer şekilde konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtı oluşturmaktadır (Şekil 4.1.6.1, 4.1.6.2). α,β -metilen ATP ile elde edilen gevşeme yanıtı pürinerjik P2 reseptör antagonisti PPADS varlığında inhibe olmuştur ($P<0.05$) (Şekil 4.1.6.3). Adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 (100 μ M) ve protein kinaz A inhibitörü KT-5720 (1 μ M) de α,β -metilen ATP ile elde edilen gevşeme yanıtlarını anlamlı olarak inhibe etmiştir (Şekil 4.1.6.4).



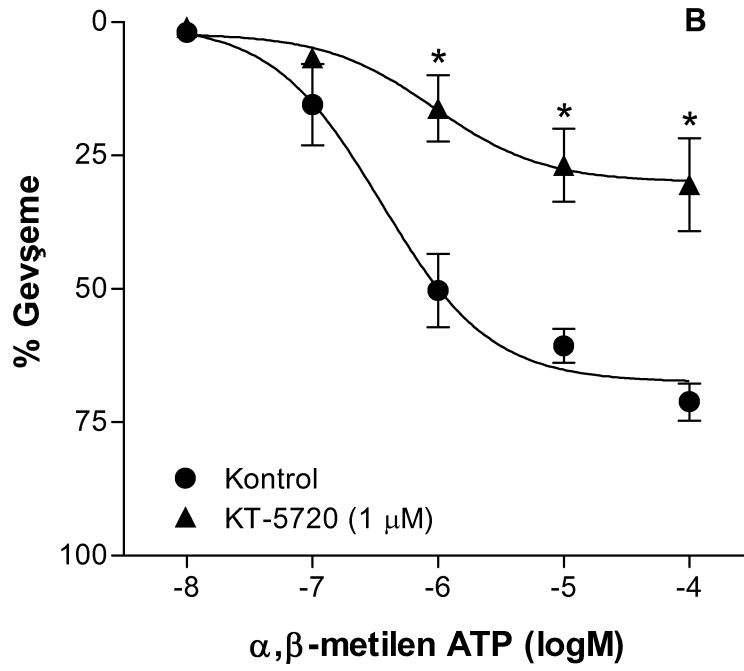
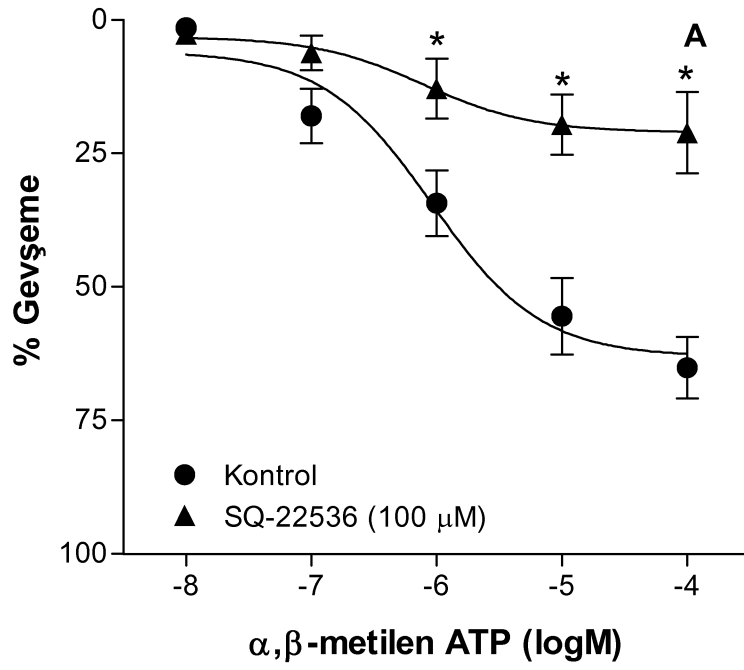
Şekil 4.1.6.1: Koaksiyel biyoessey sistemde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası α,β -metilen ATP ile elde edilen gevşeme yanıtına ait deney trasesi.



Şekil 4.1.6.2: Koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin ve α,β -metilen ATP ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri.



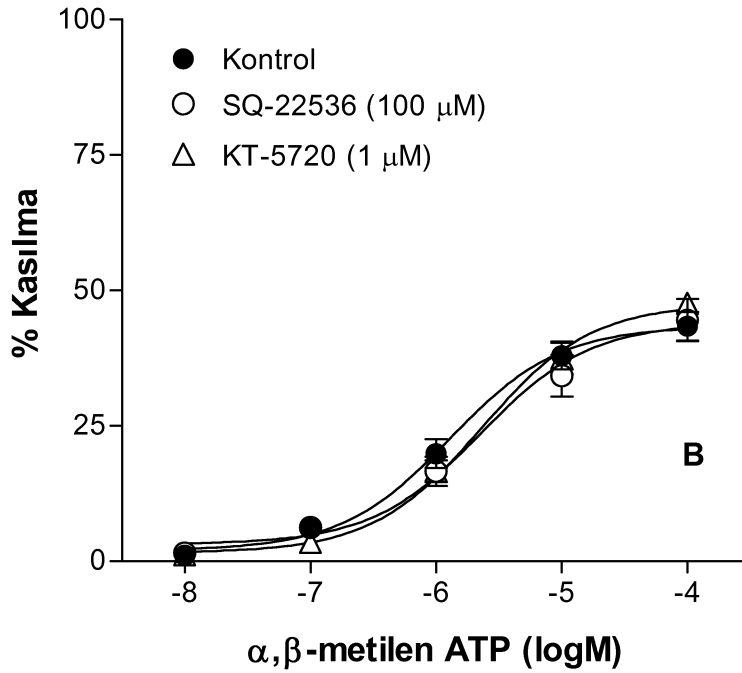
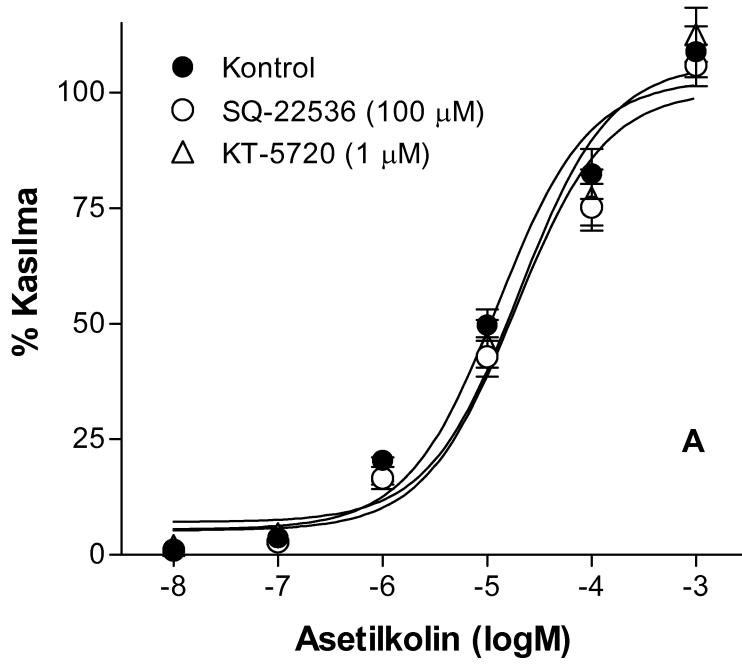
Şekil 4.1.6.3: Koaksiyel biyoessey sistemde PPADS ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrasında α,β -metilen ATP ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri. * kontrolde anlamlı olarak farklı, $P<0.05$.



Şekil 4.1.6.4: Koaksiyel biyoessey sistemde SQ-22536 (A) ve KT-5720 (B) ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrasında α,β -metilen ATP ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri. * kontrolden anlamlı olarak farklı, $P < 0.05$.

4.2. İzole Mesane Striplerinde Elde Edilen Bulgular

Sıçan mesane striplerinde ilk olarak 60 mM KCl ile kasılma yanıtı alınmıştır. Daha sonra asetilkolin (10 nM-1 mM) ve α,β -metilen ATP (10 nM-0.1 mM) ile konsantrasyona-bağımlı kasılma yanıtları elde edilmiştir. Adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 (100 μ M) ve protein kinaz A inhibitörü KT-5720 (1 μ M) mesane striplerinde asetilkolin ve α,β -metilen ATP ile elde edilen kasılma yanıtlarını etkilememiştir ($P>0.05$) (Şekil 4.2.1).



Şekil 4.2.1: Sıçan mesane striplerinde SQ-22536 ve KT-5720 ile inkübasyon öncesi (kontrol) ve sonrası asetilkolin (A) ve α,β -metilen ATP (B) ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri. Yanıtlar 60 mM KCl kasılmasının %'si olarak ifade edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Mesanedeki idrarın depolanması sırasında intravezikal basıncın artmadan kalmasına detrüörün vizkoelastik özellikleri, otonom sinir sistemi, prostanoidler, nöropeptidler, NO ve ürotelyumdan salıverilen faktörler gibi birçok mekanizma aracılık etmektedir [1-4]. Bunların yanı sıra Fovaeus ve diğerleri [5] sıçan mesanesi ile çevrelenmiş endotelsiz sıçan torasik aortası kullanarak hazırladıkları bir koaksiyel biyoessey sistemi ile sıçan mesanesinden bir düz kas gevşetici faktörün salıverildiğini göstermişlerdir. Bu gevşetici faktör muskarinik reseptör stimülasyonu ile salıverilmekte ve ürotelyumdan kaynaklanmamaktadır. Ayrıca bu faktörün NO ya da bir siklooksijenaz ürünü olmadığı ve salıverilmesine potasyum kanallarının aracılık etmediği belirtilmiştir [5, 6]. Yapısı henüz aydınlatılmamış olan bu gevşetici faktörün de dolum sırasında detrüörün gevşemesine katkısı olabileceği düşünülmektedir.

İnci ve diğerleri, [6] essey doku olarak endotelsiz sıçan torasik aortası yerine sıçan anokoksigeus kası kullandıkları aynı biyoessey sisteminde inflamasyonun mesane kaynaklı gevşetici faktörün sentezi ya da salıverilmesi üzerine etkisiz olduğunu göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada ise bu faktörün reaktif oksijen bileşiklerinden etkilenmediği ve EDHF benzeri bir etki göstermediği belirtilmiştir [7]. Ayrıca mesane kaynaklı gevşetici faktörün salıverilmesinde tetrodotoksine rezistan sodyum kanallarının rol oynadığı, bu nedenle de salıverilmenin intramural duysal nöronlardan olabileceği ileri sürülmüştür [7].

Koaksiyel biyoessey sistemi doku veya organlardan salıverilen ve düz kas tonusu üzerinde etkili olabilen endojen maddelerin saptanmasına olanak sağlamaktadır. İlk kez İlhan ve Şahin [82] tarafından kobay trakeasından salıverilen epitel kaynaklı gevşetici faktörün gösterilmesi için kullanılmıştır. Bu çalışmada da *in vitro* izole organ banyosunda sıçan mesanesi ile çevrelenmiş sıçan anokoksigeus kasında fenilefrin ile ön kasılma sonrasında muskarinik agonistler asetilkolin, betanekol ve pilokarpin ile gevşeme oluşması mesane kaynaklı gevşetici faktörün salıverilmesinin bir kanıtı olarak kabul edilmiştir.

Bu çalışmada ilk olarak mesane kaynaklı gevşetici faktörün mesanedeki duyuşal nöronlarda bulunan nöropeptidlerden biri ya da bir pürinerjik mediyatör olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla CGRP, VIP, taşıkinin NK1, NK2 ve NK3 reseptör antagonistleri, pürinerjik P2 ve adenoşin reseptör antagonistlerinin koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarına olan etkileri değerlendirildi.

CGRP genel olarak güçlü gevşetici etkili bir madde iken VIP türe bağılı olarak kasıcı ya da gevşetici etki gösterebilmektedir [58, 63, 83-86]. Ancak her iki peptid de sıçan mesane motilitesi üzerinde çok az etkili ya da etkisizdirler [2]. Bu çalışmada da bu peptidlerin reseptör antagonistleri CGRP 8-37 ve VIP 6-28'in asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarını etkilememesi mesane kaynaklı gevşetici faktörün CGRP ya da VIP olmadığını göstermektedir.

Mesane fizyolojisinde rol oynayan taşıkininler P maddesi, NKA ve NKB sıçan ve diğer birçok türün mesanelerinde kapsaisine duyarlı primer afferent nöronlarda bulunmaktadır. Bu taşıkininler en yüksek afiniteyi sırası ile NK1, NK2 ve NK3 reseptörlerine göstermektedirler [11, 51, 52]. Bu çalışmada taşıkinin reseptör antagonistlerinden NK1 antagonisti L-732138, NK2 antagonisti MEN-10376 ve NK3 antagonisti SB-218795 koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarını etkilemedi. Bu bulgular mesane kaynaklı gevşetici faktörün P maddesi, NKA ya da NKB olmadığını göstermektedir.

ATP mesanede atropine rezistan NANK kasılmalardan sorumlu olan mediyatördür [87]. ATP'nin metaboliti olan adenoşin de NANK yanıtlarında önemlidir [88]. Ancak çalışmamızda asetilkolin yanıtları P2 reseptör antagonisti PPADS ve selektif olmayan adenoşin antagonisti CGS-15943 varlığında değışmedi. Dolayısıyla mesane kaynaklı gevşetici faktörün bir pürinerjik mediyatör olmadığı ileri sürülebilir.

Koaksiyel biyoessey sistemde α -kimotripsin ve kapsaisin'in de asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarını değıştirmemesi bu faktörün duyuşal sinirlerde bulunan bir peptid olmadığını desteklemektedir. Ayrıca bulgularımız mesane kaynaklı gevşetici faktörün etkisini mesanede CGRP,

VIP, NK1, NK2, NK3, pürinerjik P2 ya da adenozin reseptörleri üzerinden oluşturmadığını göstermektedir.

Mesane heterojen bir muskarinik reseptör popülasyonuna sahiptir. Detrüsör düz kasında hem M_2 hem de M_3 reseptörleri eksprese edilirken mesaneyi inerve eden kolinerjik sinir uçlarında fasilitatör M_1 ve inhibitör M_2/M_4 reseptörleri bulunmaktadır [31, 89, 90]. Çalışmamızda mesane kaynaklı gevşetici faktör salıverilmesinde rol oynayan muskarinik reseptör alt-tiplerini araştırmak için M_1 -antagonisti telenzepin, M_2 -antagonisti AF-DX 116, M_3 -antagonisti darifenasin, M_3/M_1 -antagonisti 4-DAMP, M_4 -antagonisti tropikamid ve selektif olmayan antagonist atropinin koaksiyel biyoessey sistemdeki etkileri incelendi. Yukarıda saydığımız antagonistlerin hepsi asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarını maksimum gevşemeyi etkilemeden inhibe etmiştir. Bu antagonistlerin afiniteleri pK_B değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Telenzepin M_1 selektif muskarinik reseptör antagonisti olarak kabul edilmekte ve antagonist profili $M_1 > M_4 > M_3 > M_2$ şeklindedir [23, 91]. Bu çalışmada telenzepin için pK_B değeri 8.56 ± 0.21 olarak hesaplanmıştır. Bu değer telenzepinin tavşan vas deferensinde M_1 için hesaplanmış olan pK_B değeri (8.86) ile uyumludur [92] ancak sıçan sol atriumunda M_2 için (7.32) ve sıçan mesanesinde M_3 için (7.74) hesaplanan pK_B değerleri ile uyumlu değildir [93].

AF-DX 116, M_2 muskarinik reseptörler üzerine yüksek afinite göstermektedir ve antagonist profili $M_2 > M_1 \geq M_4 > M_3$ şeklindedir [94, 95]. Deneylerimizde koaksiyel biyoessey sistemde AF-DX 116 için hesaplanan pK_B değeri 6.01 ± 0.21 'dir. Bu değer AF-DX 116'nın tavşan vas deferensinde (7.4) sıçan sol atriyumunda (7.0) ve kobay atriyumunda (7.2) M_2 için hesaplanmış olan pK_B değerine yakın değildir [92, 96]. Ayrıca tavşan vas deferensinde M_1 için (6.85) hesaplanan pK_B değeri ile de uyumlu değildir [92]. Diğer taraftan domuz miyometriyumunda (5.96), sıçan mesanesinde (6.32), kobay mesanesinde (6.24) ve kobay trakeasında (6.24) AF-DX 116'nın M_3 için hesaplanan pK_B değerlerine yakın bulunmuştur [34, 97-99].

Çalışmamızda selektif muskarinik M_3 reseptör antagonisti olarak darifenasin kullanılmıştır. Darifenasin için koaksiyel biyoessey sistemde hesaplanan pK_B değeri 9.36 ± 0.11 'dir. Bu değer darifenasinin kobay mesanesinde M_3 için hesaplanmış olan pK_B değeri (9.31) [100] ve literatürde M_3 alt-tipi için belirtilmiş olan diğer değerlerle uyumludur (9.4) [23]. Bunun yanısıra darifenasinin M_1 ve M_2 muskarinik reseptör alt-tipleri için hesaplanan pK_B değerleri sırası ile 7.9 ve 6.9'dur. Bu değerler deneylerimizde hesapladığımız pK_B değeri ile uyumlu değildir [20, 23].

4-DAMP, M_1 ve M_3 muskarinik reseptör alt-tiplerine yüksek afinite göstermektedir ve antagonist profili $M_3 > M_1 \geq M_4 > M_2$ şeklindedir [23]. Deneylerimizde bu antagonist için pK_B değeri 9.30 ± 0.11 olarak hesaplanmıştır. Bu değer daha önceki çalışmalarda sıçan mesanesi (9.12) ve tavşan mesanesi (9.2) için hesaplanan pK_B değerlerine yakındır (26,5). Ayrıca bu değer literatürde 4-DAMP'ın M_1 (8.6-9.2) ve M_4 (8.4-9.4) için belirtilmiş olan pK_B değerleri ile de uyumludur ancak M_2 (7.8-8.4) ile uyumlu değildir [20].

Tropikamid'in muskarinik reseptörler üzerindeki antagonist profili $M_4 > M_3 \geq M_2 > M_1$ şeklindedir ve genellikle M_4 alt-tipini karakterize etmek için kullanılır. Çalışmamızda tropikamid için hesaplanan pK_B değeri 6.63 ± 0.17 'tür. Bu değer tropikamidin M_4 reseptörü için literatürde belirtilen pK_B değerlerine 7.54-8.13 yakın değildir [101-103].

Selektif olmayan muskarinik reseptör antagonisti atropin ile yapılan deneyler sonucunda bu antagonist için hesaplanan pK_B değeri 9.20 ± 0.10 'dir. Bu değer atropinin farklı muskarinik reseptör alt-tipleri için literatürde yer alan pK_B değerleri ile uyumludur [20].

Çalışmamızda farklı muskarinik reseptör antagonistleri ile hesapladığımız pK_B değerlerini literatürle karşılaştırdığımızda, bulgularımız mesane kaynaklı gevşetici faktörün saliverilmesinde M_1 ve M_3 reseptörlerinin rolü olduğunu düşündürmektedir. M_1 reseptör agonisti McN-A-343 ile yapılan deneyler de M_1 muskarinik reseptörünün katkısını desteklemektedir. Koaksiyel biyoessey sistemde elde edilen gevşeme yanıtlarında McN-A-343'ün potansi asetilkolin ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. McN-A-

343'ün M_1 alt-tipine karşı yüksek afinite gösterdiği bilinmektedir [104, 105]. M_1 muskarinik reseptör alt-tipi mesanedeki kolinerjik sinir uçlarında bulunmakta fasilitatör olarak transmitter salıverilmesini regüle etmektedir [25]. Dolayısıyla koaksiyel biyoessey sistemde McN-A-343 mesanedeki M_1 reseptörlerini aktive ederek endojen asetilkolinin salıverilmesine aracılık etmekte ve asetilkolin de mesane kaynaklı gevşetici faktör salıverilmesine neden olmaktadır.

Endojen asetilkolinin gevşetici faktör salıverilmesindeki etkinliğini araştırmak için asetilkolinesteraz inhibitörü fizostigminin de koaksiyel biyoessey sistemdeki etkileri incelendi. Mesane ile çevrelenmiş anokoksigeus kasında fenilefrin ile ön-kasılma sonrası tek konsantrasyonda fizostigmin uygulanması yavaş gelişen ve daha uzun süren bir gevşeme yanıtı oluşturdu. Fizostigmin asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek kolinerjik sinir ucunda endojen asetilkolinin miktarını artırmaktadır [32]. Fizostigmin yanıtınınin atropin ile bloke olması bu gevşemede muskarinik reseptörlerin rolü olduğunu göstermektedir. Bu bulgu ile birlikte mesane uzaklaştırıldığında fizostigminin gevşeme oluşturmaması da koaksiyel bioessey sistemde mesane kaynaklı gevşetici faktör salıverilmesine endojen asetilkolinin neden olabildiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda mesane kaynaklı gevşetici faktörün salıverilmesinde ve/veya gevşetici etkisinde rol oynayan ikinci ulakları incelemek için adenilat siklaz, guanilat siklaz, protein kinaz A ve protein kinaz C'nin rolleri araştırılmıştır. Adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 ve protein kinaz A inhibitörü KT-5720 koaksiyel biyoessey sistemde asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarını anlamlı bir şekilde inhibe ederken guanilat siklaz inhibitörü ODQ ve protein kinaz C inhibitörü H-7 bu yanıtları etkilememiştir. Bu bulgu deney sistemimizde elde ettiğimiz gevşeme yanıtlarında adenilat siklaz-protein kinaz A yolağının rol oynadığını göstermektedir. Koaksiyel biyoessey sistem donör ve essey doku olarak iki kısımdan oluştuğu için bu yolak hem mesane kaynaklı gevşetici faktörün salıverilmesinde hem de essey doku üzerinde oluşturduğu gevşeme yanıtında rol oynuyor olabilir. Fovaeus ve diğerleri [5], kendi çalışmalarında kullandıkları essey doku olan

endotelsiz sıçan torasik aorta striplerinde cAMP ve cGMP düzeylerini radyoimmünoessey ile ölçmüşler ve gevşeme sırasında düzeylerinde anlamlı bir değişiklik bulamamışlardır. Bu bulgu düşünüldüğünde adenilat siklaz ve protein kinaz A'nın mesane kaynaklı gevşetici faktörün oluşturduğu gevşetici etkide değil, bu faktörün saliverilmesinde rol oynadığı ileri sürülebilir. Adenilat siklaz stimülasyonunun protein kinaz A aktivasyonu ile tetrodotoksine rezistan sodyum kanallarının fonksiyonunu modüle ettiği bildirilmiştir [106, 107]. Mesanedeki afferent nöronların birçoğunda tetrodotoksine rezistan sodyum akımları bulunmaktadır [108]. Daha önceki çalışmamızda mesane kaynaklı gevşetici faktörün saliverilmesinin mesanedeki intramural nöronlarda bulunan tetrodotoksine rezistan sodyum kanalları aracılığı ile olabileceği ileri sürülmüştür [7]. Dolayısıyla adenilat siklaz-protein kinaz A yolağının koaksiyel biyoessey sistemdeki gevşeme yanıtlarına olan katkısı daha önceki bulgularımızla örtüşmektedir.

Mesane kaynaklı gevşetici faktörün saliverilmesinin muskarinik reseptör stimülasyonu sonucu olduğu ve bu olaydan sorumlu olan alt-tiplerin M_1 ve M_3 olduğu düşünüldüğünde bu faktör spesifik olarak muskarinik reseptör stimülasyonuna değil mesanenin kasılmasına karşı bir yanıt olarak da saliverilebilir. Bu hipotezi test etmek için detrusör kasında muskarinik stimülasyondan farklı olarak pürinerjik P2X reseptörlerini uyararak kasılma oluşturan [109] α,β -metilen ATP'nin koaksiyel biyoessey sistemdeki etkileri incelendi. α,β -metilen ATP koaksiyel biyoessey sistemde konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtı oluşturdu. Bu gevşeme yanıtı P2 reseptör antagonisti PPADS varlığında inhibe oldu. Bu bulgu muskarinik reseptörlerin aktivasyonuna benzer şekilde P2X aktivasyonu ile de bu faktörün saliverilebileceğini göstermektedir. Asetilkolin yanıtlarına benzer şekilde adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 ve protein kinaz A inhibitörü KT-5720 α,β -metilen ATP ile elde edilen gevşeme yanıtlarını da inhibe etmiştir. Bu sonuçlar adenilat siklaz-protein kinaz A yolağının mesane kaynaklı gevşetici faktör yanıtlarındaki rolünü desteklemektedir.

Adenilat siklaz ve protein kinaz A inhibitörleri varlığında gözlenen inhibisyonun mesane kasılmasının inhibisyonuna bağlı olarak gelişip

gelişmediğini incelemek için sıçan mesane striplerinde asetilkolin ve α,β -metilen ATP ile elde edilen kasılma yanıtlarında bu maddelerin etkileri incelendi. Adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 ve protein kinaz A inhibitörü KT-5720 mesane striplerindeki kasılma yanıtlarını etkilemedi. Dolayısıyla adenilat siklaz-protein kinaz A yolağının detrusörün kasılmasında önemli bir katkısı yoktur. Bu bulgu adenilat siklaz ve protein kinaz A inhibitörlerinin koaksiyel biyoessey sistemde oluşturdukları inhibisyonun detrusörün kasılmasının inhibisyonu ile değil mesane kaynaklı gevşetici faktörün salıverilmesinin inhibisyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ VE YORUM

Koaksiyel biyoessey sistemi ile saptanabilen mesane kaynaklı gevşetici faktör mesanedeki afferent nöronlarda bulunan peptidlerden biri ya da bir pürinerjik mediyatör değildir. Bu faktörün muskarinik reseptör stimülasyonu ile salıverilmesine M_1 - ve M_3 -muskarinik reseptörler aracılık etmekte ve adenilat siklaz-protein kinaz A yolağı bu faktörün salıverilmesi ya da oluşturduğu gevşetici etkide rol oynamaktadır. Endojen asetilkolin mesane kaynaklı gevşetici faktör salıverilmesi için yeterlidir. Asetilkolinin yanısıra mesanede kasılma oluşturan α, β -metilen ATP ile de koaksiyel biyoessey sistemde yanıt alınabilmesi bu faktörün salıverilmesinin mesane kasılması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Tüm bu bulgular mesane kaynaklı gevşetici faktörün mesanenin dolumu sırasında detrüsrün tonusunun düzenlenmesinde bir kompensatuar mekanizma olarak çalışabileceğini dolayısıyla da bu faktörün fizyolojik önemi olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Klevmark, B. (1977). Motility of the urinary bladder in cats during filling at physiological rates. II. Effects of extrinsic bladder denervation on intramural tension and on intravesical pressure patterns. *Acta Physiol Scand*, 101 (2), 176-184.
2. Anderson, K. E. (1993). Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev*, 45 (3), 253-308.
3. Maggi, C. A. (1992). Prostanoids as local modulators of reflex micturition. *Pharmacol Res*, 25 (1), 13-20.
4. Morrison, J., Wen, J. ve Kibble, A. (1999). Activation of pelvic afferent nerves from the rat bladder during filling. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 201, 73-75.
5. Fovaeus, M., Fujiwara, M., Hogestatt, E. D., Persson, K. ve Andersson, K. E. (1999). A non-nitroergic smooth muscle relaxant factor released from rat urinary bladder by muscarinic receptor stimulation. *J Urol*, 161 (2), 649-653.
6. Inci, K., Ismailoglu, U. B., Sahin, A., Sungur, A. ve Sahin-Erdemli, I. (2003). The effect of inflammation on rat urinary bladder-dependent relaxation in coaxial bioassay system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 367 (5), 547-552.
7. Bozkurt, T. E. ve Sahin-Erdemli, I. (2004). Evaluation of the rat bladder-derived relaxant factor by coaxial bioassay system. *Eur J Pharmacol*, 495 (2-3), 193-199.
8. de Groat, W. C. ve Yoshimura, N. (2001). Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 691-721.
9. Apodaca, G. (2004). The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic*, 5 (3), 117-128.
10. Andersson, K. E. (2002). Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology*, 59 (5 Suppl 1), 43-50.

11. Andersson, K. E. ve Arner, A. (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 84 (3), 935-986.
12. Andersson, K. E. ve Wein, A. J. (2004). Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev*, 56 (4), 581-631.
13. Gosling, J. A. ve Dixon, J. S. (1974). Sensory nerves in the mammalian urinary tract. An evaluation using light and electron microscopy. *J Anat*, 117 (Pt 1), 133-144.
14. Gabella, G. ve Davis, C. (1998). Distribution of afferent axons in the bladder of rats. *J Neurocytol*, 27 (3), 141-155.
15. Janig, W. ve Morrison, J. F. (1986). Functional properties of spinal visceral afferents supplying abdominal and pelvic organs, with special emphasis on visceral nociception. *Prog Brain Res*, 67, 87-114.
16. Habler, H. J., Janig, W. ve Koltzenburg, M. (1990). Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J Physiol*, 425, 545-562.
17. Fall, M., Lindstrom, S. ve Mazieres, L. (1990). A bladder-to-bladder cooling reflex in the cat. *J Physiol*, 427, 281-300.
18. Nomiya, M. ve Yamaguchi, O. (2003). A quantitative analysis of mRNA expression of alpha 1 and beta-adrenoceptor subtypes and their functional roles in human normal and obstructed bladders. *J Urol*, 170 (2 Pt 1), 649-653.
19. Dixon, J. S., Jen, P. Y. ve Gosling, J. A. (2000). The distribution of vesicular acetylcholine transporter in the human male genitourinary organs and its co-localization with neuropeptide Y and nitric oxide synthase. *Neurourol Urodyn*, 19 (2), 185-194.
20. Caulfield, M. P. ve Birdsall, N. J. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev*, 50 (2), 279-290.
21. Sigala, S., Mirabella, G., Peroni, A., Pezzotti, G., Simeone, C., Spano, P. ve diğeri. (2002). Differential gene expression of cholinergic

- muscarinic receptor subtypes in male and female normal human urinary bladder. *Urology*, 60 (4), 719-725.
22. Yamaguchi, O., Shishido, K., Tamura, K., Ogawa, T., Fujimura, T. ve Ohtsuka, M. (1996). Evaluation of mRNAs encoding muscarinic receptor subtypes in human detrusor muscle. *J Urol*, 156 (3), 1208-1213.
 23. Eglen, R. M., Hegde, S. S. ve Watson, N. (1996). Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev*, 48 (4), 531-565.
 24. Hegde, S. S. ve Eglen, R. M. (1999). Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. *Life Sci*, 64 (6-7), 419-428.
 25. Chess-Williams, R. (2002). Muscarinic receptors of the urinary bladder: detrusor, urothelial and prejunctional. *Auton Autacoid Pharmacol*, 22 (3), 133-145.
 26. Hegde, S. S., Choppin, A., Bonhaus, D., Briaud, S., Loeb, M., Moy, T. M.ve diğ erleri. (1997). Functional role of M2 and M3 muscarinic receptors in the urinary bladder of rats in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 120 (8), 1409-1418.
 27. Kotlikoff, M. I., Herrera, G. ve Nelson, M. T. (1999). Calcium permeant ion channels in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 134, 147-199.
 28. Bonev, A. D. ve Nelson, M. T. (1993). ATP-sensitive potassium channels in smooth muscle cells from guinea pig urinary bladder. *Am J Physiol*, 264 (5 Pt 1), C1190-1200.
 29. Nakamura, T., Kimura, J. ve Yamaguchi, O. (2002). Muscarinic M2 receptors inhibit Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat bladder smooth muscle. *Int J Urol*, 9 (12), 689-696.
 30. Krichevsky, V. P., Pagala, M. K., Vaydovsky, I., Damer, V. ve Wise, G. J. (1999). Function of M3 muscarinic receptors in the rat urinary bladder following partial outlet obstruction. *J Urol*, 161 (5), 1644-1650.

31. Tobin, G. ve Sjogren, C. (1995). In vivo and in vitro effects of muscarinic receptor antagonists on contractions and release of [3H]acetylcholine in the rabbit urinary bladder. *Eur J Pharmacol*, 281 (1), 1-8.
32. Somogyi, G. T. ve de Groat, W. C. (1992). Evidence for inhibitory nicotinic and facilitatory muscarinic receptors in cholinergic nerve terminals of the rat urinary bladder. *J Auton Nerv Syst*, 37 (2), 89-97.
33. Alberts, P. (1995). Classification of the presynaptic muscarinic receptor subtype that regulates 3H-acetylcholine secretion in the guinea pig urinary bladder in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 274 (1), 458-468.
34. D'Agostino, G., Barbieri, A., Chiossa, E. ve Tonini, M. (1997). M4 muscarinic autoreceptor-mediated inhibition of -3H-acetylcholine release in the rat isolated urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther*, 283 (2), 750-756.
35. D'Agostino, G., Bolognesi, M. L., Lucchelli, A., Vicini, D., Balestra, B., Spelta, V.ve diğerleri. (2000). Prejunctional muscarinic inhibitory control of acetylcholine release in the human isolated detrusor: involvement of the M4 receptor subtype. *Br J Pharmacol*, 129 (3), 493-500.
36. Hawthorn, M. H., Chapple, C. R., Cock, M. ve Chess-Williams, R. (2000). Urothelium-derived inhibitory factor(s) influences on detrusor muscle contractility in vitro. *Br J Pharmacol*, 129 (3), 416-419.
37. Gosling, J. A., Dixon, J. S. ve Jen, P. Y. (1999). The distribution of noradrenergic nerves in the human lower urinary tract. A review. *Eur Urol*, 36 Suppl 1, 23-30.
38. Goepel, M., Wittmann, A., Rubben, H. ve Michel, M. C. (1997). Comparison of adrenoceptor subtype expression in porcine and human bladder and prostate. *Urol Res*, 25 (3), 199-206.
39. Amark, P., Nergardh, A. ve Kinn, A. C. (1986). The effect of noradrenaline on the contractile response of the urinary bladder. An in vitro study in man and cat. *Scand J Urol Nephrol*, 20 (3), 203-207.

40. Seguchi, H., Nishimura, J., Zhou, Y., Niuro, N., Kumazawa, J. ve Kanaide, H. (1998). Expression of beta3-adrenoceptors in rat detrusor smooth muscle. *J Urol*, 159 (6), 2197-2201.
41. Fujimura, T., Tamura, K., Tsutsumi, T., Yamamoto, T., Nakamura, K., Koibuchi, Y.ve diğeri. (1999). Expression and possible functional role of the beta3-adrenoceptor in human and rat detrusor muscle. *J Urol*, 161 (2), 680-685.
42. Li, J. H., Yasay, G. D. ve Kau, S. T. (1992). Beta-adrenoceptor subtypes in the detrusor of guinea-pig urinary bladder. *Pharmacology*, 44 (1), 13-18.
43. Yamamoto, Y., Mori, A. ve Koike, K. (1998). Beta-adrenoceptors in the detrusor of guinea pig bladder. *J Smooth Muscle Res*, 34 (5-6), 233-242.
44. Andersson, K. E. (1986). Clinical relevance of some findings in neuro-anatomy and neurophysiology of the lower urinary tract. *Clin Sci (Lond)*, 70 Suppl 14, 21s-32s.
45. Hoyle, C. H., Chapple, C. ve Burnstock, G. (1989). Isolated human bladder: evidence for an adenine dinucleotide acting on P2X-purinoceptors and for purinergic transmission. *Eur J Pharmacol*, 174 (1), 115-118.
46. Husted, S., Sjogren, C. ve Andersson, K. E. (1983). Direct effects of adenosine and adenine nucleotides on isolated human urinary bladder and their influence on electrically induced contractions. *J Urol*, 130 (2), 392-398.
47. Hardy, L. A., Harvey, I. J., Chambers, P. ve Gillespie, J. I. (2000). A putative alternatively spliced variant of the P2X(1) purinoreceptor in human bladder. *Exp Physiol*, 85 (4), 461-463.
48. James, M. J., Birmingham, A. T. ve Hill, S. J. (1993). Partial mediation by nitric oxide of the relaxation of human isolated detrusor strips in response to electrical field stimulation. *Br J Clin Pharmacol*, 35 (4), 366-372.

49. Theobald, R. J., Jr. (1996). The effect of NG-monomethyl-L-arginine on bladder function. *Eur J Pharmacol*, 311 (1), 73-78.
50. Moon, A. (2002). Influence of nitric oxide signalling pathways on pre-contracted human detrusor smooth muscle in vitro. *BJU Int*, 89 (9), 942-949.
51. Maggi, C. A. (1995). The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol*, 26 (5), 911-944.
52. Lecci, A. ve Maggi, C. A. (2001). Tachykinins as modulators of the micturition reflex in the central and peripheral nervous system. *Regul Pept*, 101 (1-3), 1-18.
53. Dion, S., Corcos, J., Carmel, M., Drapeau, G. ve Regoli, D. (1988). Substance P and neurokinins as stimulants of the human isolated urinary bladder. *Neuropeptides*, 11 (2), 83-87.
54. Birder, L. A., Nakamura, Y., Kiss, S., Nealen, M. L., Barrick, S., Kanai, A. J.ve diğeri. (2002). Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci*, 5 (9), 856-860.
55. Cruz, F. (2002). Vanilloid receptor and detrusor instability. *Urology*, 59 (5 Suppl 1), 51-60.
56. Silva, C., Ribeiro, M. J. ve Cruz, F. (2002). The effect of intravesical resiniferatoxin in patients with idiopathic detrusor instability suggests that involuntary detrusor contractions are triggered by C-fiber input. *J Urol*, 168 (2), 575-579.
57. Burcher, E., Zeng, X. P., Strigas, J., Shang, F., Millard, R. J. ve Moore, K. H. (2000). Autoradiographic localization of tachykinin and calcitonin gene-related peptide receptors in adult urinary bladder. *J Urol*, 163 (1), 331-337.
58. Maggi, C. A., Giuliani, S., Del Bianco, E., Geppetti, P., Theodorsson, E. ve Santicioli, P. (1992). Calcitonin gene-related peptide in the regulation of urinary tract motility. *Ann N Y Acad Sci*, 657, 328-343.
59. Maggi, C. A., Giuliani, S., Santicioli, P., Abelli, L. ve Meli, A. (1987). Visceromotor responses to calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the rat lower urinary tract: evidence for a transmitter role in the

- capsaicin-sensitive nerves of the ureter. *Eur J Pharmacol*, 143 (1), 73-82.
60. Smet, P. J., Moore, K. H. ve Jonavicius, J. (1997). Distribution and colocalization of calcitonin gene-related peptide, tachykinins, and vasoactive intestinal peptide in normal and idiopathic unstable human urinary bladder. *Lab Invest*, 77 (1), 37-49.
61. Andersson, P. O., Bloom, S. R., Mattiasson, A. ve Uvelius, B. (1987). Bladder vasodilatation and release of vasoactive intestinal polypeptide from the urinary bladder of the cat in response to pelvic nerve stimulation. *J Urol*, 138 (3), 671-673.
62. Kinder, R. B. ve Mundy, A. R. (1985). Atropine blockade of nerve-mediated stimulation of the human detrusor. *Br J Urol*, 57 (4), 418-421.
63. Sjogren, C., Andersson, K. E. ve Mattiasson, A. (1985). Effects of vasoactive intestinal polypeptide on isolated urethral and urinary bladder smooth muscle from rabbit and man. *J Urol*, 133 (1), 136-140.
64. Cohen, M. L. (1990). Canine, but not rat bladder contracts to serotonin via activation of 5HT₂ receptors. *J Urol*, 143 (5), 1037-1040.
65. Saxena, P. R., Heiligers, J., Mylecharane, E. J. ve Tio, R. (1985). Excitatory 5-hydroxytryptamine receptors in the cat urinary bladder are of the M- and 5-HT₂-type. *J Auton Pharmacol*, 5 (2), 101-107.
66. Kodama, M. ve Takimoto, Y. (2000). Influence of 5-hydroxytryptamine and the effect of a new serotonin receptor antagonist (sarpogrelate) on detrusor smooth muscle of streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. *Int J Urol*, 7 (6), 231-235.
67. Kim, H. J., Lee, G., Kim, D. H., Lee, S. J., Yoon, D. K. ve Cho, J. H. (2002). Acute effects of serotonin on rat bladder contractility. *Urol Int*, 68 (1), 44-48.
68. Klarskov, P. ve Horby-Petersen, J. (1986). Influence of serotonin on lower urinary tract smooth muscle in vitro. *Br J Urol*, 58 (5), 507-513.
69. Holt, S. E., Cooper, M. ve Wyllie, J. H. (1986). On the nature of the receptor mediating the action of 5-hydroxytryptamine in potentiating

- responses of the mouse urinary bladder strip to electrical stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 334 (4), 333-340.
70. Messori, E., Rizzi, C. A., Candura, S. M., Lucchelli, A., Balestra, B. ve Tonini, M. (1995). 5-Hydroxytryptamine receptors that facilitate excitatory neuromuscular transmission in the guinea-pig isolated detrusor muscle. *Br J Pharmacol*, 115 (4), 677-683.
 71. Chen, H. I. (1990). Evidence for the presynaptic action of 5-hydroxytryptamine and the involvement of purinergic innervation in the rabbit lower urinary tract. *Br J Pharmacol*, 101 (1), 212-216.
 72. Barras, M., Van der Graaf, P. H. ve Angel, I. (1996). Characterisation of the 5-HT receptor potentiating neurotransmission in rabbit bladder. *Eur J Pharmacol*, 318 (2-3), 425-428.
 73. Sellers, D. J., Chess-Williams, R. ve Chapple, C. R. (2000). 5-Hydroxytryptamine-induced potentiation of cholinergic responses to electrical field stimulation in pig detrusor muscle. *BJU Int*, 86 (6), 714-718.
 74. Corsi, M., Pietra, C., Toson, G., Trist, D., Tuccitto, G. ve Artibani, W. (1991). Pharmacological analysis of 5-hydroxytryptamine effects on electrically stimulated human isolated urinary bladder. *Br J Pharmacol*, 104 (3), 719-725.
 75. Tonini, M., Messori, E., Franceschetti, G. P., Rizzi, C. A., Castoldi, A. F., Coccini, T. ve diğeri. (1994). Characterization of the 5-HT receptor potentiating neuromuscular cholinergic transmission in strips of human isolated detrusor muscle. *Br J Pharmacol*, 113 (1), 1-2.
 76. Fredericks, C. M. (1975). Characterization of the rabbit detrusor response to histamine through pharmacologic antagonism. *Pharmacology*, 13 (1), 5-11.
 77. Azadzoï, K. M., Shinde, V. M., Tarcan, T., Kozłowski, R. ve Siroky, M. B. (2003). Increased leukotriene and prostaglandin release, and overactivity in the chronically ischemic bladder. *J Urol*, 169 (5), 1885-1891.

78. Bjorling, D. E., Saban, M. R., Bruskewitz, R. C. ve Saban, R. (1994). Response of the isolated guinea pig bladder to exogenous and endogenous leukotrienes. *J Urol*, 152 (4), 1281-1286.
79. Viggiano, J. M., Chaud, M. A., Gimeno, M. F. ve Gimeno, A. L. (1985). On the inotropic effects of leukotrienes in the isolated urinary bladder of guinea pigs and rats. *Prostaglandins Leukot Med*, 20 (1), 89-97.
80. Bouchelouche, K., Horn, T., Nordling, J., Larsen, S. ve Hald, T. (2001). The action of cysteinyl-leukotrienes on intracellular calcium mobilization in human detrusor myocytes. *BJU Int*, 87 (7), 690-696.
81. Furchgott, R. F., *The classification of adrenoceptors (adrenergic receptor). An evaluation from the standpoint of receptor theory.*, in *Handbook of Experimental Pharmacology*, E. Blaschko H. & Muscholl, Editor. 1972, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 283-335.
82. Ilhan, M. ve Sahin, I. (1986). Tracheal epithelium releases a vascular smooth muscle relaxant factor: demonstration by bioassay. *Eur J Pharmacol*, 131 (2-3), 293-296.
83. Andersson, P. O., Andersson, K. E., Fahrenkrug, J., Mattiasson, A., Sjogren, C. ve Uvelius, B. (1988). Contents and effects of substance P and vasoactive intestinal polypeptide in the bladder of rats with and without infravesical outflow obstruction. *J Urol*, 140 (1), 168-172.
84. Erol, K., Ulak, G., Donmez, T., Cingi, M. I., Alpan, R. S. ve Ozdemir, M. (1992). Effects of vasoactive intestinal polypeptide on isolated rat urinary bladder smooth muscle. *Urol Int*, 49 (3), 151-153.
85. Finkbeiner, A. E. (1983). In vitro effects of vasoactive intestinal polypeptide on guinea pig urinary bladder. *Urology*, 22 (3), 275-277.
86. Igawa, Y., Persson, K., Andersson, K. E., Uvelius, B. ve Mattiasson, A. (1993). Facilitatory effect of vasoactive intestinal polypeptide on spinal and peripheral micturition reflex pathways in conscious rats with and without detrusor instability. *J Urol*, 149 (4), 884-889.
87. Burnstock, G., Dumsday, B. ve Smythe, A. (1972). Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *Br J Pharmacol*, 44 (3), 451-461.

88. Acevedo, C. G., Contreras, E., Escalona, J., Lewin, J. ve Huidobro-Toro, J. P. (1992). Pharmacological characterization of adenosine A1 and A2 receptors in the bladder: evidence for a modulatory adenosine tone regulating non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission. *Br J Pharmacol*, 107 (1), 120-126.
89. Somogyi, G. T., Tanowitz, M. ve de Groat, W. C. (1994). M1 muscarinic receptor-mediated facilitation of acetylcholine release in the rat urinary bladder. *J Physiol*, 480 (Pt 1), 81-89.
90. Tobin, G. ve Sjogren, C. (1998). Prejunctional facilitatory and inhibitory modulation of parasympathetic nerve transmission in the rabbit urinary bladder. *J Auton Nerv Syst*, 68 (3), 153-156.
91. Lazareno, S., Buckley, N. J. ve Roberts, F. F. (1990). Characterization of muscarinic M4 binding sites in rabbit lung, chicken heart, and NG108-15 cells. *Mol Pharmacol*, 38 (6), 805-815.
92. Eltze, M. (1988). Assessment of selectivity of muscarinic antagonists for M1 and M2 receptors in rabbit isolated vas deferens. *Pharmacology*, 37 Suppl 1, 40-47.
93. Eltze, M., Gonne, S., Riedel, R., Schlotke, B., Schudt, C. ve Simon, W. A. (1985). Pharmacological evidence for selective inhibition of gastric acid secretion by telenzepine, a new antimuscarinic drug. *Eur J Pharmacol*, 112 (2), 211-224.
94. Giachetti, A., Micheletti, R. ve Montagna, E. (1986). Cardiosensitive profile of AF-DX 116, a muscarinic M2 receptor antagonist. *Life Sci*, 38 (18), 1663-1672.
95. Dorje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E. ve Brann, M. R. (1991). Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 256 (2), 727-733.
96. Hulme, E. C., Birdsall, N. J. ve Buckley, N. J. (1990). Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 30, 633-673.
97. Kitazawa, T., Uchiyama, F., Hirose, K. ve Taneike, T. (1999). Characterization of the muscarinic receptor subtype that mediates the

- contractile response of acetylcholine in the swine myometrium. *Eur J Pharmacol*, 367 (2-3), 325-334.
98. Dorofeeva, N. A., Shelkovnikov, S. A., Starshinova, L. A., Danilov, A. F., Nedoma, J. ve Tucek, S. (1992). Quest for agonist and antagonist selectivity at muscarinic receptors in guinea-pig smooth muscles and cardiac atria. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 346 (4), 383-390.
99. Wang, P., Luthin, G. R. ve Ruggieri, M. R. (1995). Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. *J Pharmacol Exp Ther*, 273 (2), 959-966.
100. Nelson, C. P., Gupta, P., Napier, C. M., Nahorski, S. R. ve Challiss, R. A. (2004). Functional selectivity of muscarinic receptor antagonists for inhibition of M3-mediated phosphoinositide responses in guinea pig urinary bladder and submandibular salivary gland. *J Pharmacol Exp Ther*, 310 (3), 1255-1265.
101. Doods, H. N., Willim, K. D., Boddeke, H. W. ve Entzeroth, M. (1993). Characterization of muscarinic receptors in guinea-pig uterus. *Eur J Pharmacol*, 250 (2), 223-230.
102. Lazareno, S. ve Birdsall, N. J. (1993). Pharmacological characterization of acetylcholine-stimulated [35S]-GTP gamma S binding mediated by human muscarinic m1-m4 receptors: antagonist studies. *Br J Pharmacol*, 109 (4), 1120-1127.
103. Dei, S., Bellucci, C., Ghelardini, C., Romanelli, M. N. ve Spampinato, S. (1996). Synthesis, characterization and pharmacological profile of tropicamide enantiomers. *Life Sci*, 58 (23), 2147-2153.
104. Hammer, R. ve Giachetti, A. (1982). Muscarinic receptor subtypes: M1 and M2 biochemical and functional characterization. *Life Sci*, 31 (26), 2991-2998.
105. Eglen, R. M., Kenny, B. A., Michel, A. D. ve Whiting, R. L. (1987). Muscarinic activity of McN-A-343 and its value in muscarinic receptor classification. *Br J Pharmacol*, 90 (4), 693-700.

106. England, S., Bevan, S. ve Docherty, R. J. (1996). PGE₂ modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol*, 495 (Pt 2), 429-440.
107. Fitzgerald, E. M., Okuse, K., Wood, J. N., Dolphin, A. C. ve Moss, S. J. (1999). cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. *J Physiol*, 516 (Pt 2), 433-446.
108. Yoshimura, N. (1999). Bladder afferent pathway and spinal cord injury: possible mechanisms inducing hyperreflexia of the urinary bladder. *Prog Neurobiol*, 57 (6), 583-606.
109. Ralevic, V. ve Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50 (3), 413-492.

EK

BU TEZ ÇALIŞMASI İLE İLGİLİ YAYINLAR VE BİLDİRİLER

Yayınlar:

1. Bozkurt T.E., Sahin-Erdemli I. (2008). Rat urinary bladder-derived relaxant factor: studies on its nature and release by coaxial bioassay system, *Eur J Pharmacol.* Sep 4;591(1-3):273-279.
2. Bozkurt T.E., Sahin-Erdemli I. (2009). M₁ and M₃ muscarinic receptors are involved in the release of urinary bladder-derived relaxant factor, *Pharmacol Res.* May;59(5):300-305.

Bildiriler:

1. Bozkurt T.E., Şahin-Erdemli İ. Sıçan mesanesinden düz kas gevşetici faktör salıverilmesinde rol oynayan muskarinik reseptör alttıplerinin araştırılması., Türk Farmakoloji Derneği, 18. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 28 Eylül-1 Ekim, İzmir, 2005.
2. Bozkurt, T.E., Sahin-Erdemli, I. Muscarinic receptor subtypes mediating the release of urinary bladder-derived relaxant factor. Lifesciences 2007, First joint meeting of The Biochemical Society, The British Pharmacological Society and The Physiological Society, Glasgow, UK, 8-12 July, 2007.
3. Bozkurt, T.E., Sahin-Erdemli, I. Rat urinary bladder-derived relaxant factor: studies on its nature, release and relaxant effect by coaxial bioassay system. ICS 2007, 37th Annual Meeting of the International Continence Society, Rotterdam, The Netherlands, 20-24 August, 2007.

4. Bozkurt T.E., Şahin-Erdemli İ. “Mesane kaynaklı gevşetici faktörün yapısının, salıverilmesinin ve gevşetici etki mekanizmasının araştırılması”. Türk Farmakoloji Derneği, 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 24-27 Ekim Trabzon, 2007.