

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ DIABETİK
SIÇAN MESANESİNDE ELEKTRİKSEL ALAN
STİMÜLASYONUNA ARTMIŞ KASILMA YANITINDA
SEROTONİN VE SEROTONİN AGONİSTLERİNİN
ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Mukaddes GÜMÜŞTEKİN

79953

Tez Danışmanı
Doç.Dr.Sedef GİDENER

Mart 1999
İZMİR

79953

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanması ve yürütülmesi sırasında yardım ve katkılarını gördüğüm tez danışmanım Doç.Dr.Sedef Gidener'e; uzmanlık eğitimime katkılarından dolayı Prof.Dr.Hülya Güven'e, Doç.Dr.Yeşim Tunçok'a, Yard.Doç.Dr.Ayşe Gelal'a, Yard.Doç.Dr.Şule Kalkan'a; tezimdeki şekillerin hazırlanmasında yardımcı olan Dr. Selim Arslan ve Dr. Taylan Benker'e; benden manevi desteklerini esirgemeyen Dr. Tuğba Elmas'a, Dt. Nergis Murat'a, Dr. Hakan Akdağ'a, Dr. Ayşe Erdoğan'a ve Dr. Saib Tiryakioğlu'na ve diğer tüm farmakoloji çalışanlarına teşekkür ederim.

Dr. Mukaddes Gümüştekin

İÇİNDEKİLER

I.	GİRİŞ VE AMAÇ	1-3
II.	GENEL BİLGİLER	
III.	Reseptör kavramı	4-8
	A. Agonist ilaç	8
	B. Diabetes Mellitus	8-23
	a. Etiyopatogenez	
	b. Komplikasyonları	
	c. Mesaneye etkisi	
	d. Deneysel diabet modelleri	
	D. Serotonin	23-41
	a. Tarihçesi	
	b. Kaynağı	
	c. Sentez ve salınımı	
	d. Metabolizması	
	e. Reseptörleri	
IV.	GEREÇ VE YÖNTEM	42-49
	A. Organ banyosu	
	B. Konsantrasyon-yanıt eğrileri	
	C. Araştırma yöntemi	
V.	BULGULAR	50-60
VI.	TARTIŞMA	61-63
VII.	SONUÇ	64
VIII.	ÖZET	65
IX.	KAYNAKLAR	66-76

I.GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus hipergliseminin yanısıra lipid ve protein metabolizması bozukluğunun da eşlik ettiği kısmi veya mutlak insülin eksikliği sendromudur. Kan glukozundaki yükseklik ve diğer biyokimyasal anormallikler, pankreasın beta hücrelerindeki yetmezliğin ve/veya hedef hücrelerde insüline karşı gelişen direncin sonucudur.

Diabetes mellitus, oldukça yaygın ancak hem değişik toplumlarda hem de aynı toplumun değişik kesimlerinde farklı yüzdelerde görülen herediter, sistemik, aynı zamanda sosyal ve ekonomik yönleri de ağır olan bir hastalıktır. Günümüzde diabetin heterojen bir hastalık olduğu, HLA sistemiyle hem oluşum yönünden hem de gelişen komplikasyonları yönünden ilişkisinin olduğu bilinmektedir (1-8). Diabetik komplikasyonlardan bazıları (nöropati, kardiyomyopati, anjiyopati ve nefropati gibi) morbidite ve mortaliteyi artırırken, bazıları da (gastroenteropati, mesane disfonksiyonu ve erektil empotans gibi) hastanın yaşam kalitesini etkilemektedir (2,9).

Deneysel diabetes mellitustaki ürodinamik değişiklikler, diabetik hastalardakine oldukça benzerdir. Miksiyon frekansı ve volümü artmıştır, dolmaya rağmen intravezikal basınç düşüktür. Dolma ile indüklenen intravezikal kasılmaların amplitüdü azalmıştır (10,11).

Serotonin (5-Hidroksitriptamin, 5-HT), vücutta yaygın olarak bulunan endojen nöromedyatörlerden biri olup, santral sinir sistemi ve periferde önemli ve çeşitli fonksiyonları vardır. 5-HT'nin izole fare mesanesinde 5-HT_{1B} ve 5-HT₂ reseptörleri ile kasıcı etki gösterdiği (12,13) ve insan

mesanesinde ise düşük konsantrasyonda atipik bir reseptör aracılığıyla kasılmada potansiyalizasyona, yüksek konsantrasyonda ise 5-HT_{1benzeri} reseptörler aracılığıyla inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (14). 5-HT mesane kasılmasını, hem gangliyonik hem de postgangliyonik düzeyde potansiyalize etmektedir (15). Tavşan ve insan mesane dokusunda, 5-HT kavşak öncesi asetilkolin salınımını arttırarak kasılma cevabını arttırmaktadır. Bu etkinin, atipik 5-HT reseptörleri (14) ve 5-HT₄ reseptörleri (16) aracılığıyla olabileceği ileri sürülmüştür.

İzole mesane şeritlerinde, elektriksel alan stimülasyonuna (EAS) verilen kasılma cevabı, kısmen de olsa kolinerjik ve pürinerjik sinirlerin stimülasyonu sonucudur (10,17,18). Diabetik sıçan mesanesinde, EAS'na verilen kolinerjik cevab artmış olarak gözlenirken, nonadrenerjik nonkolinerjik cevap azalmıştır (10).

Son yapılan çalışmalarda, izole insan detrusor kasında 5-HT₄ reseptör agonistleri olan benzamid (sisaprid, zacoprid) ve benzimidazon deriveleri (BIMU 8)'nin kolinerjik transmisyonunu potansiyalize ettiği gösterilmiştir. Böylece kolinerjik sinirlerin azaldığı aging mesane durumu veya nöropatik/nonnöropatik kaynaklı detrusor yetmezliğinde görülen miksiyon bozukluklarında, 5-HT₄ reseptör agonistlerinin kullanılabileceği bildirilmiştir (16,19).

Diabetik nöropatiye bağlı mesane disfonksiyonun tedavisinde 5-HT agonist ve antagonistlerinin yer alabilmesi için, 5-HT'nin bu sistem üzerindeki fonksiyonlarının ayrıntılı olarak bilinmesi gerekmektedir. 5-HT'nin, mesanedeki farmakolojik etkilerine ışık tutabilmesi düşüncesinden yola çıkarak planlanan bu çalışmada, izole sıçan mesanesinde 5-HT etkisi, etkisine aracılık eden reseptörlerin tanımlanması ve diabet gibi

mesane disfonksiyonuna neden bir durumda etkisinde meydana gelebilecek değişiklikler araştırılmak istenmiştir.



II.GENEL BİLGİLER

A.RESEPTÖR KAVRAMI

a) Reseptör nedir ?

Gelişmiş organizmalardaki tüm hücreler, çevreleri ile bilgi alışverişi yapabilme yeteneğine sahiptir. Hormonlar, nörotransmitterler, çeşitli kimyasallar, büyüme faktörleri, ısı ve ışık gibi fiziksel uyarılar özelleşmiş hedef hücreleri uyarak yanıt oluştururlar. Yanıtın oluşmasında öncelikle bu uyarıları seçici olarak tanıma yeteneğine sahip spesifik moleküller rol oynar. Hücrelerde belirli bir protein molekülünün özel bir kısmını oluşturan, çeşitli endojen etkin maddeleri (nöromediyatörler, hormonlar, lokal hormonlar ve sitokinler gibi) ve onlara yapıca benzeyen ilaçları seçici ve yüksek afiniteli bir şekilde, çok kısa süre bağlayan ve hücresel etkinin tetiklenmesinde aracılık eden bu molekül kısımlarına *reseptör* adı verilir. Reseptörlerin üç önemli özelliği; etkin ilaç ve diğer madde moleküllerini tanımaları, bu maddelerle reseptörün geçici olarak birleşmesi sonucu meydana gelen kimyasal sinyali biyolojik sinyale transdükmeleri ve bu sırada sinyali amplifiye etmeleridir (20).

b) Reseptörlerin izolasyonu

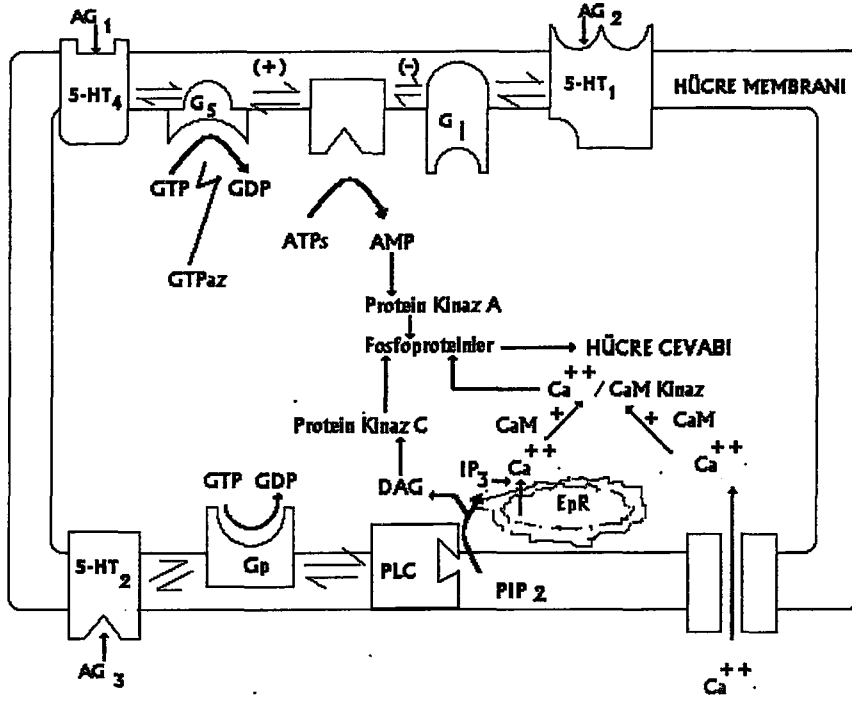
Reseptör tiplerinin ve alt tiplerinin belirlenmesinde ilk zamanlar, tüm hayvanda veya izole dokularda ilaçların yaptığı fonksiyonel değişmelerin karşılaştırılmasına dayanan farmakolojik (fonksiyonel) yöntemler kullanılmıştır. Daha sonraları radyoligand bağlama ve otoradyografi yöntemleri bu reseptörlerin belirlenmesi ile ilgili incelemeler arasına girmiştir. Bu yöntemlerle hücre homojenatlarında, hücre kültürlerinde veya

dokulardaki hücrelerde reseptörlerin ayrıntılı bir şekilde incelenmeleri mümkün olmuştur. Pozitron emisyon tomografisi (PET) yöntemi ile beyin ve diğer organlardaki reseptörler canlı organizmada in situ olarak incelenmesi mümkün olmuştur. Günümüzde ise sayılan bu yöntemlerin yanısıra moleküler biyoloji yöntemleri de reseptör belirleme için kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikte; membran reseptörlerinin izolasyonu için önce hücre membran proteinlerinin deterjanlarla suda çözünmesi gerekir. Bu çözünmüş fraksiyondan reseptör proteini özel yöntemlerle izole ve pürifiye edilir. Böylece, saflaştırılan reseptör proteini molekülünün, molekül ağırlığı ve primer yapısı (aminoasid dizilimi) belirlenir. Son zamanlarda reseptör proteini sentezini sağlayan o reseptöre özel mRNA'lar izole edilmiş, komplementer DNA'lar (cDNA) yapılmış ve reseptör sentezi ile ilişkili gen klonlanarak reseptör proteinleri üretilmiştir. Ayrıca bazı reseptörlerin geninde yere-yönlendirilmiş (site-directed) mutasyon yapılarak, reseptör molekülünün ilaçla etkileşiminde rol oynayan kritik aminoasid ardışıkları belirlenmeye başlanmıştır.

Reseptör incelemelerinde klonlama, yer yer diğer iki reseptör belirleme yaklaşımının önüne geçmiştir. Bu nedenle halen gen klonlama ile varlığı gösterilen, fakat farmakolojik yöntemlerle incelenip fonksiyonel önemi henüz belirlenmemiş reseptör alt tipleri vardır. Ancak, pahalı bir yöntem olduğu için kısıtlı sayıda laboratuvarlarda uygulanabilmektedir.

c)Reseptör aktivasyonu ve reseptör sonrası olaylar

Endojen etkin maddelerin ve ilaçların kendilerine özgü reseptörleri etkileyebilmeleri için, moleküllerinin reseptörler ile kombine olması gerekir (şekil 1).



Şekil 1. Effektör hücre membranında bulunan serotonerjik reseptörlerin transmembranal transdükleme sistemlerinin başlıcaları ve sitoplazma içinde hücre yanıtına yol açan temel olaylar.

Reseptörler kendileri gibi hücre membranında bulunan efektör makromoleküller ile kenetlenebilirler. Effektör makromoleküller :

- i) özel enzimler (adenilil siklaz, fosfoinozidaz, guanilat siklaz)
- ii) iyon kanalları
- iii) aktif transport sistemleri (pompalar) dır.

Reseptörlerin membrandaki efektör makromolekülleri etkilemelerine G proteinleri aracılık eder. Santral sinir sisteminde ve periferik yapılarda G proteinlerinin G_i , G_s , G_p , G_o , G_k , vb gibi en az 12 çeşidinin bulunduğu saptanmıştır. Reseptörler, G proteinleri ve efektör makromoleküller; nörotransmitterlerin, nöromodülatörlerin ve hormonların reseptöre olan

etkilerini hücre içine aktaran *transmembranal sinyal transdükleme sistemlerinin* üç ana ögesini oluştururlar.

Reseptörlerin aktivasyonu ile oluşan sinyalin membranda yerleşmiş transmembranal transdükleme sistemleri tarafından transdüklenmesi sonucu oluşan ikinci ulaklar (sAMP, sGMP, diasilgliserol ve inozitoltrifosfat gibi), hücre içinde birbirini izleyen bir olaylar dizisini başlatır. Bunlara *reseptör sonrası (post-reseptör) olaylar* adı verilir. Bu olaylar hücrede gözlenen ve klasik farmakolojik yöntemlerle ölçülen son etki yani hücre cevabı ile sonuçlanır. Bu süreç içerisinde meydana gelen sinyal bir yandan transdüklenirken, öte yandan da önemli ölçüde amplifiye edilir (21).

Şimdiye kadar tamamen karakterize edilmiş serotonin reseptörlerinden 5-HT₁ reseptörlerinin hepsi regülatör G proteini aracılığı ile adenilil siklazı inhibe etmektedir. Bunun bir istisnası 5-HT_{1c} reseptörüdür. Bu reseptör diğerlerinden farklı olarak membranda fosfoinozididaz (fosfolipaz C) ile kenetlenmiştir. Bu reseptörlerin aktivasyonu 5-HT₂ reseptörlerinin aktivasyonunda olduğu gibi, fosfatidilinozitol 4,5 bifosfatın fosfoinozididaz ile hidrolize olmasına ve sitoplazmada ikinci ulak olarak inozitol trifosfat ve diasilgliserol oluşmasına neden olmaktadır. Ayrıca 5-HT_{1A} reseptörlerinin, pertusis toksinine duyarlı G proteinleri aracılığı ile K⁺ kanallarını açarak hiperpolarizasyon yaptığı da gösterilmiştir (22,23).

Serotonin 5-HT₃ reseptörleri, nikotinic reseptörler gibi bir iyon kanalının intrinsik kısmını oluşturur. Membranda sodyum kanalı ile direkt kenetlenmişlerdir. Aktive edildiklerinde, sodyum kanalını açarak nöronlarda hızlı depolarizasyon yaparlar (21,22). 5-HT'nin açtığı bu kanallardan Na⁺ ve K⁺ geçişi olur. Hücrel depolarizasyonun sonunda

Ca^{++} un ekstrasellüler kompartmandan içeriye doğru akımına bağlı olarak sitozolik Ca^{++} konsantrasyonu hızla artar.

Serotonin 5-HT₄ reseptörleri ise, G proteinleri aracılığı ile adenilil siklazla onu stimule edecek şekilde kenetlenmiştir (24).

B-AGONİST İLAÇ

Reseptörler aracılığı ile hücreleri etkileyen ilaçların temel özellikleri yapıcı, o reseptörleri aktive eden endojen etkin maddelere benzemeleridir. Bu yapısal benzerlik nedeniyle reseptör bağlanma noktası kendine özgü endojen madde ile ilaç molekülünü ayırd edemez ve ilaç tarafından da aktive edilebilir. Vücuttaki tüm endojen aktif maddeler, farmakoloji yönünden agonist maddelerdir; reseptörleri onlar gibi aktive edebilen ilaçlar da agonisttir (20).

C-DİABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus, oldukça yaygın ancak hem değişik toplumlarda hem de aynı toplumun değişik kesimlerinde farklı yüzdelerde görülen herediter; sistemik, aynı zamanda sosyal ve ekonomik yönleri de ağır olan bir hastalıktır (1).

Diabetes, Yunanca kökenli bir kelime olup "sızma, akıp gitme, boşalma" anlamına gelmektedir. M.S. 2. yüzyılda Kapadokya'lı hekim Arateus, zayıflayan, çok idrar çıkaran hastalarını gözleyerek 'vücudun kol ve bacaklarının eriyerek idrarla dışarı atıldığını' düşünmüştür. Daha sonraları bu tip hastaların idrarının böcek ve sinekler tarafından tercih edildiği,

yapışkan ve tatlı olduğu anlaşılınca idrara şekerin sızdığı düşünülmüştür. Böylece; karamel, şeker anlamındaki “mellit” kelimesi eklenerek, hastalığın adı şeker sızdıran anlamına gelen ‘Diabetes mellitus’ olmuştur. Sızan maddenin glukoz olduğu Matthew Dobson tarafından 1776’da gösterilmiştir. Claude Bernard (1813-78) tarafından bu hastalıkta vücutta şeker üretiminde arttığı ve bunun santral sinir sistemi hastalığına bağlı olduğu ileri sürülmüştür.

Günümüzde diabetin heterojen bir hastalık olduğu, herediter olduğu, HLA sistemiyle hem oluşum yönünden hem de komplikasyonları yönünden ilişkisinin olduğu ve komplikasyonlarla seyreden ve her yaşta görülebilen bir hastalık olduğu kabul edilmektedir. İnsüline bağımlı olmayan tipin görülme sıklığı, çoğunlukla orta yaş ve sonrasında, insüline bağımlı tipin ise 10-12 yaşlarda en yüksek düzeylerine ulaşır. Diabetik olmayanlara göre, diabetiklerin mortalite oranı birkaç kat fazladır. Aynı zamanda yol açtığı kronik komplikasyonları nedeniyle morbidite oranı da yüksektir. Tüm bu nedenler hastalığın erken ve doğru tanınmasını, etkin ve enerjik bir yöntemle sağaltımını zorunlu kılmaktadır.

Diabetes mellitus tedavisi ile ilgili önemli bilgiler Kanada’da Toronto Üniversitesi’nde Frederick Banting ve Charles Best’in ilk kez insülini keşfetmeleriyle başlamıştır. Ancak insülinin yapısal formu Frederick Sanger tarafından (1955) ve fiziksel yapısı da Dorothy Hodgkin tarafından ortaya konmuştur. Bunu teknik ilerlemeler izlemiştir. Paulesco, Banting ve Best’in öncü çalışmalarından bu yana Diabetes mellitus tedavisinde kullanılan insülin, sığır ve domuz pankreasından ekstraksiyon yoluyla elde edilmekteydi. Son yıllarda, hastanın kendi kan glukozunu kendisinin ölçmesi, diabetin acil komplikasyonlarının sürekli insülin infüzyonlarıyla tedavisinin ölüm oranını belirgin derecede azaltması, devamlı insülin infüzyonu veya günde birçok sayıda insülin enjeksiyonu ile gerçeğe yakın

bir kan insülin düzeyinin sağlanabilir olması, insan insülinine çok yakın sentetik insülinler elde edilmesi, gen teknolojisi ve pankreas transplantasyonu tedavi konusunda heyecan veren yeniliklerdir.

Ülkemiz için çok net rakamlar verilebilecek güvenilir çalışmaların kısıtlı olmasına karşın yaklaşık % 2-3 oranında tanı konmuş diabetik hastanın olduğu varsayılmakta, henüz tanı konmamış diabetik hasta grubunun da aynı oranda olduğu düşünülmektedir.

a- Etiyopatogenezi

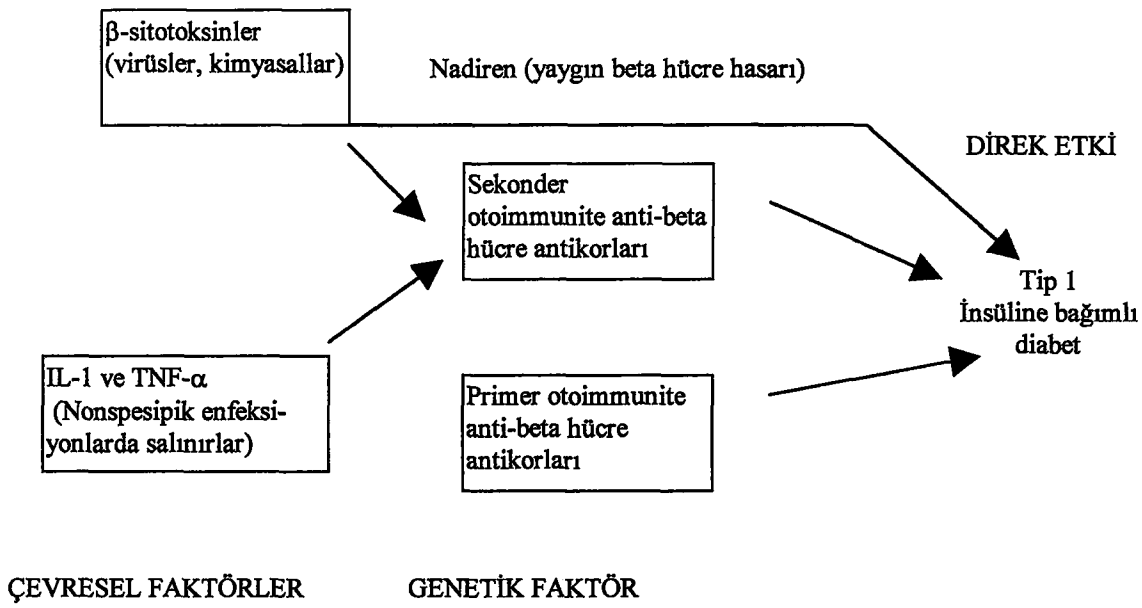
Diabetin etiolojisi hala kesin olarak belirlenememekle birlikte, genetik ve çevresel faktörler, genellikle de her ikisinin kombinasyonun önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. Özellikle insüline bağımlı diabette beta hücrelerinde görülen hasardan, hem genetik yatkınlık, hem de hastalığın başlamasını tetikleyen çevresel bir faktör sorumlu tutulmaktadır (şekil 2).

Genetik faktörün rolünü destekleyen en önemli komponent, majör histokompatibilite kompleksi (MHC)'dir (2,4). MHC, bazı Human Lökosit Antijen (HLA) allelleriyle bağlantısı gösterilen insüline bağımlı diabetle ilişkisi ve immun cevabı kontrol eden genlerle birlikte altıncı kromozom üzerinde lokalize olması bakımından, diabette önem taşır. İnsüline bağımlı diabeti olanlarda %95 oranında HLA DR₃ veya HLA DR₄ antijenleri tespit edilmiştir. Hastaların %50-55'inde ise her iki antijen birden bulunmaktadır (5,7). HLA DR₃ antijeni saptanan homozigot kişilerde, adrenal yetmezlik, Hashimoto tiroiditi gibi diğer otoimmün hastalıklar da daha sıklıkla bulunmaktadır (2,25). İnsüline bağımlı olmayan diabetin, tek yumurta ikizlerinde %90-100 oranında görülmesi de, yatkınlık faktörünün rolünü desteklemektedir (2,26).

Çevresel faktörler, virüsler ve kimyasal maddelerdir. Viral enfeksiyonlar, özellikle genetik yatkınlığı olan kişilerde, insüline bağımlı diabeti indüklemektedir. Birçok viral enfeksiyon sırasında veya sonrasında diabet ortaya çıkabilmektedir (kabakulak virüsü, rubella virüsü, sitomegalovirüs, koksakivirüs B₄ ve B₅, retrovirüs (tip C partikül (+)), retrovirüs (tip A partikül (+) ve p73 antijen üreten), reovirüsler, ansefalomyokardit virüsü gibi). Konjenital rubella enfeksiyonlarında %20 oranında diabet geliştiği, eğer çocukta HLA DR₃ veya DR₄ antijenleri de varsa bu oranın %40'a çıktığı görülmüştür. Yine koksaki B₄ virüsü, ketoasidoz sonrası ölen postenfeksiyöz diabetik bir hastadan izole edilmiş ve beta hücrelerinde fulminan hasar geliştiği görülmüştür. Diğer virüslerle de, hayvanlarda deneysel olarak diabet oluşturulabilmektedir (27).

Beta hücrelerine olan etkilerinden dolayı "betasitotoksinler" de denilen kimyasal maddelerden en bilinenleri N-nitrozo bileşikler ve bir rodentisid olan "Vacor" adlı maddedir (28,29). Deneysel diabet modellerinde en çok kullanılan kimyasal maddeler ise streptozotosin (STZ) ve alloksandır (ALL).

Çevresel faktörler, genellikle otoimmünite aracılığıyla, insüline bağımlı diabete neden olmaktadır. Genetik yatkınlık, beta hücrelerinde hasar başladıktan sonra, otoimmüniteye duyarlılığı arttırmaktadır. Ancak yüksek doz streptozotosin, alloksan veya vacor, direk etki ile beta hücrelerinde hasar oluşturabilirler (29).



Şekil 2. Diabet etiyopatogenezi

Nonspesifik enfeksiyonlar sonucu, makrofajlardan streptozotosin benzeri etki ile beta hücrelerinde spesifik veya nonspesifik hasar oluşturan interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrotizan faktör-alfa (TNF-α) salınır (30,31). Genellikle beta hücre hasarı, geriye dönerken, genetik yatkınlığı olan kişilerde, otoimmun olaylar gelişir ve sonrasında beta hücrelerinde ölüm ortaya çıkar ve bu olayın bazı toksik oksijen radikallerinin oluşumu ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Otoimmun diabetin, tip 1 diabetik babaların ve annelerin (özellikle HLA DR₄ antijeni saptanan) çocuklarında daha fazla görüldüğü gösterilmiştir.

H₂O₂ (hidrojen peroksit), O₂⁻ (süperoksid radikali) gibi artmış oksidanlar, süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin aktivasyonu, glutatyon, A, C ve E vitaminleri gibi kimyasal antioksidanlar ile beta hücrelerindeki hasar önlenmektedir. Nikotinamid ise serbest radikallerin yaptığı DNA hasarını önlemek için ihtiyaç duyulan poli-ADP riboz sentetaz enziminin artması sonucu NAD düzeyindeki azalmayı önleyerek, beta hücrelerini korur (32,33).

Tip 2 diabetlilerde, tanı konduğu anda, adacık hücrelerine karşı saptanan antikor %20 oranında olmasına karşın, tip 1 diabetlilerde otoimmunitenin rolünü gösteren kanıtlar oldukça fazladır (34). Bunlardan bazıları şöyledir:

- Otoimmun hastalıklarda görülen spesifik sınıf II antijenleri ile (öz. HLA DR) tip 1 diabetin bağlantısının gösterilmesi,
- Tip 1 diabetin, tirotoksikoz, Hashimoto tiroiditi, Addison hastalığı gibi diğer otoimmun hastalıklarla birlikte görülebilmesi,
- Pernisyöz anemi, vitiligo, myastenia gravis, romatoid artrit ve kollajen hastalıklar gibi diğer otoimmun bozukluklarda olduğu gibi tip 1 diabette de aile öyküsünün olması,
- Adacık hücre antikorlarının yüksek oranda saptanması (adacık hücre sitoplazmik antikorları (%60-90), adacık hücre yüzey antikorları (%90),
- Yeni başlamış tip 1 diabetin remisyonunun, immunosupresyon tedavisi ile indüklenebilmesi.

Bio Breeding/Worcester (BB/W) cinsi sıçanlarda ve NOD (nonobes diabetic) farelerde gelişen spontan diabette herhangi bir çevresel faktör gösterilememiştir ve bunların her ikisi de otoimmun diabetir (35,36).

Kalıtımın, diabet etiyolojisindeki rolü, otozomal dominant geçiş gösteren ve tip 2 diabetin bir alt sınıfı olan MODY (maturity-onset diabetes in the young) tip diabette gösterilmiştir (37).

Hedef hücrelerde, insüline karşı duyarlılığın azalmasında, hem insülin reseptörlerindeki azalma, hem de insülin reseptör tirozin kinaz aktivitesindeki değişiklik katkıda bulunmaktadır. Diabette ayrıca, glikojen sentezi üzerindeki insülin kontrolü de bozulmuştur. İnsülin reseptör genindeki polimorfizme bağlı olarak insüline direnç geliştiğini gösteren

çalışmalar vardır. Eğer bu hipotezler doğrulanırsa, obez tip 2 diabetteki insülin reseptör tirozin kinaz aktivitesindeki bozukluk açıklanabilecektir.

İnsülin genindeki nokta mutasyonu, pankreatik dokuda prostaglandin metabolizmasındaki değişikliklere bağlı insülin sekresyonunda yetersizlik ve hücresel prostaglandin metabolizmasındaki değişikliklere bağlı hedef hücrede insülin direncinin gelişmesi gibi faktörlerinde etiyolojide rol oynadığı kabul edilmektedir. Diabetes mellitus ile ilgili öne sürülen diğer bir hipotez de, glukozun hücrede toplanmasını sağlayan insülin yanıtı glukoz transportöründeki azalmadır.

b. Komplikasyonları

Diabetik hastalarda, erken ve geç dönemlerde çeşitli komplikasyonlar görülür. Başlıca akut komplikasyonu, tedavinin yeterli şekilde uygulanmadığı durumlarda ortaya çıkan, ketoasidozdur. Diabetes mellitusun kendisine ve akut komplikasyonlarına bağlı morbidite ve mortalite oranı, etkin antidiabetik ilaçların geliştirilmesi ve insülin üretimindeki yeni metodlar (ultrapür rekombinant insan insülini gibi) sayesinde büyük ölçüde azalmıştır. Ancak tedavideki anlamlı gelişmelere rağmen, özellikle uzun süreli Diabetes mellitus'a bağlı komplikasyonlar yine de ortaya çıkabilmekte ve ciddi olabilmektedir (2,9).

Nöropati, kardiyomyopati, anjiyopati ve nefropati gibi bazı komplikasyonları morbidite ve mortaliteyi artırırken, bazıları da (gastroenteropati, mesane disfonksiyonu ve erektil empotans gibi) hastanın yaşam kalitesini etkilemektedir. Diabetik komplikasyonların etiyolojileri tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Ayrıca bir tek diabetik komplikasyonun ortaya çıkmasında birçok etiyolojik faktör rol oynayabilmektedir. Örneğin; diabetik nöropati gelişiminde, sorbitol

birikimi, nöral myoinozitol miktarında ve $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesinde azalma sinerjistik rol oynamaktadır (9).

Diabetin kronik komplikasyonlarının başlıcaları şunlardır:

- Mikroanjiopatiye bağlı diabetik nefropati, retinopati, kardiyomegali ve kalp yetmezliği,
- Makroanjiopatiye bağlı koroner kalp hastalığı, inme ve periferik gangrenler,
- Nöronal bozukluğu bağlı somatik ve otonomik nöropatiler (diabetik nöropati),
- Diabetik dermopati, ayak ve bacak ülserleri ve diğer cilt bozuklukları,
- Subkapsüler katarakt ve senil kataraktın hızlanması,
- Kemiklerde demineralizasyon, eklem ve periartiküler yapıların bozuklukları,
- Enfeksiyonlara (bakteriüri, kandidiazis ve pyelonefrit gibi) eğilimin artması veya diabete özgü bazı enfeksiyonların oluşması (nekrotizan myozit ve fasiit, malign otitis eksterna gibi).

Bu komplikasyonlar her 2 tip diabette de ortaya çıkar. Ancak bazıları bir tipte, diğerine göre daha sık görülür. Diabetik nefropati, proliferatif retinopati, ağır otonomik nöropati ve subkapsüler katarakt, tip 1 diabette daha sık görülürken; makroanjiyopati ve ona bağlı komplikasyonlar, gözde maküler ödem, senil kataraktın hızlanması, tip 2 diabette daha sık görülür (21).

Hemen hemen tüm diabetik komplikasyonlar, deneysel diabet modellerinde geliştirilebilmekte ve böylece mekanizmaları araştırılabilmektedir (9).

c. Diabetin Mesaneye Etkisi

Deneysel diabetes mellitustaki ürodinamik değişiklikler diabetik hastalardakine oldukça benzerdir. Miksiyon frekansı ve volümü artmıştır, dolmaya rağmen intravezikal basınç düşüktür ve dolma ile indüklenen intravezikal kasılmaların amplitüdü azalmıştır (10,13,38).

Diabetik sıçanların mesanelerinde yapısal değişiklikler görülür. İnvivo sistometri yöntemi ile STZ ile indüklenen diabetik sıçanların mesanelerinde, üriner kapasitede artma görülür (11,38,39,40-42). Miksiyon volümü ve frekansında artma, atılan total idrar miktarının artmasıyla paraleldir (39-44). STZ, diürezis, mesane alanında ve miksiyon parametrelerinde değişikliklere neden olmaktadır (45). Diabette polidipsi ve poliüriye bağlı kronik distansiyon sonucu, mesane belirgin şekilde genişlemiştir (42,44,46,47). Mesane ağırlığı ve rezidü idrar volümündeki artış, ALL ile indüklenen diabetik hayvanlarda ve spontan diabetik Çin hamsterinde de gösterilmiştir. İnvivo komputerize sistometri/miksiyon ölçümlerinde, STZ ile indüklenen sıçanlarda miksiyon volümünün daha fazla olduğu ve miksiyon arası intervallerin anlamlı olarak daha kısa olduğu gösterilmiştir. Overektomi yapılan dişi diabetik sıçanlarda miksiyon artışının gözlenmesinden sonra, sıçan mesanesinde görülen diabetik değişikliklerin, seks hormonları ile ilişkisi olasılığı gündeme gelmiştir (48).

Kimyasal diabetin erken fazları dahil diabetik sıçanların mesane düz kaslarında, kollajen komponentinin hem kalitesinde hem de miktarında değişikliklerin eşlik ettiği hipertrofi görülmektedir (38,44,45).

STZ ile indüklenen diabette, miksiyon ve mesane alanındaki değişiklikler ile DNA sentezi ve 3H-timidinin, DNA sentezine katılımı ile ilişkisi gösterilmiştir. Mesane alanı, diabet indüklendikten 7 gün sonra anlamlı

olarak artmakta, ancak diabetin süresiyle birlikte daha fazla artmamaktadır (39,45). Timidin'in DNA sentezine katılması, diabet indüklendikten sonraki 2 gün içinde artmakta, 4-7.günlerde maksimum değerlere ulaşmakta ve 14.günde kontrol değerlerine düşmektedir. Bu veri, mesane distansiyonunun veya artmış miksiyon volümünün, DNA'ya timidin katılımını stimüle ederek, mesane alanını arttırdığı hipotezini desteklemektedir (45).

Nöropati ve mesane çıkış bozuklukları ile birlikte olan sistopati gibi diabetik komplikasyonlarda süre oldukça önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir ve STZ ile indüklenen diabetik sıçanlarda, mesane disfonksiyonu enjeksiyondan 8-10 hafta sonra görülmektedir (39).

STZ verilen sıçanlarda, enjeksiyondan 24 saat sonra diürezde hızlı bir artma, iki hafta içinde normalden 15 kez daha fazla olacak şekilde miksiyon sıklığında artma, daha sonra da miksiyon volümünde artma görülmektedir. 6 hafta sonra mesane ağırlığı, normalin 2 katı artmış olarak bulunur, ancak zamanla daha fazla artma gözlenmez. 6 hafta ile 6 ay arasındaki sürede ise miksiyon volümü ve mesane kapasitesi artar (43).

d. Deneysel Diabet Modelleri

Kronik bir hastalık olan diabette, uzun sürede veri toplama zorluğunu ortadan kaldıran deneysel diabet modelleri, klinik diabetin birçok özelliğini göstermelerine karşın, hiçbir model klinik diabetle kesin eşdeğer değildir. Hiperglisemi, deneysel modellerde en çok rastlanan bulgudur, insülin düzeyi azalmış veya artmış olabilir, diğer karakteristik belirtiler (polidipsi, poliüri, polifaji ve letarji) ise bazı modellerde görülmektedir.

Deneysel modeller, sadece diabetin etiyolojisini anlamada değil, diabetik komplikasyonlarla ilişkili mekanizmaların araştırılmasında da yol gösterici olmaktadır (9).

Deneysel diabet modelleri oluşturmada kullanılan yöntemler şunlardır:

- a) Cerrahi diabet
- b) Kimyasal diabet
- c) Spontan diabet
- d) Viral diabet
- e) Transgenik diabet

a) Cerrahi Diabet

Günümüzde nadir kullanılan ancak tarihi önemi olan bir yöntemdir. Diabetin pankreatik orjinli olduğu ilk kez Oscar Minkowski tarafından, köpeklerde total pankreatektomi yapılarak gösterilmiştir. Pankreasın total ya da subtotal çıkarılması esasına dayanır (9).

b) Kimyasal Diabet

Birçok ilaç ve kimyasal maddenin diabete neden olduğu gösterilmiştir. Diabetojenik ajanlardan en spesifik ve uygun olanları tip 1 diabete benzeyen diabete neden olan ALL ve STZ'dir. Diğerleri oldukça zayıf ve reversibl etkilidirler ve etkileri pankreatik beta hücrelerine spesifik değildir.

ALLOKSAN

Pankreatik beta hücrelerini selektif olarak harap ettiği tanımlanan ilk ilaçtır. ALL'nin etki mekanizması ve toksisitesi kesin olarak anlaşılamamakla beraber, beta hücrelerinde direk toksik etkisi olduğu kabul edilmektedir (9). Hücre permeabilitesini arttırdığı ve plazma

membranında morfolojik değişiklikler yaptığı gösterilmiştir. Serbest radikal temizleyicileri, ALL ile oluşturulan diabete karşı koruyucu etki oluştururlar ve ALL'dan önce verilen süperoksid dismutaz enzimi ile diabetin önlenmesi, patogeneizde serbest radikallerin önemini göstermektedir. ALL, beta hücresinde poli (ADP-riboz) sentetaz aktivasyonu ile NAD harcanmasına neden olur ve nikotinik asid ile bu etki önlenmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, pankreastaki beta hücrelerindeki mitokondrial disfonksiyon sonucu, Ca⁺⁺'un mitokondriyal tutulumunun azaldığı ve beta hücrelerinde artan serbest Ca⁺⁺ konsantrasyonunun, hücrenin ölümüne neden olduğu görülmüştür (49).

ALL, yüksek dozlarda pankreas dışı (böbrek, adrenal medulla gibi) organlarda da toksisite oluşturur. Nefrotoksitesisi özellikle proksimal tüpler üzerinedir ve proksimal tübül hasarının göstergesi olan N-asetil β-D glukozaminidaz'ın idrarla atılımını artırır (50).

ALL; kedi, köpek, koyun, tavşan, fare, sıçan, maymun, balık, kaplumbağa ve kuşlarda insüline bağımlı diabete neden olmaktadır. Rodent türlerinden sadece kobaylar, ALL'in diabetojenik etkisine duyarsızdır ve bu türde çinko eksikliğinin olması, ALL'in diabetojenik etkisinin, çinko metabolizması ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (9,49). ALL ile indüklenen diabetik modellerde; kardiyomyopati, gastroenteropati, otonomik nöropati, arteryel, koroner, hepatik, trakeal ve konnektif doku disfonksiyonları gibi komplikasyonların geliştiği gösterilmiştir (9).

STREPTOZOTOSİN

İlk kez 1963'te Rakieten ve arkadaşları, sıçan ve köpeklerde STZ'i intravenöz uygulayarak Diabetes mellitus oluşturmuşlardır. STZ, streptomyces achromogenes suşlarından veya sentetik olarak elde edilen

antineoplastik etkili bir antibiyotiktir. Streptozotosin, yapısal olarak yüksek reaktif yan zinciri olan bir glukoz olduğundan, beta hücreleri tarafından selektif olarak alınır. Toksisitesi taşınabilir şekerlerin yerine geçmesine bağlıdır. STZ, pankreatik beta hücrelerine direkt etki ile diabete neden olmaktadır. STZ, bu hücrelerde NAD (nikotinamid dinükleotid)'in hızlı depleksiyonuna neden olmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, STZ'nin DNA alkilenmesine neden olan karbonyum iyonlarının oluşumu ile etki ettiğini desteklemektedir. DNA'nın onarımı büyük miktarda, NAD tüketimine (poli ADP-riboz aktivasyonu ile) neden olmaktadır. Oksidatif metabolizmanın önemli bir bileşeni olan NAD'nin azalması, beta hücrelerinde ölüme neden olmaktadır (9,51,52).

STZ'nin diabetojenik etkisinde, IL-1 ve TNF- α gibi bazı sitokinlerin ve yine nitrik oksid (NO) ve hidroksiradikallerin rolü olduğuna dair çalışmalar vardır (2,33,53,55).

Beta hücrelerindeki hasar, STZ enjeksiyonundan yarım saat ile iki saat sonrasında ortaya çıkar. Majör histopatolojik değişiklikler, granüllerde kaybolma veya tamamen yok olma, büzülme, çekirdekte piknoz, karyolizis, hücre membran sınırlarının kaybıdır (54).

STZ'den sonra hiperglisemi görülür, ancak nonketon cisimcikleri, plazma serbest yağ asitleri, glikolitik ara ürünler, glikojen ve sitrat düzeyleri normaldir. Çok yüksek doz STZ'den sonra ketonüri ve insülinopeni meydana gelebilir. HbA_{1c} düzeyleri yükselmiştir ve kalıcı diabet oluşur. Enjeksiyondan sonraki ilk 24 saatte hipoglisemiye bağlı konvülsiyon, koma ve ölüm görülebilir (9).

ALL'de olduğu gibi, kobay hariç birçok hayvan türü, STZ'nin diabetojenik etkisine duyarlıdır. STZ ile oluşturulan diabette miyokardiyal,

kardiyovasküler, gastrointestinal, trakeal, böbrek, mesane, vas deferens, adrenal korteks, kemik ve konnektif doku disfonksiyonları gibi birçok komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır (9).

c) Spontan Diabet

Diabetes mellitus, çeşitli hayvan türlerinde spontan olarak görülebilmektedir. Bu hayvan türleri, genetik olarak diabete yatkındırlar ve diabet araştırmalarında yaygın olarak kullanılırlar. Bunlardan bazıları, Çin hamsteri, BB wistar sıçan, OB (DB; C57BL/KSJDB) fare ve NOD (nonobes diabetic) faredir (2,9).

Çin Hamsteri: Diabet herediterdir ve hiperfaji, polidipsi, glukozüri, hiperglisemi ile karakterizedir. Hepatik glukoneogenesis ve glukojenolizin düzenlenmesi bozulmuştur. Plazma insülin düzeyi normal veya artmıştır (9).

BB (BioBreeding) Wistar Sıçanı: Kanada'da Ottawa'da BioBreeding laboratuvarlarında üretildiği için bu adla anılırlar. Otozomal resesif kalıtım gösteren bu sıçanlar, insüline bağımlı diabetin birçok özelliğini gösterirler. Otoimmün diabete örnekler, dolaşımda adacık hücre antikoları bulunur ve pankreasta insülitis gelişir. Diğer hücrelere ve çekirdek proteinlerine karşı da otoantikolar saptanır. Diabete; lenfopeni, yardımcı T hücrelerinde bozukluk, enfeksiyonlara duyarlılık gibi diğer immunolojik bozukluklar da eşlik eder. Doğumda normoglisemiktirler üç ay sonra hiperglisemi, hipoinsülinemi ve pankreatik beta hücrelerinde hasar gelişir ve ketozise meyil vardır (9,35).

OB (DB, C57BL/KSJDB) Fare: Obezite, infertilite ve hiperglisemi görülür. Beta hücrelerindeki insülin, yaşamın ilk birinci ayında azalmaya başlar.

Özellikle obezite ve komplikasyonların çalışıldığı araştırmalarda tercih edilirler (9).

NOD (Nonobes Diabetik) Fare: BB sıçanlara alternatif bir modeldir. Otoimmün mekanizma ve genetik yatkınlık mevcuttur. Diğer spontan diabet modellerinde cinsiyet farklılığı bulunmazken, bu model, daha çok dişi farelerde görülür (dişilerde %80, erkeklerde %20) ve otozomal resesif kalıtım gösterir (9,36).

d) Viral Diabet

Viral enfeksiyonlar, hem insan hem de hayvanlarda diabete neden olabilmektedir. Ansefalomyokardit virüsü M varyantı, koksaki virüs, ayak-ağız hastalığı virüsü, rubella virüs, reovirüs ve Venezuela at ansefaliti virüsü gibi birçok virüsle çeşitli hayvan türlerinde deneysel diabet oluşturulduğu bildirilmiştir. Viral enfeksiyonlara bağlı diabette, hayvanın genetik olarak diabete yatkınlığı önem taşır. Viral enfeksiyonlarla oluşan beta hücre hasarında, steroid hormonların (özellikle androjen ve kortikosteroidler) rolünü gösteren çalışmalar vardır. Kastre edilmiş hayvanlarda viral enfeksiyon ile diabet oluşmazken, androjen ve kortikosteroid verildiğinde, langerhans adacıklarında koagülasyon nekrozu ve hiperglisemi geliştiği gösterilmiştir. Diabetin viral modeli, deneysel zorlukları nedeniyle, diabetik komplikasyonların araştırılmasında çok fazla kullanılmaz (2,9,27).

e) Transgenik Diyabet Modeli

Transgen, bir hayvanın genomuna sokulan yabancı bir genidir. Fertilize bir yumutaya protein kodlayan genin yerleştirilmesini sağlayan transgenik hayvan teknolojisi ile bir protein ürününün daha sonraki yavrularda üretilmesi mümkündür (56). Pankreas beta hücrelerini hedef alan ve

heterolog proteinler olan sıçan veya insan insülin promotor elementlerinden oluşan transgenler eksprese edilerek, hayvanın genomuna sokulur. Bunlar yüksek afinite ile insülini bağlayarak, immun sistem dışı bir mekanizma ile beta hücre fonksiyonlarını bozarlar (57). Transgenik diyabet modelinde glukoz homeostazındaki değişiklikler tip 2 diyabetin erken dönemine benzer. Hepatik glukoz üretiminin artmasına bağlı hiperglisemi gelişir, hiperinsülinemi bulunur. Glukoz homeostazındaki değişikliklerin, serbest insülin konsantrasyonunu düzenleyen IR 921 proteininin tamponlama kapasitesinin üstüne çıkması ile açıklanabileceği bildirilmiştir. Tip 2 diyabetin etiyolojisi ve kontrolünün araştırılması için uygun bir modeldir (57,58).

D. SEROTONİN

Serotonin, kimyaca 5-hidroksitriptamin (3-(β -aminoetil)-5-hidroksiindol)'dir. Birçok nörotransmittere göre basit bir kimyasal yapısı olmasına rağmen, hem santral hem de periferde kompleks farmakolojik etkilere sahiptir. Etkilerini kendisine özgü reseptörler aracılığıyla gösterir. Moleküler klonlama yöntemleri ile 5-HT reseptörlerinin 15 subtipi gösterilmesine karşın, fonksiyonel 5-HT reseptörleri 4 gruba ayrılır. Bunlardan 5-HT₁, 5-HT₂ ve 5-HT₄ reseptörleri, G proteini ile kenetlenen yedi transmembranal segmentli reseptörler süperfamilyasına girerken, 5-HT₃ reseptörleri nikotinic reseptörler, GABA_A, glisin ve glutamat NMDA reseptörleri gibi bir iyon kanalının intrinsik kısmını oluşturur (21,59,60).

5-HT, ilaç olarak kullanılmamasına karşın nöromedyatör olarak santral sinir sisteminde ve periferde önemli ve çeşitli fonksiyonları vardır. Buna bağlı olarak 5-HT reseptör agonisti veya antogonisti ilaçların emezis, migren, anksiyete, depresyon, şizofreni, hipertansiyon, periferik damar hastalıkları ve bazı gastrointestinal hastalıkların tedavisinde ve ilaç

bağımlılıklarında yoksunluk belirtilerinin düzeltilmesinde klinik yararının olduğu ve olabileceği giderek artan bir şekilde ortaya konulmuştur. Bu durum 5-HT'nin farmakolojik yönden önemini arttırmıştır (21).

a. Tarihçesi

1930'lu yıllarda, Erspamer, indol boyası ile enterokromafin hücrelerinin dağılımını incelediğinde, gastrointestinal mukoza, trombosit ve SSS'de yüksek konsantrasyonda bulunan bu bilinmeyen indole "enteramin" adını vermiştir. Daha sonra 1948 yılında, Cleveland Kliniğinde Page ve ark.ı, trombositlerden salınan vazokonstriktör bir maddeyi izole ettiler ve "serotonin" olarak adlandırdılar. Daha sonra bu iki maddenin kimyasal ve farmakolojik olarak aynı madde olduğu anlaşılmıştır. 1950'li yılların ortalarında da 5-HT'nin, SSS'de nörotransmitter olarak rolü gösterilmiştir (13,59).

b. Kaynağı

5-HT, hayvan ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunur, örneğin, vertebralı hayvanlarda, meyvelerde (muz vb.), fındık gibi sert kabuklu çerezlerde, ısırgan otunun dalayıcı tüyleri, akrep ve eşek arısının venomunda bile bulunur. İnsan vücudunda toplam serotonin miktarı 10 mg kadardır. Büyük kısmı (4-8 mg) mide ve barsak mukozasındaki epitel hücrelerinin özelleşmiş şekilleri olan enterokromafin hücrelerde bulunur. Vücutta 5-HT'nin büyük kısmını sentez edip depolayan enterokromafin hücreler, histolojik ve embriyolojik bakımdan APUD hücrelerinin bir tipidir. Bu hücrelerde 5-HT yanında, P maddesi, motilin ve enkefalin gibi peptidlerin oluşup depolandığı çeşitli türlerde immunoflüoresans yöntemlerle gösterilmiştir (21,59).

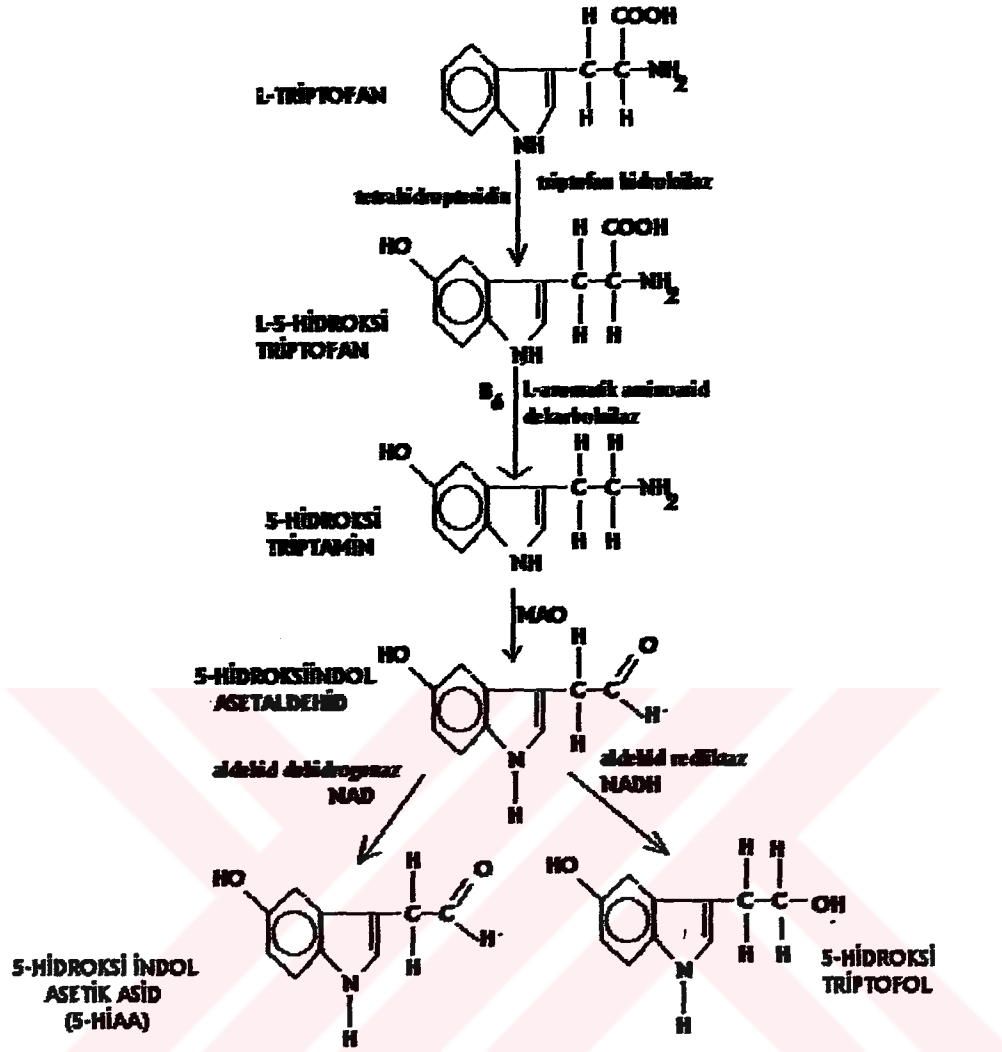
Enterik 5-HT bazal salınımı, barsakların mekanik gerilmesi (besinler, hipertonic salin uygulanması gibi) ve vagal stimülasyonla uyarılır. Ayrıca sempatik sinir stimülasyonu veya barsak arteri içine katekolamin enjeksiyonu, beta reseptörleri aracılığıyla 5-HT salıverilmesini artırırlar. 5-HT, parakrin özellikte bir fonksiyonla, peristaltik hareketlerin stimülasyonuna ve post-prandiyal mide-barsak hiperemisine katkıda bulunur (21,59,61).

Mide ve barsak kanalı dışında kalan kısmı, kanda trombositler içinde ve SSS'de bulunur. İnsanda normalde mast hücrelerinde bulunmaz, fakat bu hücrelerden kaynaklanan tümörlerde bulunur.

c. Sentezi ve Salınımı

5-HT, enterokromafin hücrelerde, SSS'deki serotonerjik nöronlarda ve enterik sinir sisteminin serotonerjik nöronlarında sentez edilir. Trombositlerde sentez edilmez, trombositler dolaşımdaki 5-HT'yi, Na⁺ bağımlı bir transportör aracılığıyla aktif transport suretiyle alır ve depolarlar. 5-HT içeren bütün hücrelerde, bu madde ATP ve iki değerli kanyonlarla yaptığı kompleks halinde özel veziküller içinde bulunur. 5-HT içeren veziküller, elektron mikroskopisinde ortası yoğun granüller şeklinde görünürler.

Serotonin, diyetle birçok kaynaktan alınabildiği gibi, insitu olarak esansiyel bir amino asid olan triptofandan iki basamakta sentez edilir. İlk olay sentezde hız kısıtlayıcı basamağı oluşturur ve triptofan hidrosilaz enzimi ile katalize edilir ve triptofan 5 numaralı karbonundan hidrosillenir. Oluşan 5-hidroksitriptofan, aromatik L-amino asid dekarboksilaz enzimi tarafından da karboksillenerek 5-hidroksitriptamine dönüştürülür (21,59-61) (Şekil 3).



Şekil 3. Serotonin sentez ve metabolizması

5-HT, enterokromafin hücrelerden ve SSS'deki serotonerjik sinir uçlarından parsiyel ekzositoz ile salınır. Trombositlerden salınması ise bu hücrelerin parçalanması ile olur. p-klorofenilalanin, SSS'de ve periferde, triptofan hidroksilaz enzimini inhibe ederek, 5-HT sentezini azaltır. p-kloroamfetamin, sıçanlarda yüksek dozda verildiğinde, beyinde

serotonerjik sinir uçlarını tahrip eden ve serotonin düzeyini düşüren, serotonerjik nöronların bir nörotoksinidir.

5-HT'nin, nöronlar içinde turnover zamanı 1 saat, enterokromafin hücrelerde ise 7-12 saat kadardır (21).

d. Metabolizması

5-HT'nin başlıca metabolizma yolu monoaminooksidaz (MAO) enzimi ile oksidatif deaminasyondur. Oluşan 5-hidroksiindolasetaldehit, aldehit dehidrojenaz enzimi ile 5-hidroksiindolasetikasid (5-HIAA)'e dönüştürülür ve böbreklerden idrarla atılır. İdrarla atılan günlük 5-HIAA miktarı, erişkin bir insanda 2-10 mg kadardır. İdrarla 24 saatte çıkarılan 5-HIAA miktarı vücutta 5-HT sentez ve yıkımının bir ölçüsüdür. Karsinoid sendromlu hastalarda, idrarda aşırı artmış 5-HIAA miktarı, oldukça güvenilir tanısal bir testtir. 5-HT, MAO enziminin her iki izoformu tarafından yıkılır. Nöronların mitokondrilerinin dış membranlarında hem MAO A hem de MAO B enzimi bulunur, trombositlerde ise başlıca izoform MAO B'dir. Metabolizmada daha az önemi olan yollar, sülfasyon ve O- ya da N- metilasyon'dur. Bunların sonucunda, 5-hidroksi-N, N-dimetiltriptamin (butofenine) gibi endojen psikotomimetik ve N, N-dimetiltriptamin ve 5-metoksi-N, N-dimetiltriptamin gibi hallüsinojen maddeler oluşur. Enzimatik yıkımın yanısıra, Na⁺ bağımlı taşıyıcı aracılı geri alım mekanizması da metabolizmada rol oynar. 5-HT transportörü, serotonerjik akson uçlarının ve trombositlerin membran dış yüzlerinde bulunur ve 5-HT uptake'i, katekolaminlerin uptake'i gibi kokain ve trisiklik antidepresanlar ile bloke edilir (21,59,61).

Kandaki 5-HT eliminasyonunda rol oynayan en önemli organ akciğerdir. Burada perialveoler kapillerlerin endotel hücreleri 5-HT'i uptake ederler ve oksidatif deaminasyon suretiyle yıkarlar.

5-HT, kan-beyin engelini geçemez, prekürsörü olan triptofon ise SSS'e geçebilir ve ağızdan triptofan verilmesi, SSS'de 5-HT düzeyini yükseltir. Ağızdan alınan 5-HT, barsak çeperinde bulunan MAO A ve daha az olarak da karaciğer MAO B enzimi ile ilk geçişte önemli ölçüde yıkılır ve sistemik dolaşıma pek ulaşamaz.

e. Reseptörleri

5-HT'nin efektör hücre ve nöronlar üzerindeki etkileri esas olarak, hücre membranı üzerindeki kendine özgü reseptörleri aktive etmesine bağlıdır. 5-HT reseptörleri, periferik yapılarda belirli agonist ve antagonist ilaçları kullanarak klasik farmakolojik yöntemlerle, daha sonra da beyinde radyoligand bağlama teknikleri kullanılarak incelenmiştir.

Serotonerjik reseptörlerin varlığı ilk olarak 1957 yılında izole kobay ileumunda, Gaddum ve Picarelli tarafından gösterilmiştir. Gaddum ve Picarelli, kas kontraksiyonlarını kontrol eden, farmakolojik olarak farklı iki reseptör tipi olduğunu ileri sürmüşlerdir (12,21,59). Bunlardan parasempatik sinir uçlarında bulunan ve asetilkolin salınımını kontrol eden ve morfin ile antagonize olana "*serotonin M reseptörü*", düz kaslarda lokalize olan ve dibenzilin ile antagonize olana da "*serotonin D reseptörü*" adını vermişlerdir. 1979 yılında Peroutka ve Synder, radyoligand bağlama yöntemi ile iki tip serotonerjik reseptörün olduğunu ileri sürmüşlerdir. [³H]5-HT'ye afinitesi yüksek olan reseptörleri, 5HT₁ reseptörleri, spiperona afinitesi yüksek reseptörleri ise 5HT₂ reseptörleri olarak adlandırmışlardır. [³H]5-HT ile bağlanmanın spiperidol tarafından

inhibisyonunun bifazik olması nedeniyle 5-HT₁ reseptörlerinin heterojen olabileceğini bildirmişlerdir. 1981 yılında Pedigo ve ark. 5-HT₁ reseptörlerinin 5-HT_{1A} ve 5-HT_{1B} olmak üzere iki alt tipinin olduğunu, Paros ve ark. (1985) da üçüncü bir bağlanma yerinin (5-HT_{1C}) de olabileceğini belirtmişlerdir. 1986 yılında Bradley ve ark., 5-HT₁ reseptörlerinin alt tipleri ile fonksiyonel etkileri arasında ilişki bulamamışlar ve bu reseptörlere 5-HT_{1benzeri} reseptörler adını vermişlerdir. Bu reseptörlerin ortak özellikleri, 5-karboksiamidotriptamin (5-CT) ile stimüle edilmeleri, metiotepin ve metizerjid ile bloke edilmeleri, ketanserin tarafından ise etkilenmemeleridir. Bradley ve ark., buna dayanarak fonksiyonel 5-HT reseptörlerini 5-HT_{1benzeri} reseptörler, 5-HT₂ reseptörler ve 5-HT₃ reseptörler olmak üzere 3 gruba ayırmışlardır. Bradley ve ark. tarafından tanımlanan 5-HT₂ reseptörler, daha önce Gaddum ve Picarelli tarafından tanımlanan serotonin D reseptörlerine, 5-HT₃ reseptörleri de serotonin M reseptörlerine karşılık gelmektedir (62).

5-HT_{1D} olarak adlandırılan yeni bir 5-HT₁ reseptör'subtipinin bulunması ve 5-HT_{1C} ile 5-HT₂ reseptörleri arasında farmakolojik ve moleküler benzerlik bulunması üzerine Peroutka tarafından 1990 yılında yeni bir sınıflandırma yapılmıştır.

- 1) 5-HT₁ reseptörleri (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} subtipleri)
- 2) 5-HT₂ reseptörleri (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} ve 5-HT_{2/1C} subtipleri)
- 3) 5-HT₃ reseptörler

Daha sonraları, birçok periferik yapıda bulunan ve atipik 5-HT reseptörü denilen yapıların, ikinci ulak yaklaşımı ile 5-HT₄ reseptörü olduğu görülmüştür. Bunlar 5-HT ve belirli 5-HT agonistlerinin yaptığı ve klasik 5-

HT antagonistleri ile bloke edilemeyen adenililsiklaz stimülasyonuna aracılık eden reseptörlerdir (22,23,63).

Beyinde geni saptanan ve klonlanan, radyoligand bağlama yöntemler ile incelenen 5-HT₅, 5-HT₆ ve 5-HT₇ tipi reseptörler de vardır (21,63).

1. Reseptör Tiplerinin Özellikleri

a- Serotonin 5-HT₁ Reseptörleri

Bu reseptörlerin etkileri, düz kaslarda gevşeme, bazı kardiyak ve damar düz kaslarında kasılma, nörotransmitter salınımının inhibisyonu ve SSS'deki etkileri şeklindedir. 5-HT reseptörleri içinde en büyük ve en çeşitli reseptör grubudur. Bu grupta 6 reseptör alt tipinin varlığı gösterilmiştir: I) 5-HT_{1A}, II) 5-HT_{1B}, III) 5-HT_{1C}, IV) 5-HT_{1D}, V) 5-HT_{1E} ve VI) 5-HT_{1F}. Bunlardan 5-HT_{1B} ve 5-HT_{1D} aynı reseptör alttipinin, tür (species) homologları olarak kabul edilmektedir. 5-HT_{1C} reseptörünün daha sonra 5-HT_{2C} ile aynı olduğu saptanmıştır ve bunlara 5-HT_{2/1C} reseptörler adı verilmiştir. Bu nedenle halen belirlenen 5-HT₁ reseptör alttiplerinin sayısı gerçekte dördür. Beyinde belirli bölgelerde, bazı rodentlerde (sıçan, fare ve hamster) 5-HT_{1B} reseptörler ve insan dahil incelenen diğer memelilerin beyinde ise aynı bölgelerde onlar yerine tür homologları olan 5-HT_{1D} reseptörler bulunur ve aynı özellikleri gösterir. Halen yukarıda belirtilen 5-HT₁ reseptör alttiplerinden birine uymayan atipik reseptörlerin bulunduğunu gösteren reseptörler de vardır ve bunlara 5-HT_{1benzeri} reseptörler adı verilir (21-23, 62,63).

Tüm 5-HT₁ reseptörlerinin alttipleri adenilatsiklaz enzimini inhibe ederler.

1. 5-HT_{1A} Reseptörleri

5-HT₁ reseptörleri içinde, en fazla incelenmiş olanıdır. Başlıca SSS'de lokalizedir ve özellikle hipokampusta yüksek dansitede bulunur. Beyinde, septum, amigdala, raphe nüclei (özellikle de dorsal raphe nüclei)'de de bulunur. Bunların çoğu limbik sisteme aittir ve emosyondan sorumludur. Diğer 5-HT₁ reseptörler gibi adenilat siklazı inhibe eder. Aynı zamanda, reseptörle açılıp kapanan K⁺ kanallarını aktive eder ve voltaja bağımlı Ca⁺⁺ kanallarını inhibe eder. Pertussis toksinine duyarlı G_i/G_o proteinleri ile kenetlenir. Bu reseptörlerin agonistlerinin, erkek sıçanlarda seksüel davranışları fasilite ettiği gösterilmiştir. Ayrıca hipotansiyon, besin alımında artma, hipotermi ve anksiyolitik etkileri vardır ve depresyondan da sorumludur.

5-HT_{1A} Reseptörlerinin Agonistleri

8-OH-DPAT (9-hidroksi-2-(di-n-propilamino) tetralin), buspiron, ipsapiron, gepiron, DP-5-CT, 5-metil-ürapidil, flesinoksan ve MDL 72832, 5-HT_{1A} reseptörlerine selektivite gösterirler. Bunlardan arilpiperazin türevi olan buspiron, ipsapiron ve gepiron parsiyel agonisttirler. Buspiron, anksiyete tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Diğer arilpiperazinlerin de anksiyolitik etkileri vardır. 8-OH-DPAT, flesinoksan, ürapidil ve 5-metil ürapidil, santral 5-HT reseptörlerini aktive ederek kalp atım hızını ve kan basıncı düşürmektedir. Ürapidil hipertansiyon tedavisinde klinik kullanıma girmiştir.

5-HT_{1A} Reseptörlerinin Antagonistleri

NAN 190 (1-(2-metoksifenil)-4-(4-(2-ftalimmido)butil)piperazin), MDL 73005 (8-(2-(2,3-Dihidro-1,4,benzodioksin-2-ilmetilamino)etil)-8-azaspiro (4,5)dekan-7,9-dion), 5-F-8-OH-DPAT, BMY 7378(1-piperazinil 8-(2-(4-(2-

metoksifenil)-etil)-8-azaspiro(4,5)-dekan-7,9-dion), SD221 (metil-4 (4-(4,1,3-triokso-2H-1,2-benzois2iazol-2-il)butil)-1-piperazinil) 1H-indol-2-6525 karboksilat ve WAY 100135 (N-tert-butil-3-(4-(2-metoksiferil) piperazis-1-il)-2-fenilpropanamid) selektif antagonistlerdir (22,23).

Bunlardan WAY 100135 dışında kalanlar, kullanıldıkları dokuya göre parsiyel agonist etki gösterebilirler. Ayrıca pindolol, propranolol, alprenolol gibi bazı beta adrenoseptör blokörleri ile de 5-HT_{1A} reseptörleri antagonize edilebilir.

II. 5-HT_{1B} Reseptörleri

Otoreseptördür ve aktivasyonu, nörotransmitter salınımı inhibe eder. Agonistleri rodentlerde agresif davranışları ve besin alımını inhibe eder. Bu reseptör yalnızca rodentlerde (sıçan, fare ve hamster) identifiye edilmiştir. Radyoligand bağlama yöntemler ile bu türlerin bazal ganliyonlarında yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir. İnsan ve diğer memelilerdeki 5-HT_{1D} reseptörleri ile aynı özellikleri taşıdığı ve bu iki reseptör alttipinin, tür homologları olduğu kabul edilmektedir. 5-HT_{1B} reseptörleri damar yatağında da bulunmaktadır. Sıçan vena kavasında 5-HT_{1B} reseptörleri aracılığı ile noradrenalin salınımının inhibe olduğu, insan safen veninde ise bu etkinin 5-HT_{1D} reseptörleri aracılığıyla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sıçanlarda penil ereksiyonda ve hipofajide, emezisde 5-HT_{1B} reseptörlerinin rolü olduğu gösterilmiştir (22,23,63).

5-HT_{1B} Reseptörlerinin Agonistleri

CP 93,129(3-(1,2,5,6-tetrohidropirit-4-11)pirrolo(3,2-b)pirid-5-on) selektif agonist, RU 24969(5-metoksi-3(1,2,3,6-tetrahidro-4-piridinil)-1H-indol), TFMDD (N- (3-triflorometil-fenil) piperazin) ve mCPP (1- (3-klorofenil) piperozin) selektif olmayan agonistlerdir.

5-HT_{1B} Reseptörlerinin Antagonistleri

Henüz selektif antagonistleri bulunamamıştır. Selektif olmayan potent 5-HT_{1B} reseptör antagonistleri ise SD2 21009 (4-3-terbutilamino-2-hidroksipropoksi)indol-2-karbonikasid-izopropilester), siyanopindolol gibi bazı indol beta adrenoseptör antagonistleridir (22).

III. 5-HT_{1D} Reseptörleri

Akson terminalinde, presinaptik uçta bulunan bir otoreseptördür ve 5-HT salınımını inhibe eder. Daha çok bazal gangliyon ve substantia nigrada lokalizedir. Heteroreseptör özelliği de vardır ve akson uçlarında dopamin salınımını kontrol edebilmektedir. Radyoligand bağlama teknikleri ile 5-HT_{1Dα} ve 5-HT_{1Dβ} olmak üzere iki alt grubu gösterilmiştir. Bu reseptörlerin varlığı, kobay, domuz, tavşan, köpek, maymun, güvercin ve insanlarda gösterilmiştir. SSS'de olduğu gibi, damar düz kaslarında da bulunur ve kasılmaya neden olur. Sığır ve insan serebral arterinde, bu reseptörler aracılığıyla oluşan kasıcı etki gösterilmiştir. Trigeminal gangliyonlardaki 5-HT_{1D} reseptörlerinin uyarılması ile plazma ekstravazasyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir (22).

5-HT_{1D} Reseptörlerinin Agonistleri

Sumatriptan ve L 694247'2-(5-(3-(4-metilsülfanilamino)benzil-1,2,4-oksazidrazol-5-11)-1H-indol-3-il)etilamin) potent bir agonisttir. 5-benzil oksitriptamin ise hem 5-HT_{1D}, hem de 5-HT_{1B} reseptörlerine eşit derecede agonistik etki gösterir. 5-HT_{1D} reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanan, 5-HT_{1A} ve 5-HT_{1B} reseptörlerine ise daha düşük afinite gösteren sumatriptan, migren ve "cluster" baş ağrısının akut döneminin tedavisinde kullanılan bir ilaçtır (21,22,60).

5-HT_{1D} Reseptörlerinin Antagonistleri

Selektif antagonisti GR 127935(N-(4-metoksi-3-(4-metil-1-piperazinil) fenil)-2'-metil-4'-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il) (1,1-bifenil)-4-karboksamid) dir. Selektif olmayan antagonistler ise metergolin ve metiotepindir (22).

IV. 5-ht_{1E} ve 5-ht_{1F} Reseptörleri

Bu reseptörler, rekombinant proteinler, aminoasid homolojisi ve adenilil siklaz inhibisyonu yapma özelliklerine göre 5-HT₁ reseptör alt grupları olarak sınıflandırılmıştır. Ancak bu reseptörler, agonist ve antagonistlere olan afiniteleri açısından diğer 5-HT₁ reseptörlerinden farklıdır. 5-CT (5-karboksamidotriptamin)'nin bu reseptörler üzerinde agonist etkisi ya çok azdır ya da yoktur. Metiotepinin de bu iki reseptör üzerindeki antagonistik etkisi çok düşüktür. Bu reseptörlerin dağılım bölgeleri kesin olarak belirlenememiştir. Ancak homojenat bağlama yöntemleri ile 5-ht_{1E} reseptörlerinin beyinde 5-HT_{1D} reseptörleri ile aynı yerlerde bulunduğu, 5-ht_{1F} reseptörlerin ise in situ hibridizasyon çalışmaları ile insanda beyin, mezenter arter ve uterusu, reseptör proteinlerinin mRNA'ları identifiye edilmiştir. Beyinde özellikle, dorsal raphe nüclei, hipokampus ve kortekste yoğun olarak bulunurlar. 5-ht_{1E} ve 5-ht_{1F} reseptörlerinin fonksiyonel etkileri bilinmemektedir. Bilinen selektif agonist ve antagonistleri yoktur (22,23).

V. 5-HT_{1benz eri} Reseptörleri

SSS'de identifiye edilmiş bu reseptörlerin, 5-HT₁ alt tiplerinin bağlanma yeri ile ilişkisi tam olarak gösterilememiştir. Bağlanma yerleri 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} ve 5-HT_{2C} reseptörlerinin bağlanma yerlerinden belirgin olarak ayırdedilebilse de, 5-HT_{1D} reseptörlerin bağlanma yerlerinden ayırd edilememektedir. Selektif agonist ve antagonistlerin yokluğu ve radyoligand bağlama tekniklerinin, periferik dokularda bulunan 5-HT_{1benz eri}

reseptörleri için ayrıntılı olarak yapılamaması, bunu zorlaştırmaktadır. Düz kaslarda kasılma yapan 5-HT_{1benzeri} reseptörlerin, 5-HT_{1D} reseptörleri ile benzeştiği ancak metergolin ile zayıf bloke edilmesi ile farklılık gösterdiği ileri sürülmüştür. Periferik 5-HT_{1benzeri} reseptörlerinin selektif agonist ve antagonistleri henüz bilinmemektedir (22).

B- Serotonin 5-HT₂ Reseptörleri

5-HT₂ reseptörlerinin yıllarca her yerde bulunduğu ve trombosit agregasyonu, bronkokonstriksiyon gibi istenmeyen etkilere aracılık ettiği düşünülmüştür. Bugün bilinen ve moleküler klonlama yöntemleri ile gösterilmiş 3 subtipi vardır (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} ve 5-HT_{2C}). Bu sınıflandırmadaki, 5-HT_{2A} reseptörleri, önceden bilinen klasik 5-HT₂ reseptörüne; 5-HT_{2B} reseptörleri, yeni klonlanmış SRL veya 5-HT_{2F} reseptörüne; 5-HT_{2C} reseptörleri ise 5-HT_{1C} reseptörüne karşılık gelmektedir. 5-HT₂ reseptörlerinin 3 subtipi de etkilerini fosfolipaz C enzimini aktive ederek gösterirler ve ikincil ulak olarak dilasilgliserol ve inozitol trifosfat oluşur. Genellikle, G_p gibi pertusis toksinine duyarlı G proteinleri ile kenetlenirler, ancak 5-HT_{2A} reseptörleri G_i/G_o gibi pertusis toksinine duyarlı G proteinleri ile kenetlenir (22,23,59,60).

1. 5-HT_{2A} Reseptörleri

Başlıca damar düz kaslarında, trombositlerde, akciğer, SSS ve gastrointestinal sistemde olmak üzere birçok dokuda yaygın olarak bulunmaktadır. Birçok damar düz kasında, bronş, uterus ve mesane düz kasında, kobay ileumunun bazı bölümlerinde kasılmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca trombosit agregasyonu ve kapiller permeabilitedeki artışın, bu reseptörler aracılığı ile olduğu ileri sürülmüştür. SSS'de başlıca serotonerjik terminal uçlarda bulunurlar. Özellikle prefrontal korteks,

klastrumda yoğun olarak bulunur. Yine limbik sistemin bazı bölümleri, vizuel korteks ve bazal ganglionun bazı bölümlerinde de bulunmuşlar ve SSS ile ilgili birçok fonksiyonu ve nöroendokrin etkileri de gösterilmiştir. Öğrenmeden sorumlu olduğu ve LSD gibi hallüsinojen maddelerin etkilerine aracılık ettiği gösterilmiştir. Nöroendokrin fonksiyonlarından bazıları, sıçanlarda β -endorfin, kortikosteron ve luteinizan hormon, rhesus maymunlarında da prolaktin salınımına neden olmasıdır. Yine köpeklerde, adrenal medulladan adrenalalin salınımına 5-HT_{2A} reseptörlerinin aracılık ettiği gösterilmiştir. Diğer fonksiyonel etkilerinin, hipertansiyon, migren ve nöronal depolarizasyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. (22,59,60).

5-HT_{2A} Reseptörlerinin Agonistleri

Bu agonistlere ait bilgiler oldukça sınırlıdır. Hallusinojenik etkileri ve kısıtlı kullanılabilirlikleri de pratikte güçlüklereden neden olmaktadır (22).

Alfa-metil-5-HT, DOM (1-(2,5-dimetoksi-4-metilfenil)-2-aminopropan), DOI (1-(2,5-dimetoksi-4-rodofenil)-2-aminopropan) ve 'DOB (1-(2,5-dimetoksi-4-bromofenil)-2-aminopropan).

5-HT_{2A} Reseptörlerinin Antagonistleri

Ketanserin ve pirenperon selektivitesi yüksek; siproheptadin, sinanserin, spiperon, pizotifen ve mianserin ise selektivitesi düşük olan antagonistlerdir. Ketanserin, 5-HT₂ reseptörlerini halen tıpta kullanan diğer serotonin antagonistlerine göre daha selektif olarak bloke eder. Ayrıca α_1 adrenerjik reseptör blokörüdür. Esansiyel hipertansiyonlu hastalarda, kan basıncını belirgin derecede düşürür. Raynaud sendromunda vazospazmı çözer. Serotoninin yaptığı vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonunu inhibe eder. Pizotifen ve siproheptadin, migren ve cluster tipi baş ağrılarının profilaksisinde kullanılırlar. Ayrıca

siproheptadin, diğer antihistaminiklerin kullanıldığı yerlerde, karsinoid sendromun barsak belirtilerinin tedavisinde ve dumping sendromunda da kullanılır. Anoreksia nervoza olgularında, iştahı arttırıcı etkisi nedeniyle yararlı bulunmuştur (21,59,60).

II. Serotonin 5-HT_{2B} Reseptörleri

Sıçan mide fundusunda bulunan ve fundus düz kasında kasılmaya neden olan, SRL veya 5-HT_{2F} diye bilinen reseptörlerin, yeni klonlanmış 5-HT_{2B} reseptörleri olduğu bugün için kabul edilmektedir. 5-HT_{2B} reseptörlerinin, SSS'deki bağlanma bölgeleri bilinmemektedir.

5-HT_{2B} Reseptörlerinin Agonistleri

Sıçan mide fundus kası preparatlarında, agonistlerin etki gücüne göre sıralanması; 5-HT = alfa-metil-5-HT > 5MeOT (5-Metoksitriptamin) > TEMPP > 5-CT > Quipazin > 2-metil-5-HT > Sumatriptan > 8-OH-DPAT, şeklindedir (22).

5-HT_{2B} Reseptörlerinin Antagonistleri

Etki gücüne göre sıralanması; 1-NP (1-(1-naftil)piperazin) = ORG GC 9₄ (1,3,4,14b-tetrahidro-2,7-dimetil-2H-dibenzol b,f)pirazino (1,2-d) (1,4) oksozepin) = rovolisin = yohimbin > pizotifen > propranolol > mianserin > pirenperon > sinanserin = spiperon, şeklindedir.

5-HT_{2C} reseptör antagonisti olarak tanımlanan SB 200646 (N-(1-metil-5-inol-il)-N-(3-piridil) üre) nin 5-HT_{2B} reseptörlerine afinitesinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Metizerjid, metergolin ve LY 53857 (4-isopropil-7-metil-9-) 2-hidroksi-12-metilpropoksikarbonil) -4,6-6A,7,8,9,10,10Aokta hidroindolo (4,3-F6) kuinolon)'inde bu reseptörlere diğer 5-HT₂ reseptörlerinden daha fazla afinitesi vardır (22).

III. 5-HT_{2C} Reseptörleri

Serebrospinal sıvı üretiminde rol alan koroid pleksusta, yüksek dansitede bulunur, ancak fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca, beyinde 5-HT_{2C} reseptörler bağlanma yeri çok fazla bulunmamasına rağmen, yüksek oranda 5-HT_{2C} mRNA olduğu tespit edilmiştir. 1989'da Julius ve ark., 5-HT_{2C} reseptörlerini klonlamış ve fibroblastlarda 5-HT_{2C} reseptörlerinin ektojik ekspresyonunun, mitogenezisi ve malign transformasyonları tetiklediğini göstermişlerdir. Bu bulgular, 5-HT₂ reseptörlerinin diğer fonksiyonlarına ek olarak "büyüme faktörü" gibi etkilerinin olabileceğini desteklemektedir. Davranışların düzenlenmesinde, yemek yeme, adrenokortikotropik hormon salınımında, migrende, obsesif kompulsif hastalıklarda, anksiyetede ve penis ereksiyonunda da rol oynadığı düşünülmektedir.

5-HT_{2C} Reseptörlerinin Agonistleri

Alfa-metil-5-HT, DOI'dir (22).

5-HT_{2C} Reseptörlerinin Antagonistleri

SB 200646, metergolin, ritanserin, ICI 169369 (2-(2-dimetilamino etil-tio)-3-fenilkuirdin), siproheptadin, LY 43857, metizerjid, mianserin ve mesulerjin'dir. Mianserin, depresyon tedavisinde, metizerjid ise migren ve diğer baş ağrılarında profilaktik olarak kullanılır. Ayrıca, karsinoid sendromlu hastalarda ishal ve buna bağlı malabsorbsiyonu önlemede kullanılmaktadır (22,23).

c. Serotonin 5-HT₃ Reseptörleri

Periferik ve SSS nöronlarında, serotoninin yaptığı hızlı depolarizasyona aracılık eder. Gastrointestinal sistemde, vagal ve splanknik aferentleri

içeren parasempatik sinir uçlarında lokalizedir. SSS de ise nükleus traktus solitari ve area postrema da bulunur. 5-HT₃ reseptörlerinin kardiyovasküler sistemdeki esas etkileri kalp üzerinedir, lokal ve refleks etkilerin kombinasyonu ile inhibisyon veya stimülasyon yapabilir. Damarlar üzerinde refleks etki ile vazodilatasyon yapar. Bu reseptörler, hem santral hem de periferik etki ile emezise neden olmaktadır. Duyusal sinir sistemdeki 5-HT₃ reseptörlerinin aktivasyonu nosiseptif nöronlarda duyarlılığa ve ağrıya, ayrıca kemoterapi ve radyoterapi sırasında bulantı ve kusmaya neden olur. SSS'de 5-HT₃ reseptör antagonistlerinin hayvanların davranışlarını etkilediği gösterilmiştir. Bu da 5-HT₃ reseptörlerinin psikoz, anksiyete, yemek yeme ve kavrama yeteneği üzerinde rolü olduğunu düşündürmektedir. Diğer iyon kanallarının reseptörlerinin, birçok alt tipi olmasına rağmen, 5-HT₃ reseptörlerinin, moleküler klonlama yöntemi ile sadece bir subünite gösterilmiştir. Çeşitli dokularda ve in vivo olarak hayvanlarda yapılan çalışmalarda, bu reseptörlerin birçok alt komponentini gösteren farmakolojik kanıtlar da vardır.

5-HT₃ Reseptörlerinin Agonistleri

2-metil-5-HT, fenilbiguanid, m-klorofenilbiguanid, parsiyel agonist özelliği taşırlar (21,60).

5-HT₃ Reseptörlerinin Antagonistleri

MDL 72222 (1alfaH, 3alfaH-Tropan-3-il-3,5-diklorbenzoat), tropisetron, ondansetron, granisetron'dur. Yüksek konsantrasyonda (μ M) tropisetronun 5-HT₄ reseptörlerinin de bloke edici etkisi vardır. Tropisetron, ondansetron, granisetron, kemoterapi ve radyoterapinin yol açtığı bulantı ve kusma tedavisinde kullanılmaktadır (21,59,60).

D. Serotonin 5-HT₄ Reseptörleri

Bütün vücutta yaygın olarak bulunan bu reseptörler, ikinci ulak yaklaşımı ile tanımlanmışlardır. Bunlar 5-HT ve belirli 5-HT agonistlerinin yaptığı ve klasik 5-HT antagonistleri ile bloke edilemeyen adenilat siklaz stimülasyonuna aracılık eden reseptörlerdir. 1986 yılında yapılan sınıflandırmadan sonra, o zaman için atipik 5-HT reseptörü içerdiği düşünülen birçok periferik yapıdaki reseptörlerin, 5-HT₄ reseptörleri olduğu gösterilmiştir. K⁺ kanallarını kapatarak eksitabl hücrelerde yavaş depolarizasyon yaparlar. Periferde mide-barsak kanalında, myenterik pleksus nöronlarında ve özefagus düz kasları dahil düz kas ve salgı hücrelerinde bulunurlar. Beyinde, insan ve domuz kalbinde ve kobay çıkan kolonunda bulunduğu gösterilmiştir. 5-HT₄ reseptörleri, sindirim kanalındaki nöronlarda, düz kas hücreleri ve sekretuar hücrelerde bulunur. Bu reseptörlerin, presinaptik sinir uçlarından asetilkolin salınımı ile enterik gangliyonlarda nikotinic transmisyonu arttırdığı, elektrofizyolojik çalışmalar ile gösterilmiştir. 5-HT₄ reseptörlerinin sindirim kanalında sekresyonları ve peristaltik refleksi stimüle ettiğini gösteren kanıtlar vardır. Sirküler düz kas nöronal uyarımının düzenlenmesi ile peristaltik refleksi ortaya çıkar. Bu, 5-HT₄ reseptör agonisti olarak etki eden metoklopramid ve diğer gastrokinetik ajanların prokinetik etkilerini açıklamaktadır (21,60). Bu reseptörler aracılığı ile izole kalpte pozitif kronotrop ve inotrop etki meydana geldiği gösterilmiştir. SSS'de bulunan 5-HT₄ reseptörleri, afektif bozukluklar, psikoz, motor koordinasyon, görsel algılama, öğrenme ve hafızada rol oynamaktadır (21,59,60).

5-HT₄ Reseptör Agonistleri

5-MEOT, alfa-metil-5-HT ile parsiyel agonist olan süstitüe benzamid türevleri (sisoprid, zakoprid, renzaprid, metoklopromid) ve benzimidazoller

(BIMU 1(Endo-N-(8-metil-8-ozobisiklo (3,2,1)okt-3-il)-2,3-dihidro-3-etil-2-okso-1H-benzimidazol-1-karbok-samid), BIMU 8(Endo-N-(8-metil-8-ozobisiklo(3,2,1,)okt-3-il)-2,3-dihidro-1-metil-2-okso-1H-benzimidazol-1-karbok samid) 'dir. Yeni bulunmuş olan benzamid türevi SC 53116 (Ekso-(15,85-2-metoksi-4-amino-5-kloro-N-((hekshidro-1H-pirolizin-1-il)metil)benzamid) 'in sıçan özefagusunda potent etkisi gösterilmiştir. Sisaprid, metoklopramid, antiemetik ve gastrokinetik olarak günümüzde kullanıma girmiştir (21,60).

5-HT₄ Reseptörlerinin Antagonistleri

SD2 205557 (2-metoksi-4-amino-5-klorobenzoik asid-2-(dietilamino)etil ester), DAU 6285 (Endo-6-metoksi-8-metil-8-azabisiklo (3,2,1,) okt-3-il-2,3-dihidro-2-okso-1H-benzimidazol-1-karboksilat), tropisetron'dur. Yeni geliştirilmiş olan GR 113808 ((1-(2-metilsülfonil)amino)etil)-4-piperinid)metil 1-metil-1H-indol-3-karboksilat) ve SB 204070((1-butil-4-piperidinilmetil-8-amino-7-kloro-1,4-benzodiokson-5-karboksilat) ise selektif antagonisttir (21,60).

E. Serotonin 5-ht₅, 5-ht₆ ve 5-ht₇ Reseptörleri

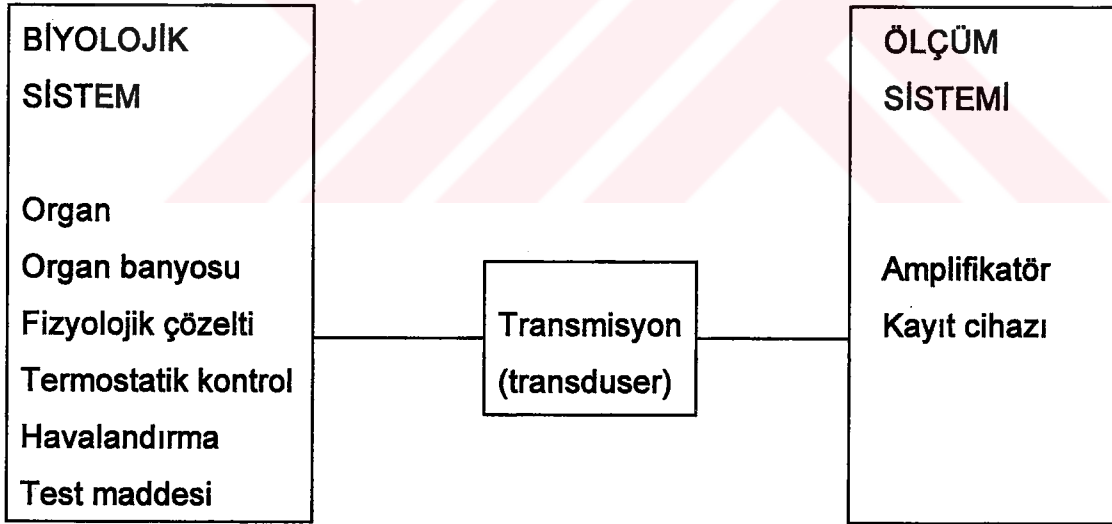
Bugün 5-ht₅, 5-ht₆ ve 5-ht₇ reseptörleri klonlanmış ve aminoasid dizilimleri belirlenmiş olmasına rağmen, bunlarla ilgili bilgiler henüz çok azdır. Güvenle isimlendirilebilmeleri için selektif agonist ve antagonistleri ile transmembranal sinyal transdükleme mekanizmaları ile ilgili daha fazla bilgilere ihtiyaç vardır (21,22).

III.GEREÇ VE YÖNTEM

A-ORGAN BANYOSU

İzole düz kas preparatlarında organın vücut dışına çıkarılarak uygun bir ortamda canlı tutulması, ortamın kimyasal yapısının düzenlenmesi, ortam sıcaklığının denetlenmesi ve optimum oksijenasyonun sağlanması suretiyle yapılır.

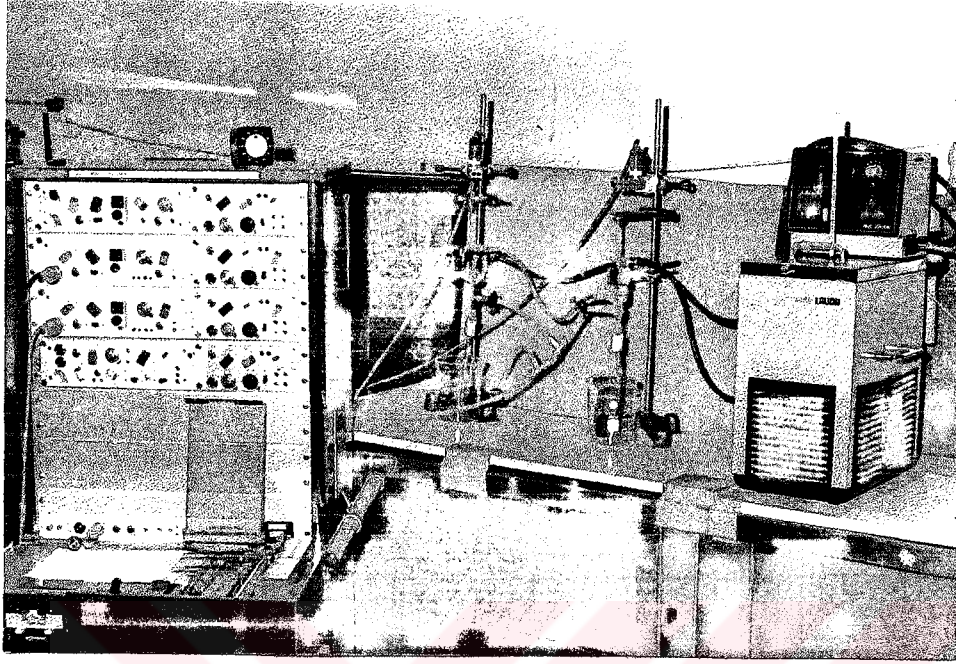
İzole organ preparatlarının incelenmesi için kullanılan tekniklerden birisi *organ banyosu sistemi*dir. Bu sistemde bir üçüncüyle aralarında bağlantının sağlandığı iki temel öge vardır. Bunlardan ilki, preparata optimal in vitro şartları sağlayan biyolojik sistem, ikincisi ise ölçme sistemidir. Bu iki sistem arasında mekanik bağlantıyı sağlayan transmisyon (aktarım) da üçüncü sistemi oluşturmaktadır (şekil 4, resim 1).



Şekil 4. İzole organ preparatlarının incelenmesinde kullanılan sisteme ait diagram

In vitro çalışılacak bir organın canlılığının korunmasındaki en önemli koşul, organın bulunacağı ortamdır. Özellikle aynı türden elde edildiği zaman, gerekli gazları taşıma özelliği açısından kan en iyi ortamdır. Ancak, kanın temininin zor ve pahalı olması, içerdiği aktif maddeler nedeniyle spontan aktivitelere sebep olması ve incelenen ilacın etkinliğini değiştirebilmesi gibi nedenlerle kan kompozisyonuna yakın fizyolojik tuzlu su çözeltileri kullanılmaktadır (64). Bu tuz çözeltilerinin bileşiminde, enzimler, reseptörler vs. gibi proteinlerin işlevleri için gerekli olan Na^+ , K^+ , Mg^{++} ve Cl^- iyonlarının bulunması gereklidir. Hücrelerdeki fonksiyonel proteinlerin H^+ iyonuna karşı duyarlı olmaları ve bunlar üzerinden oluşan yanıtların dar bir pH aralığında ortaya çıkması nedeniyle bazı kimyasal maddeler (H_2PO_4 , HCO_3 , albümin ve aminoasitler, tris ve benzeri organik tamponlar) fizyolojik tuz çözeltilerinin tamponlanmasında kullanılırlar. Tamponlama ile amaçlanan pH'nın nötral (7.4) düzeyde olmasıdır. Deney süresince fizyolojik tuz çözeltisinden %95 O_2 +%5 CO_2 gaz karışımı geçirilerek, dokuya gerekli oksijen iletimi sağlanır.

Organ banyolarında, canlılardan elde edilen dokuların fizyolojik yanıtlarının sağlanması için, oda sıcaklığının üzerinde, $37^\circ C$ civarında sıcaklıklar kullanılmalıdır. Bu amaç için ceketli sistem kullanılmakta, banyo çeperindeki ceketten ısıtılmış su geçirilmektedir.



Resim 1. İzole organ preparatlarının incelenmesinde kullanılan sistem

İzole düz kas preparatına taze fizyolojik çözelti sağlamak ve çalışma sırasında eklenen test bileşiklerini uzaklaştırmak için preparatlar belirli aralarla yıkanır. Bu çalışmada kullanılan yıkama şeklinde, banyo önce tamamen boşaltılır ve sonra boşaltma musluğu kapatılarak taze, uygun sıcaklıktaki çözelti ile doldurulur. İzole düz kas preparatının organ banyosuna asılabilmesi için organ askısına ihtiyaç vardır. Önce organ bu askıya bağlanır ve sonra organ banyosunun içine yerleştirilir.

Preparat ve transduser arasındaki bağlantı ipe sağlanır. Dokuya ait cevaplar transduser aracılığıyla amplifikatöre oradan da kaydediciye iletilir ve doku yanıtı hareketli kağıt üzerine yazdırılır.

B.KONSANTRASYON-CEVAP EĞRİLERİ

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

Agonistlerin test edilmesi:

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

Konsantrasyon cevap eğrisine ilişkin terimler

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

Medyan efektif konsantrasyon (EC_{50} veya ED_{50}): Maksimum etkinin %50'sini oluşturan konsantrasyondur. Çeşitli ilaçların aktivitelerinin karşılaştırılmasında kullanılan bir parametredir. pD_2 ($-\log EC_{50}$) olarak da gösterilebilir.

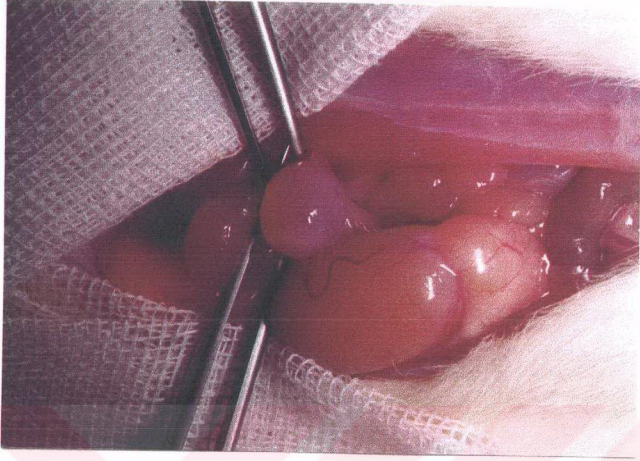
C.ARAŞTIRMA YÖNTEMİ

Çalışmada aynı laboratuvar koşullarında yetişmiş, 180-200 gr ağırlığında, erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Longitudinal düz kasta bulunan 5-HT reseptörlerinin serotonine afinitesinin yaşa göre değiştiği bilgisi nedeniyle sıçanların aynı yaşta olmasına dikkat edildi. Tüm hayvanlar deney için seçilene dek istedikleri kadar yem yeme ve su içme serbestliğine sahiptiler.

Diabetes mellitus oluşturma: Sıçanlara 65 mg/kg STZ (0.02 M sitrat tamponu içinde çözünmüş olan) intraperitoneal (i.p.) tek doz uygulanarak diabetes mellitus oluşturuldu. Sıçanlar STZ ile diabet indüklendikten 8-10 hafta sonra kullanıldılar (39).

Kan şekeri ölçümü: Kardiyak ponksiyonla alınan 2-3 ml kan örnekleri glukoz oksidaz yöntemi kullanılarak Opera(Bayer) cihazı aracılığıyla analiz edildi. Kan şekerleri 200 mg/dl' nin üzerinde olan sıçanlar diabetik olarak kabul edildi (65).

Preparatın hazırlanması: Sıçanlar, düz kas motilitesini değiştirebileceğinden, herhangi bir anestezik madde kullanılmadan servikal dislokasyonla öldürüldü. Pelvik bölge açılarak mesane çıkarıldı (resim 2) ve soğuk Krebs-Henseleit solüsyonu (mM olarak NaCl 118.2, KCl 4.8, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25 ve glukoz 11) içeren petri kabına alındı (10) (resim 3).

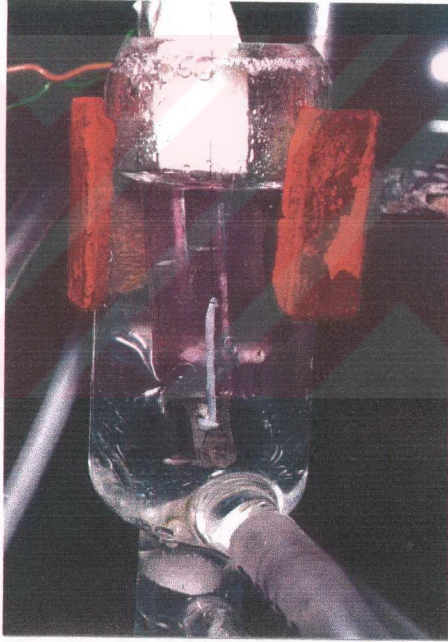


Resim 2. Sıçandan mesanenin çıkarılması



Resim 3. Krebs-Henseleit solüsyonu içeren petri kabında mesane preparatlarının hazırlanması

Mesanelen 2 mm x 10 mm boyutlarında üç veya dört tane longitudinal şerit hazırlandı. Preparatlar spontan aktiviteyi azaltmak için 32°C'de, %95 O₂ + %5 CO₂ ile gazlandırılan ve Krebs-Henseleit solüsyonu içeren 30 ml'lik organ banyolarına asıldı. 2 gr'lık izometrik dinlenme gerilimi uygulandıktan sonra 30 dakika dinlenme periyoduna bırakıldı. Dinlenme periyodu süresince banyo içindeki solüsyon her 10 dakikada bir değiştirildi. Dokunun verdiği cevaplar Grass 7F Poligrafa bağlı Grass 7PT 03E force-displacement transducer aracılığı ile yazdırıldı (resim 4).



Resim 4. Organ banyosu ve yanıt kaydedici sistem

Elektriksel uyarıya dokunun cevabının incelenmesi:

Mesane şeritlerine elektriksel uyarı Grass S 88 stimülatörü ile uygulandı. Elektriksel uyarı, 2 dakikalık intervallerle, 15 saniye süresince ve submaksimal voltaj (90 mV) ile 0.05 milisaniye genişliğinde uygulandı (10). Ön araştırmalar sonucu maksimal kasılmanın %50 sini oluşturan değer olan 5 Hz, uyarı frekansı olarak belirlendi. 5-HT'nin sıçan mesanesi üzerindeki etkisinin natürünü tayin edebilmek için aşağıdaki deney protokolleri uygulandı.

Serotonin agonistlerinin etkisinin değerlendirilmesi:

Elektriksel uyarıya cevapların yaklaşık 30 dakika içinde stabilize olduğu belirlendi. Dengelenme süresinden sonra taşiflaksi gelişimini önlemek amacıyla nonkümülatif olarak uygulanan 5-HT (10^{-8} M- 10^{-4} M) ile kontrol 5-HT konsantrasyon-cevap eğrisi elde edildi. Preparat, 5-HT ile en fazla 5 dakika temasta bırakıldı. Her bir şeritte tek bir konsantrasyon denendi. Kontrol konsantrasyon-cevap eğrisi elde edilirken, 5-HT'nin elektriksel uyarıya bağlı kasılma cevabında yaptığı artışa göre % değerler hesaplandı.

Istatistiksel analiz:

Sonuçlar ortalama \pm SH (standart hata) şeklinde gösterildi. 5-HT ve 5-HT agonistlerinin konsantrasyonlarının oluşturduğu yanıtların ortalamaları arasındaki fark için ANOVA, kontrol ve diabetik grubun istatistiksel analizi için Student' t testi kullanıldı. $p < 0.05$ olması durumunda aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi.

Deneyde kullanılan ilaçlar:

Streptozotocin (Sigma, St.Louis), 5-Hydroxytryptamine creatinine sulphate (Sigma, St.Louis), Atropine sulphate (Sigma, St.Louis), Tetrodotoxin (Sigma, St.Louis), 5-Carboxamidotryptamine (Glaxo,UK), 8-Hydroxy DPAT (Sigma,St.Louis), 2-Methyl 5-HT (Glaxo, UK)

IV. BULGULAR

A. İZOLE SIÇAN MESANESİNİN ELEKTRİKSEL ALAN STİMÜLASYONUNA VERDİĞİ KASILMA YANITININ ÖZELLİKLERİ

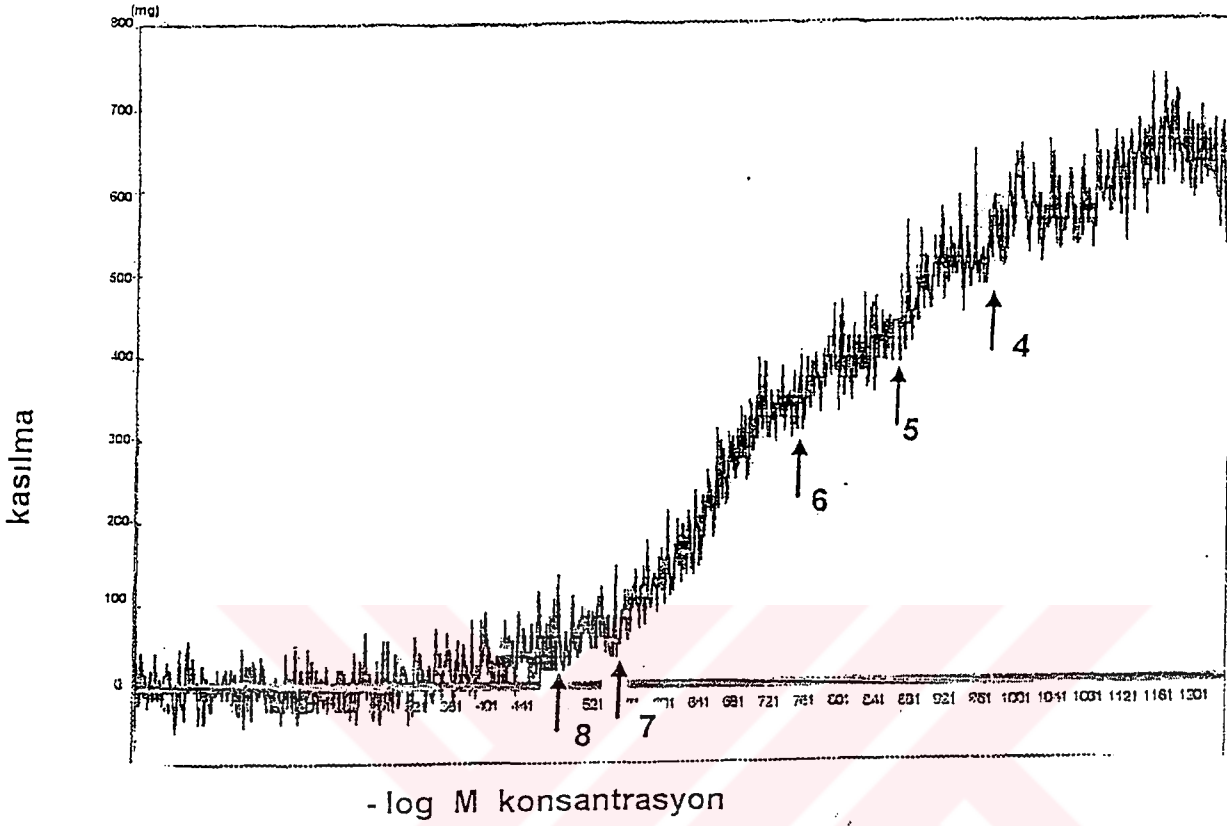
EAS (5 Hz, 0.05 ms, 90 mV, 15 s) izole sıçan mesanesinde TTX (10^{-6} M) ile belirgin olarak inhibe olan, atropin (10^{-6} M)'e dirençli tekrarlanabilir kasılma cevabı oluşturdu.

Kontrol grubunun (n=24) izole mesane longitudinal şeritlerinin EAS'na verdiği kasılma yanıtı 3200 ± 170 mg iken, diabetik gruba (n=24) ait mesane şeritlerinin EAS'na verdiği yanıtın 4140 ± 250 mg olduğu gözlenmiştir (p<0.05).

B. İZOLE SIÇAN MESANESİNİN ELEKTRİKSEL ALAN STİMÜLASYONUNA VERDİĞİ KASILMA YANITI ÜZERİNE 5-HT'nin ETKİSİ

B.1. Kontrol grubu

Yapılan ön çalışmalarda kontrol izole longitudinal mesane şeritlerinde kümülatif olarak uygulanan 5-HT (10^{-8} - 10^{-4} M)'nin, doza bağımlı olarak kasılma yanıtı oluşturduğu gözlenmiştir ($pD_2=8.28 \pm 2.5$, şekil 5).

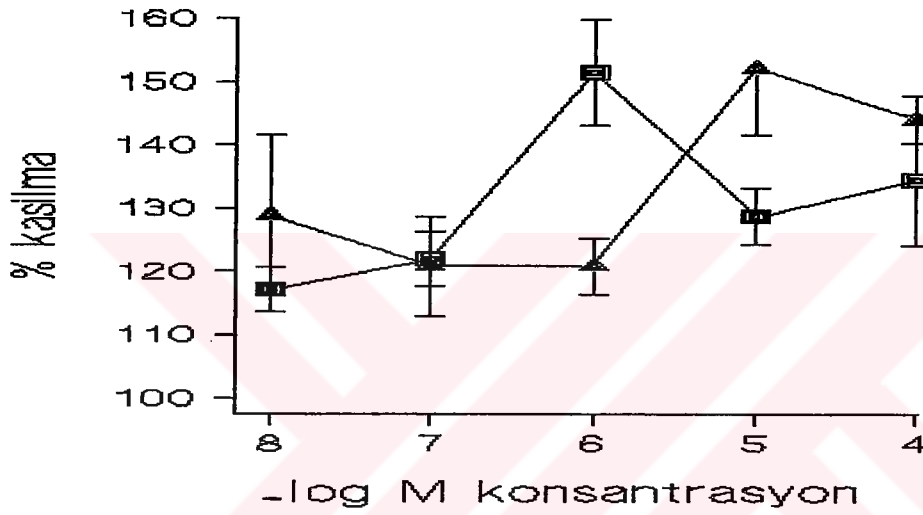


Şekil 5. Kontrol izole longitudinal mesane şeritlerinde kümülatif olarak uygulanan 5-HT (10^{-8} - 10^{-4} M) ile oluşan doz bağımlı kasılma yanıtları

EAS ile uyarılan izole mesane şeritlerine 30 dk sonra nonkümülatif olarak uygulanan 5-HT (10^{-8} - 10^{-4} M), doza bağımlı olarak kasılma yanıtlarını değiştirdi. Düşük konsantrasyonlarda (10^{-8} - 10^{-6} M) EAS'na verilen kasılma yanıtında potansiyalizasyon oluştururken ($pD_2=6.73\pm0.6$), yüksek konsantrasyonlarda (10^{-6} - 10^{-4} M) inhibisyona neden oldu ($pD_2=5.3\pm0.7$, şekil 6).

B.2. Diabet grubu

Diabet grubunda EAS ile uyarılan izole mesane şeritlerine aynı şekilde 30 dk sonra nonkümülatif olarak uygulanan 5-HT (10^{-8} - 10^{-4} M), doza bağımlı olarak kasılma yanıtlarını değiştirdi, ancak kontrol grubundan farklı olarak düşük konsantrasyonlarda (10^{-8} - 10^{-6} M) EAS'na verilen kasılma yanıtında hafif bir inhibisyon oluştururken, yüksek konsantrasyonlarda (10^{-6} - 10^{-4} M) potansiyalizasyona neden oldu ($pD_2=5.37\pm0.4$, şekil 6).



Şekil 6. Kontrol (■) ve diabetik (▲) sıçan mesanesinde 5-HT'ye ait doz-yanıt eğrileri.

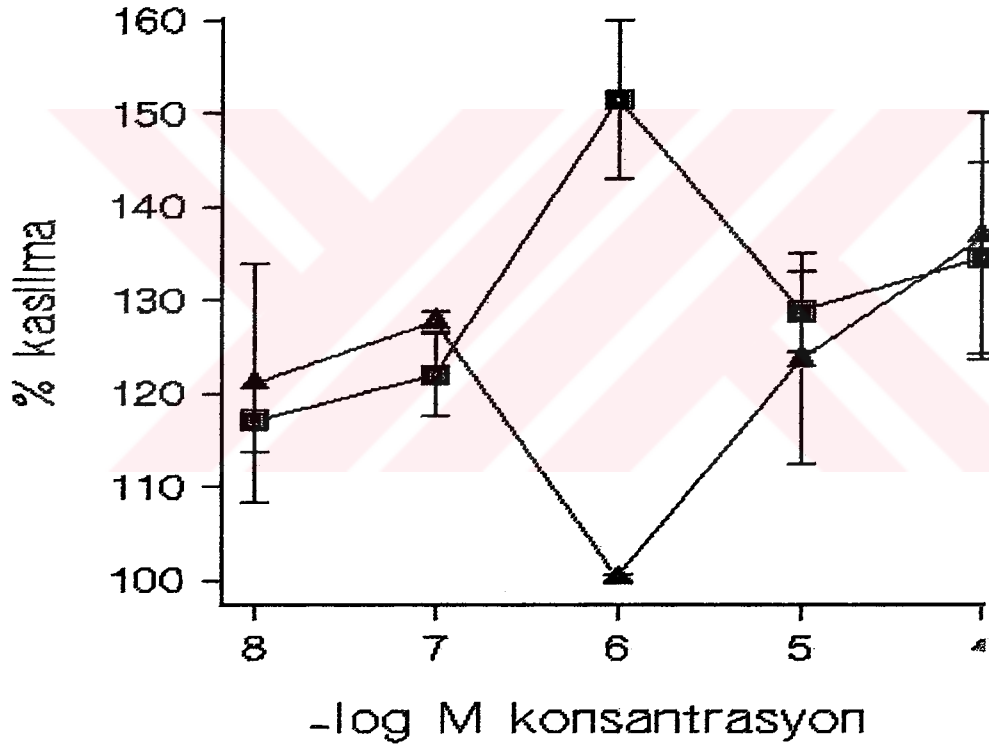
C. İZOLE SIÇAN MESANESİNİN ELEKTRİKSEL ALAN STİMÜLASYONUNA VERDİĞİ KASILMA YANITI ÜZERİNE 5-HT AGONİSTLERİNİN ETKİSİ

C.1. Kontrol grubu

Kontrol ve diabetik mesane şeritlerinde 5-HT₁ agonisti 5-CT (10^{-8} - 10^{-4} M), 5-HT_{1A} agonisti 8-OH-DPAT (10^{-8} - 10^{-4} M), 5-HT₂ agonisti DOI (10^{-8} -

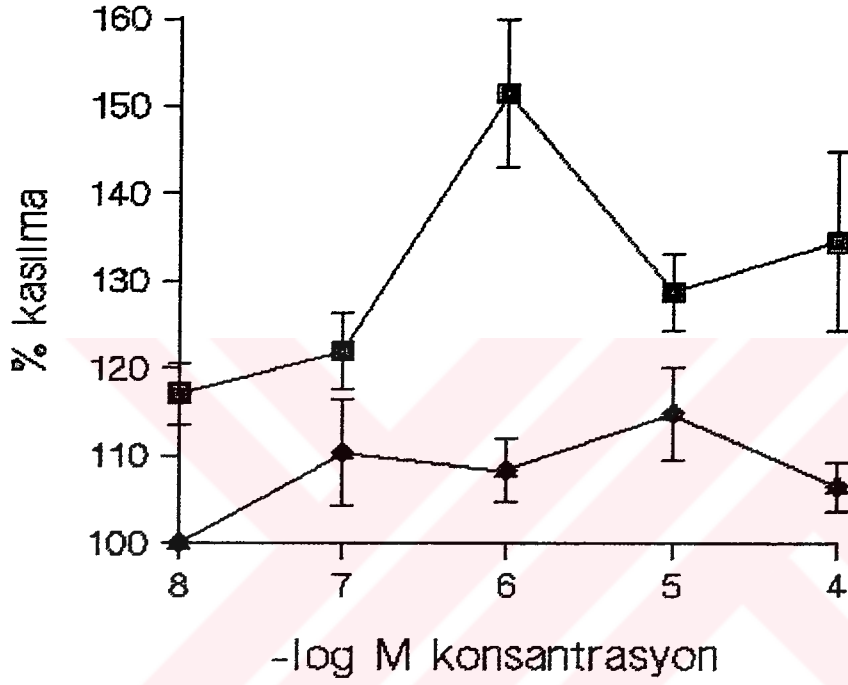
10^{-4} M), 5-HT₃ agonisti 2-metil-5-HT (10^{-8} - 10^{-4} M)'in EAS'na verilen kasılma yanıtları üzerine olan etkileri araştırıldı.

5-HT₁ agonisti 5-CT (10^{-8} - 10^{-4} M), EAS'na verilen kasılma yanıtları üzerinde 10^{-8} - 10^{-7} - 10^{-5} - 10^{-4} M konsantrasyonlarda 5-HT ile aynı etkiye sahip iken 10^{-6} M konsantrasyonda belirgin bir inhibisyona neden oldu ($pEC_{50}=5.23\pm 0.8$, şekil 7).



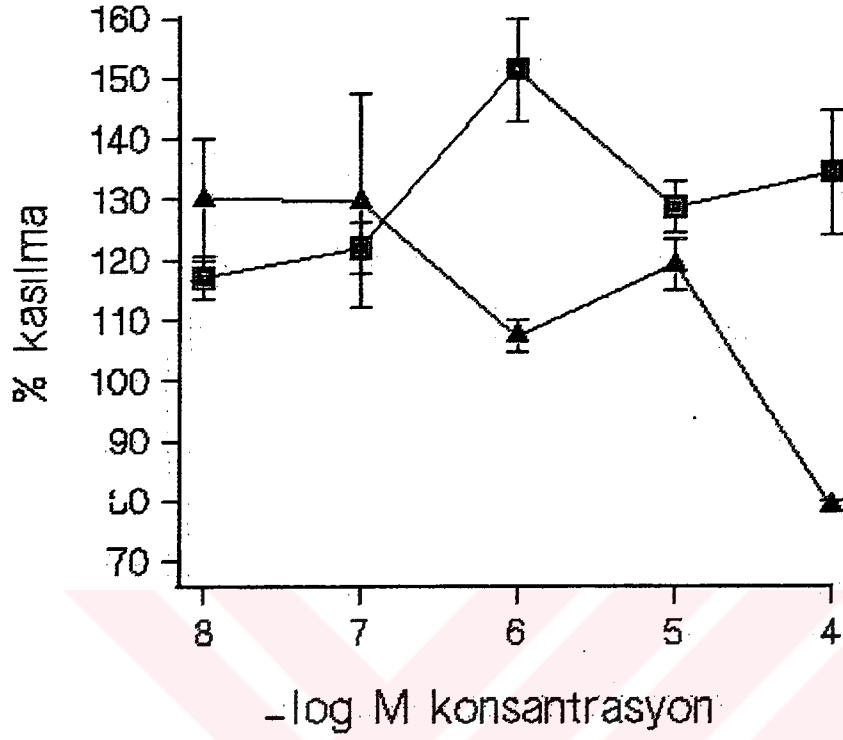
Şekil 7. Kontrol sıçan mesanesinde 5-HT (■) ve 5-CT (▲)'ye ait doz-yanıt eğrileri.

5-HT_{1A} agonisti 8-OH-DPAT (10^{-8} - 10^{-4} M), EAS'na verilen kasılma yanıtları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadı ($pEC_{50}=7.27\pm0.7$, şekil 8).



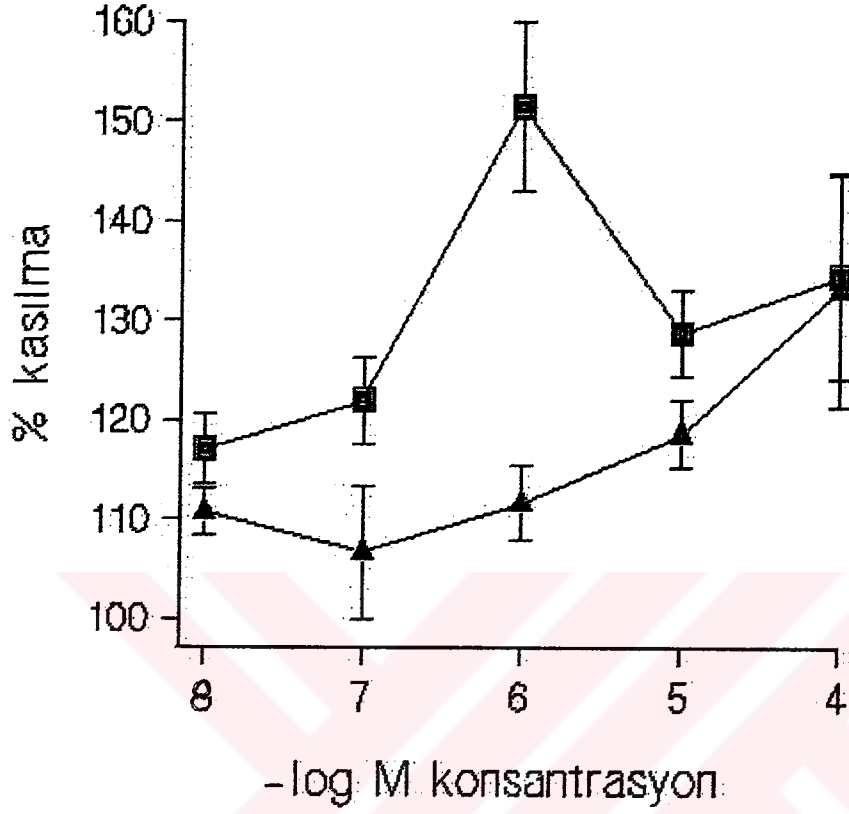
Şekil 8. Kontrol sıçan mesanesinde 5-HT (■) ve 8-OH-DPAT (▲) 'ye ait doz-yanıt eğrileri.

5-HT₂ agonisti DOI (10^{-8} - 10^{-4} M), EAS'na verilen kasılma yanıtları üzerinde inhibisyona neden oldu ($pEC_{50}=4.4\pm0.5$, şekil 9).



Şekil 9. Kontrol sıçan mesanesinde 5-HT (■) ve DOI (▲)'ye ait doz-yanıt eğrileri.

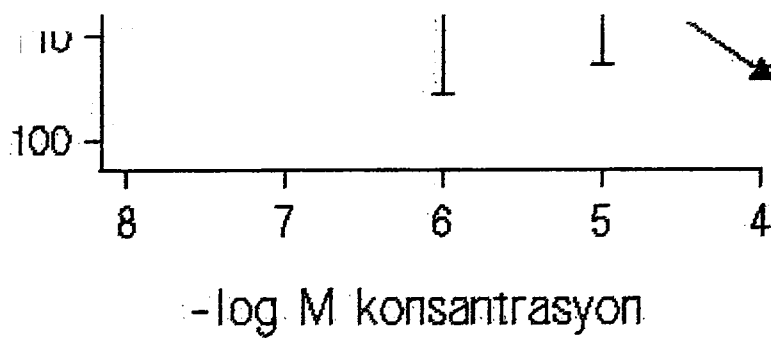
5-HT₃ agonisti 2-metil-5-HT (10^{-8} – 10^{-4} M), EAS'na verilen kasılma yanıtları üzerinde doza bağımlı olarak potansiyalizasyon oluşturdu ($pEC_{50}=4.67\pm0.3$, şekil 10).



Şekil 10. Kontrol sıçan mesanesinde 5-HT (■) ve 2-metil-5-HT (▲)'ye ait doz-yanıt eğrileri.

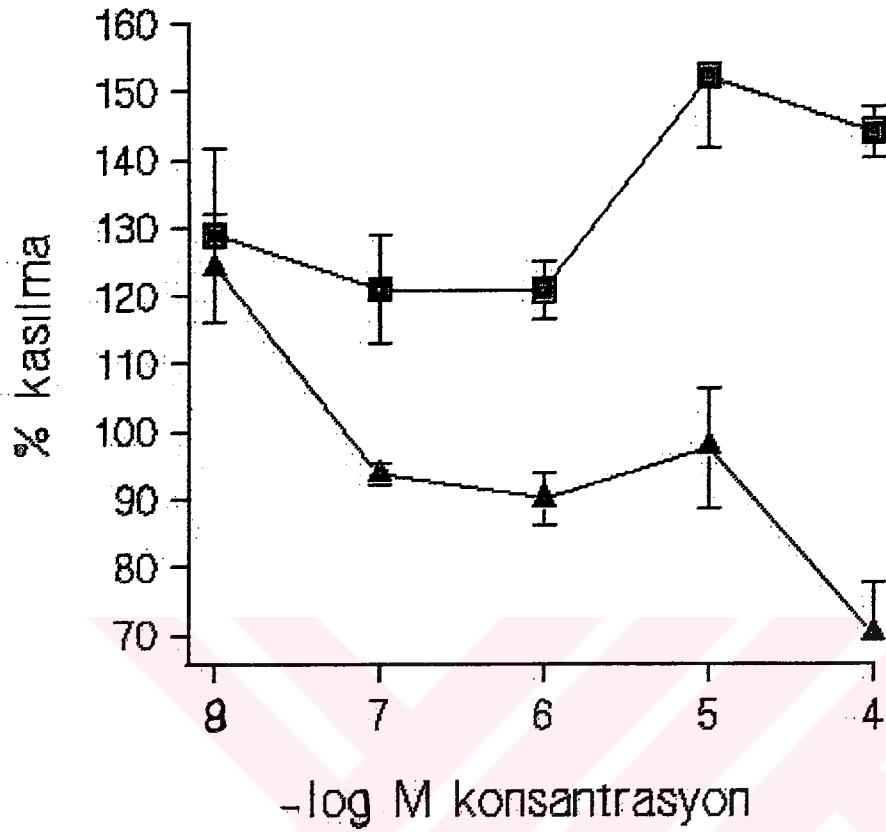
C.2. Diabet grubu

5-HT₁ agonisti 5-CT (10^{-8} - 10^{-4} M), EAS'na verilen kasılma yanıtları üzerinde doza bağımlı olarak inhibisyon oluşturdu ($pEC_{50}=4.7\pm 0.9$, şekil 11).



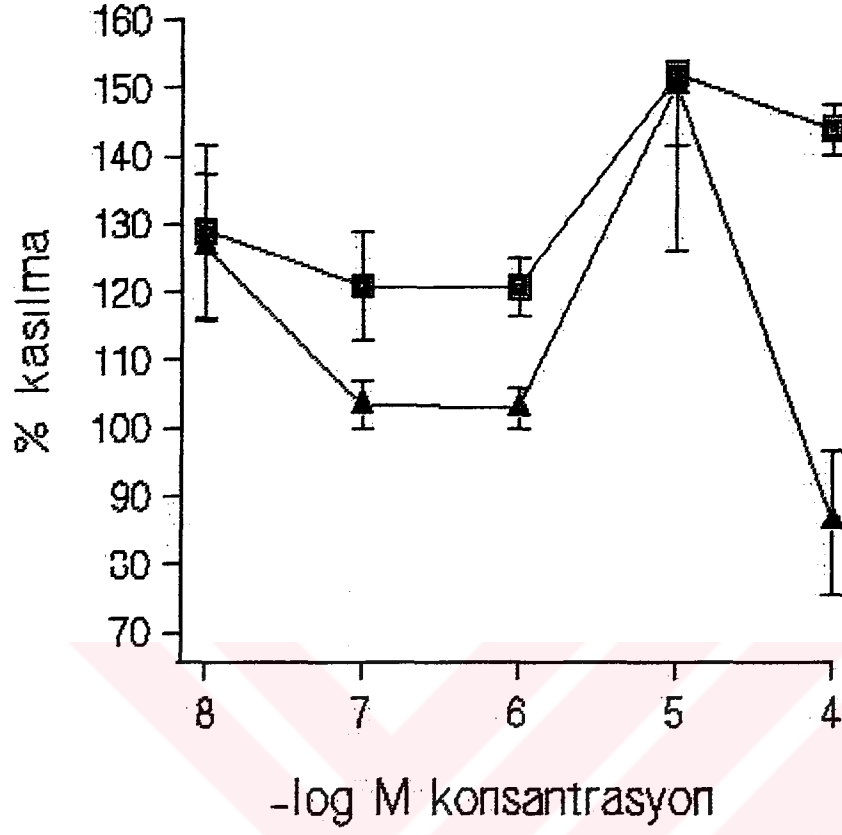
Şekil 11. Diabetik sıçan mesanesinde 5-HT (■) ve 5-CT (▲)'ye ait doz-yanıt eğrileri.

5-HT_{1A} agonisti 8-OH-DPAT (10^{-8} - 10^{-4} M), EAS'na verilen kasılma yanıtları üzerinde doza bağımlı olarak inhibisyon oluşturdu ($pEC_{50}=7.15\pm0.6$, şekil 12).



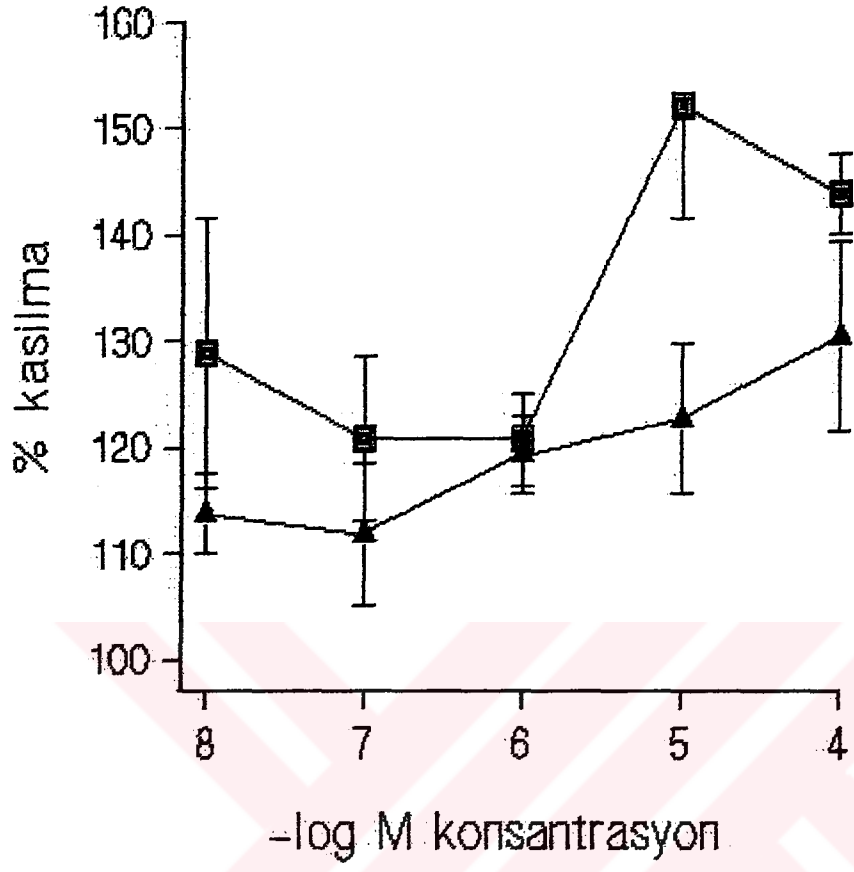
Şekil 12. Diabetik sıçan mesanesinde 5-HT (■) ve 8-OH-DPAT (▲)'ye ait doz-yanıt eğrileri.

5-HT₂ agonisti DOI (10⁻⁸ - 10⁻⁴ M), EAS'na verilen kasılma yanıtları üzerinde doza bağımlı olarak 5-HT yanıtlarına benzer şekilde etki oluştururken 10⁻⁴ M dozda belirgin bir inhibisyona neden oldu (pEC₅₀=7.1±0.8, şekil 13).



Şekil 13. Diabetik sıçan mesanesinde 5-HT (■) ve DOI (▲)'ye ait doz-yanıt eğrileri.

5-HT₃ agonisti 2-metil-5-HT (10^{-8} - 10^{-4} M), EAS'na verilen kasılma yanıtları üzerinde doza bağımlı olarak potansiyalizasyon oluşturdu ($pEC_{50}=5.27\pm0.2$, şekil 14).



Şekil 14. Diabetik sıçan mesanesinde 5-HT (■) ve 2-metil-5-HT (▲)'ye ait doz-yanıt eğrileri.

V.TARTIŞMA

1952 yılında Erspamer'in köpeklerde 5-HT'nin miksiyonu uyarıcı etkisini göstermesinden bu yana, sıçan ve insan dahil birçok memelide 5-HT'nin izole mesane preparatlarında kasıcı etki oluşturduğu gösterilmiştir (13,16,72). Bizim çalışmamızda da kontrol izole longitudinal mesane şeritlerine kümülatif olarak uygulanan 5-HT (10^{-8} - 10^{-4} M) doza bağımlı olarak kasılma yanıtı oluşturmuştur ($pD_2=8.28\pm 2.5$). 5-HT'nin izole mesane preparatları üzerindeki kasıcı etkisinin direkt olarak mesane kaslarını uyarmasına ve/veya indirekt olarak otonomik eksitator innervasyon üzerindeki etkisine bağlı olabileceği bildirilmiştir (13,15,65). 5-HT'nin direkt kasıcı etkisi birçok türde kısmen de olsa 5-HT_{2A} reseptörleri aracılığı ile oluşurken, indirekt etkisine ise (kedi ve tavşanlarda) nöral 5-HT₃ reseptörlerinin aracılık ettiği bildirilmiştir (13).

Sıçan mesanesinde EAS'na verilen yanıtın bifazik olduğu ve ilk fazın pürinerjik sistemin, ikinci fazın ise kolinerjik sinirlerin uyarılmasına bağlı olduğu bildirilmiştir (10,66-71,73,74). Yapılan bir çok çalışmada, izole diabetik sıçan mesanesinde EAS ve kasıcı ajanların daha fazla kasılma yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir (10, 39). Diabetik sıçan mesanesindeki artmış bu kasılma yanıtının mesane uyarılabilirliğindeki artışa veya spesifik reseptör sayısında veya reseptör sonrası olaylardaki değişikliklere bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre de izole diabetik sıçan mesanesinde EAS sonucu oluşan kasılma yanıtları önceki çalışmalarla benzer şekilde artmış olarak bulunmuştur.

Diabetik sıçan mesanesinde EAS'na verilen bifazik yanıtın, büyük oranda ikinci faz (tonik bölüm) ile oluştuğu bildirilmiştir. Bu hipotezi destekler şekilde, Luheshi ve Zar (1990) atropin varlığında EAS'ye verilen yanıtın diabetik sıçanlarda daha az olduğunu göstermişlerdir (10). Yapılan bir çok çalışmada da artmış yanıtın kolinerjik komponentin artmasına bağlı olduğu gösterilmiştir (10,39,66). Ayrıca diabetik sıçanların mesanelerinde muskarinik reseptörlerin sayısında ve sinaptosomal asetilkolin düzeyinde anlamlı artış olduğu ileri sürülmüştür (40,47). İnsan izole mesane preparatlarında 5-HT'nin kavşak öncesi 5-HT₄ reseptörleri üzerinden nöromusküler kolinerjik aşırımı artırdığı da gösterilmiştir (39,66). Bildirilen bu sonuçlara karşın, bizim çalışmamızda atropinin 5-HT ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmaması, EAS uygulanan izole mesane şeritlerinde 5-HT'nin oluşturduğu kasılma yanıtında kolinerjik komponentin etkisinin olmadığını, izole mesane düz kaslarındaki reseptörleri aracılığı ile kasıcı yanıtı neden olduğunu göstermektedir (69,72).

Fare, kobay ve insan detrüsör kaslarında 5-HT'nin EAS'ye kasıcı yanıtları artırdığı gösterilmiştir (13,14,47). 5-HT'nin bu etkisi farede nöral 5-HT_{1B} ve 5-HT₂ reseptörleri ile oluşurken, kobayda 5-HT_{2A}, 5-HT₃ ve 5-HT₄ reseptörleri aracılığı ile oluşmaktadır. Kobay ve insan mesane preparatlarında EAS üzerine uygulanan 5-HT'nin bifazik yanıt oluşturduğu tespit edilmiştir (14,16,65,72). İnsan izole mesane şeritlerinde 0.1nM-1µM konsantrasyonlardaki 5-HT'nin EAS ile oluşan kasıcı yanıtı atipik 5-HT reseptörleri (14) veya 5-HT₄ reseptörleri (16) aracılığı ile artırdığı, daha yüksek konsantrasyonlarda ise olasılıkla 5-HT_{1benzeri} reseptörler aracılığı ile inhibe ettiği gösterilmiştir (14). Corsi ve ark.nın bu sonuçları ile uyumlu olarak çalışmamızda 5-HT'nin düşük konsantrasyonlarda EAS'na yanıtları potansiyalize ettiğini, yüksek

konsantrasyonlarda ise inhibisyona neden olduğunu saptadık. 5-HT'nin neden olduğu bu etkilere aracılık eden reseptörleri saptamak üzere yaptığımız çalışmaların bir bölümünde, izole sıçan mesane preparatlarında EAS üzerine nonkümülatif olarak uygulanan 5-HT'ye ait tekrarlanabilir kasıcı yanıtların, TTX ile inhibe olduğu ancak atropine dirençli olduğu belirlenmesi ve yine 5-HT₃ reseptör agonisti 2-metil-5-HT'nin hem kontrol, hem diabetik grupta EAS yanıtlarını artırıcı etki göstermesi, 5-HT'nin EAS yanıtlarını potansiyalize edici etkisine olasılıkla 5-HT₃ reseptörlerinin aracılık ettiğini desteklemektedir. 5-HT ile izole mesane şeritlerinde oluşan bifazik yanıtın inhibisyon komponentinden ise sorumlu olan reseptör alt tipinin kontrol ve diabetik grupta farklılık gösterdiğine dair kanıtlar elde edilmiştir. 5-HT₂ agonisti DOI'nin kontrol grubunda oluşturduğu doza bağımlı inhibisyon nedeni ile Kontrol grubunda gözlenen inhibisyon fazından 5-HT₂ reseptörlerinin sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Diabetik izole mesane şeritlerinde ise 5-HT₁ agonisti 5-CT ve 5-HT_{1A} agonisti 8-OH-DPAT'ın neden olduğu inhibisyon yanıtı nedeni ile bu grupta gözlenen inhibitör yanıtın 5-HT_{1A} reseptörlerinin sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

VI.SONUÇ

Çalışmamızın sonuçlarına göre;

1- İzole longitudinal mesane şeritlerine kümülatif olarak uygulanan 5-HT doza bağımlı olarak kasılma yanıtı oluşturmaktadır.

2- İzole diabetik sıçan mesanesinde EAS sonucu oluşan kasılma yanıtları artmaktadır.

3- EAS uygulanan izole mesane şeritlerinde 5-HT'nin oluşturduğu kasılma yanıtında kolinerjik komponentin etkisi bulunmamakta ve izole mesane düz kaslarındaki spesifik reseptörleri aracılığı ile kasıcı yanıtı neden olmaktadır.

4- 5-HT düşük konsantrasyonlarda hem kontrol hem diabetik grupta 5-HT₃ reseptörleri aracılığı ile EAS ile oluşturulan kasıcı yanıtları potansiyalize etmekte, yüksek konsantrasyonlarda ise kontrol grubunda 5-HT₂ reseptörleri, diabetik izole mesane şeritlerinde ise 5-HT_{1A} reseptörleri aracılığı ile inhibisyona neden olmaktadır.

VII.ÖZET

Deneysel diabetes mellitustaki ürodinamik değişiklikler, diabetik hastalardakine oldukça benzerdir. Diabetik nöropatiye bağlı mesane disfonksiyonun tedavisinde serotonin agonist ve antagonistlerinin yer alabilmesi için, serotoninin bu sistem üzerindeki fonksiyonlarının ayrıntılı olarak bilinmesi gerekmektedir. Serotonin, mesanedeki farmakolojik etkilerine ışık tutabilmesi düşüncesinden yola çıkarak planlanan bu çalışmada, izole sıçan mesanesinde serotoninin etkisi, etkisine aracılık eden reseptörlerin tanımlanması ve diabet gibi mesane disfonksiyonuna neden bir durumda serotonin etkisinde meydana gelebilecek değişikliklerin araştırılması için, çalışmada 65 mg/kg streptozotosin i.p. tek doz uygulanarak diabetes mellitus oluşturulan sıçanların izole mesane şeritlerine EAS uygulandı. EAS yanıtları üzerine kontrol ve diabetik grupta 5-HT ve agonistlerinin etkisi araştırıldı. Sonuçlarımıza göre, 5-HT düşük konsantrasyonlarda hem kontrol hem diabetik grupta 5-HT₃ reseptörleri aracılığı ile EAS ile oluşturulan kasıcı yanıtları potansiyalize ederken, yüksek konsantrasyonlarda kontrol grubunda 5-HT₂ reseptörleri, diabetik grupta ise 5-HT_{1A} reseptörleri aracılığı ile inhibisyona neden olmaktadır.

VIII.KAYNAKLAR

1. Yılmaz C: İnsülin sorular ve yanıtlar, 1-55, 1993.
2. Wilson JD, Foster DW: Diabetes Mellitus.Williams Textbook of Endocrinology 8th edition: 1255-1318,1992
3. Benacerraf B : Role of MHC gene products in immune regulation. Science 212: 1229-38,1981
4. Steinmetz M, Hood L : Genes of major histocompatibility complex in mouse and man. Science 222: 727-33,1983
5. Shackelford DA, Kaufman JF, Korman AJ: HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulations, gene cloning and function. Immunol Rev. 66: 133-87, 1982
6. Strominger JL: Biology of the human histocompatibility leukocyte gene system and a hypothesis regarding the generation of autoimmune diseases. J Clin Invest. 77: 1411-15, 1986
7. Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Molvig J: The HLA -IDDM association : implication for etiology and pathogenesis of IDDM. Diabetes Metab Rev. 3:779-802,1987
8. Sakurami T, ueno Y, Nagaoka K: HLA-DR specifications in Japanese with juvenile-onset insulin dependent diabetes mellitus. Diabetes 31: 105-16, 1982

9. Öztürk Y, Altan VM, Yıldızoğlu N: Effects of experimental diabetes and insülin on smooth muscle functions, *Pharmacological Reviews*, 69-107, 1996
10. Tammela TLJ, Briscoe JAK, Levin RM, Longhurts PA: Factors underlying the increased sensitivity the field stimulation of urinary bladder strips from streptozotocin-induced diabetic rats, *Br J Pharm*, 113:195-200, 1994
11. Longhurst PA, Kang J, Wein AJ, Levin RM: The influence of intravesical volume upon contractile responses of the whole bladder preparation from streptozotocin- diabetic rats. *Gen Pharmacol*. 21(5): 687-92, 1990
12. Holt SE, Cooper M, Wyllie JH: Evidence for purinegic transmission in mouse bladder and for modulation of responses to electrical stimulation by 5-hydroxytryptamine. *Eur J of Pharm*. 116:105-111, 1985
13. Candura SM, Messori E, Franceschetti GP, D'Agostino G, Vicini D, Tagliani M, Tonini M: Neural 5-HT₄ receptors in the human isolated detrusor muscle: effects of indole, benzimidazolone and substituted benzamide agonists and antagonists. *Br J Pharmacol*. 118:1965-1970, 1996
14. Corsi M, Pietra C, Toson G, Trist D, Tuccito G, Artibani W: Pharmacological analysis of 5-hydroxytryptamine effects on electrically stimulated human isolated urinary bladder. *Br J Pharmacol*. 104: 719-25, 1991

15. Ferguson D, Christopher N: Development of 5-HT analogues for bladder disorders should focus on the 5-HT₄ receptor .TIPS..17: 314-315,1996
16. Tonini M, Caandura SM: 5-HT₄ receptor agonists and bladder disorders. TIPS. 17: 314,1996
17. Tammela TL, Wein AJ, Levin RM: Effect of tetrodotoxin on the phasic and tonic responses of isolated rabbit urinary bladder smooth muscle to field stimulation. J Urol. 148(6): 1937-40,1992
18. Messori E, Rizzi CA, Candura SM, Lucchelli A, Balestra B, Tonini M: 5-Hydroxytryptamine receptors that facilitate excitatory neuromuscular transmission in the guinea-pig isolated detrusor muscle. Br J Pharmacol. 115(4): 677-83,1995
19. Waikar MV, Ford AP, Clarke DE: Evidence for an inhibitory 5-HT₄ receptor in urinary bladder of rhesus and Cynomolgus monkeys. Br J Pharmacol. 111(1): 213-8, 1994
20. Kayaalp SO: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, cilt 1, 8. baskı, 1-883, 1998
21. Kayaalp SO: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, cilt 2, 8. baskı, 883-1699, 1998
22. Hoyer D, Clarce DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharam E, Saxena PR, Humbrey PP: VII. International Union of Pharmacology

Classification on of Receptors for 5- hydroxytryptamine (serotonin),
Pharmacological Reviews, 46 (2): 157-203, 1994

23. Humbrey PP, Hartig P, Hoyer D: A proposed new nomenclature for
5-HT receptors, TIPS, 14: 233-236, 1993

24. Ford APDW, Baxter GS, Eglen RM, Clarke DE: 5-HT stimulates cAMP
formation in the tunica muscularis mucosa of the rat oesophagus via 5-
HT₄ receptors, Eur J Pharmacol 211:117-120, 1992

25. Bottazo GF, Mirakian R, Dean BM: How immunology helps to define
heterogeneity in diabetes mellitus. The Genetic of Diabetes Mellitus.
47:79-90, 1982

26. Barnett AH, Eff C, Leslie RDG: Diabetes in identical twins. A study of
200 pairs. Diabetologia 20: 87-93, 1981

27. Yoon JW, Ray UR: Perspectives on the role of viruses in insulin-
dependent diabetes. Diabetes care 8(1): 39-44, 1985

28. Helgason T, Jonasson MR : Evidence for food additive as a cause of
ketosis prone diabetes. Lancet 2:716-20, 1981

29. Karam JH, Lewitt PA, Young CW: Insulinopenic diabetes after
rodenticide (Vacor) ingestion. A unique model of acquired diabetes in
man. Diabetes 29: 971-78, 1980

30. Bendtzen K, Nerup J, Mandrup-Poulsen T : Cytotoxicity of human pl 7 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* 232: 1545-47, 1986
31. Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Dinarello CA: Human tumor necrosis factor potentiates human interleukin-1 mediated rat pancreatic β -cell toxicity. *J Immunol.* 139: 4077-82, 1987
32. Yamada K, Nonaka K, Hanafusa T: Preventive and therapeutic effects of large dose nicotinamid injections on diabetes associated with insulinitis. An observations in nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 31:749-53,1982
33. Halliwell B: Oxygen radicals and tissue injury. *Proceedings of a Brook Lodge Symposium, Apr 27-29, 1987*
34. Groop L, Miettinen A, Groop PH : Organ-specific autoimmunity with type II diabetes. *Diabetes* 37: 99-103,1988
35. Mordes JP, Desemone J, Rossini AA: The BB rat. *Diabetes metab Rev.* 3: 725-50, 1987
36. Kataoka S, Satoh J, Fujiya H: Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse : abnormalities of cellular immunity. *Diabetes* 32: 247-53, 1983
37. Tattersall RB, Fajans SS: A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes* 24:44-53,1975

38. Eika B, Levin RM, Longhurst PA: Comparison of urinary bladder function in rats with hereditary diabetes insipidus, streptozotocin-induced diabetes mellitus and nondiabetic osmotic diuresis. *J Urol.* 151(2): 496-502,1994
39. Tammela TL, Leggett RE, Levin RM, Longhurst PA: Temporal changes in micturition and bladder contractility after sucrose diuresis and streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *J Urol* 153(6): 2014-2021, 1995
40. Kitajima S: Study on the lower urinary tract function in experimental diabetic rats. *Nippon Hinyokika Gakkai zasshi.* 87(1):18-26, 1996
41. Steers WD, Mackway AM, Ciambotti J, De Groat WC: Effects of streptozotocin-induced diabetes on bladder function in the rat. *J of Urol.* 143: 1032-36,1990
42. Kudlacz EM, Gerald MC, Wallace LJ: Effects of diabetes and diuresis on contraction and relaxation mechanisms in rat urinary bladder. *Diabetes.* 38(3): 278-84, 1989
43. Malmgren A, Andersson PO, Uvelius B: Bladder function in rats with short and long term diabetes, effects of age and muscarinic blockade. *J Urol.* 142(6):1608-14, 1989
44. Eika B, Levin RM, Longhurst PA: Collagen and bladder function in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin and aminoguanidine. *J Urol.* 148(1): 167-72, 1992

45. Eika B, Levin RM, Monson FC, Murphy M, Longhurst PA: 3H-thymidine uptake by the rat urinary bladder after induction of diabetes mellitus. J Urol 150(4): 1316-20, 1993
46. Jeremy JY, Mikhailidis DP, Thompson CS, Dandona P: The effect of streptozotocin-induced diabetes on PGI₂ synthesis by the rat bladder. J of Urol. 135: 1290-92, 1986
47. Jeremy JY, Thompson CS, Mikhailidis DP: Differential changes of adrenoceptor and muscarinic receptor-linked prostacyclin synthesis by the aorta and urinary bladder of the diabetic rat. Br J Pharmacol. 108:1131-1136, 1993
48. Eika B, Lewin RM, Longhurst PA: Modulation of urinary bladder function by sex hormones in STZ-diabetic rats, J Urol, 152 (2 Pt 1): 537-43, 1994
49. Mordes JP, Rossini AA: Animal models of diabetes, Am J Med (70): 353-360, 1981
50. Vega P, Gaule C, Mancilla J: Comparison alloxan and STZ induced diabetes in rats: Differential effects on microsomal drug metabolism. Gen Pharmacol 24(2): 489-495, 1993
51. Mandrup PT: Nicotinamide treatment in the prevention of IDDM, Diabetes Metab Reviews, 9 (4): 295-309, 1993

52. Okamoto H: The role of poly(ADP-ribose) synthetase in the development of insulin-dependent diabetes and islet β -cell regeneration. *Biomed Biochim Acta* 44:15-20,1984

53. Asayama K, Kooy NW, Burn IM: Effect of vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging system in islets : decrease of islet manganosuperoxyde dismutase. *J Lab Clin Med.* 107: 459-64, 1986

54. Eirizik D, Sandler S: Function and metabolism of pancreate β -cells maintained in culture fallowing induced damage, *Pharmacol Toxicol*, 65, 163-168, 1989

55. Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Molvig J: Mechanism of pancreatic β -cell destruction in type I diabetes. *Diabetes care* 11(1): 16-23, 1988

56. Shuldiner AR: Transgenic animals, *N Eng J Med*, March 7, 653-655, 1996

57. Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y: Increase pentosidine and advanced glycation end product in plasma and synovial fluid from patients with romotoid arthritis and its relation with inflamatory markers, *Biochem Biophys Res Common*, 6, 244 (1): 45-49, 1998

58. Schaefer EM, Viard V, Morin J: A new transgenic mouse model of chronic hyperglisemia, *Diabetes*, 43, 143-153, 1994

59. Garrison JC: Histamine, Bradikinin, 5-hydroxytryptamine, and their antagonist. In Gillman AG, Rall TW, Nies AS: The Pharmacological Basis of Therapeutics, USA, Pergamon Press Inc, 8 th edition, 592-596, 1990
60. Borne RF: Serotonin: The neurotransmitter for the 90's, Drug Topics October 10, 108, 1994
61. Lecci A, Giuliani S, Santicoli P, Maggi CA: Involvement of 5-hydroxy triptamine 1A receptors in the modulation of micturition reflexes in the anesthetized rat. J Pharmacol Exp Ther. 262(1): 181-9, 1992
62. Bradley PB, Engel G, Feniuk W: Proposals of the classification and nomenclature of functional receptors for 5-HT, Neuropharmacology, 25 (6): 563-576, 1986
63. Middlemiss DN, Hutson PH: The 5-HT_{1B} receptors. Ann N Y Acad Sci. 600: 132-47, 1990
64. Üstünes L: İzole kobay ileumu preparatı. Türk Farmakoloji Derneği Eğitim Sempozyumu Dizisi, 1. Düz Kas Preparatları, TFD Yayınları, 67-117, 1993
65. Rizzi CA, Onori L, Balestra B, Tonini M: Pharmacological evaluation of the receptors mediating the action of 5-HT in the guinea-pig isolated urinary bladder. Eur.J.Pharmacol. 212: 225-229,1992
66. Dveksler G, Franchi AM, Gonzalez ET, Gimeno MA, Gimeno AL: Electrical field stimulation alters the outputs of prostaglandins from isolated rat urinary bladder preparations. Influences of papaverine and

tetradotoxin. Prostaglandins Leukot Essents Fatty Acids 36(2): 65-68,1989

67. Bo X, Burnstock G: The effects of Bay K 8644 and nifedipine on the responses of rat urinary bladder to electrical field stimulation, β,γ -methylene ATP and acetylcholine. Br J Pharmacol. 101:494-498,1990

68. Parija SC, Raviprakash V, Mishra SK : Adenosine and α,β -methylene ATP-induced differential inhibition of cholinergic and non-cholinergic neurogenic responses in rat urinary bladder. Br J Pharmacol. 102:396-400 , 1991

69. Longhurst PA, Leggett RE, Briscoe JAC: Characterization of the functional muscarinic receptors in the rat urinary bladder. Br J Pharmacol.116:2279-85,1995

70. Inoue R, Brading AF: Human, pig and guinea-pig bladder smooth muscle cells generate similar inward currents in response to purinoceptor activation. Br J Pharmacol. 103: 1840-41,1991

71. Brading AF, Williams JH: Contractile responses of smooth muscle strips from rat and guinea-pig urinary bladder to transmural stimulation: effects of atropine and α,β -methylene ATP. Br J Pharmacol. 99(3):493-498, 1990

72. Saito M, Kondo A, Kato T, Levin RM: Response of isolated human neurogenic detrusor smooth muscle to intramural nerve stimulation. Br J Urol. 72(5): 723-27,1993

73. Pinna C, Knight GE, Puglisi L, Burnstock G: Neurogenic and non-neurogenic responses in the urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 123:1281-87,1998

74. Ziganshin AU, Ralevic V, Burnstock G: Contractility of urinary bladder and vas deferens after sensory denervation by capsaicin treatment of newborn rats. *Br J Pharmacol.* 114: 166-170, 1995

