

İZOLE KOBAY MESANE KASINDA ASETİLKOLİNLE İNDÜKLENEN KONTRAKSİYONLARIN SİLDENAFİL (VİAGRA®) İLE İNHİBİSYONU: İN VİTRO ÇALIŞMA**INHIBITION OF THE ISOLATED GUINEA-PIG URINARY BLADDER CONTRACTIONS BY SILDENAFİL (VIAGRA®): IN VITRO STUDY**

Rahmi ONUR*, İrfan ORHAN*, Atilla SEMERCİÖZ*, Ahmet AYAR**

* Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ABSTRACT

Introduction: Overactive bladder is a medical condition which is characterized by an overactive detrusor, involuntary contractions and/or incontinence. This condition is usually treated medically with anticholinergics being the medication of choice in most cases. Recently, different pharmacological alternatives have been defined in the treatment of detrusor instability. Among these, phosphodiesterases which play important roles in the regulation of smooth muscle tone have been investigated in various clinical and experimental studies. In the present study, we aimed to evaluate the effects of sildenafil (Viagra®) on the agonist induced contractility of isolated Guinea-pig bladder.

Materials and Methods: A total of 10 adult Guinea-pigs weighing 400-450 gr were decapitated. Using a midline abdominal incision the bladder was found, kept intact and isolated from the surrounding tissues. All bladders were first placed into the saline solution and the strips were prepared. A 10x2 mm of isolated guinea-pig bladder strip was prepared and placed into a jacketed organ bath containing physiological solution. A passive tension of 1 gr was maintained. After the equilibration period acetylcholine (ACh) (10 µM), a strong agonist, was added into the medium and the contractions were recorded. Following the contractions, sildenafil (Viagra®) was added into the organ bath. Amplitude and frequency of contractions and area under the contraction curves were evaluated by 10-min intervals.

Results: During equilibration period, small amplitude contractions were noted. After addition of ACh into the jacketed organ bath which contains physiological saline solution, contractions with higher amplitude were observed. Mean amplitude of contractions in isolated bladder strips after ACh was 1.81 g (±0.31 SEM). Application of 0.5mM Sildenafil significantly reduced the mean amplitude of contractions and it was recorded as 0.76 g (±0.15 SEM). Similarly, use of sildenafil also reduced the frequency of contractions.

Conclusion: Urge urinary incontinence is the most common form of urinary incontinence. Antimuscarinic agents are widely used in the treatment of urgency and/or incontinence. However, they did not reach enough efficacies because of their frequent side effects. In the present study, we investigated the efficacy of sildenafil on pre-contracted isolated Guinea-pig bladder and determined that sildenafil significantly decreased both the amplitude and the frequency of bladder contractions. The results of our study support the hypothesis that phosphodiesterase inhibitors can be potentially helpful in the regulation of smooth muscle tone in various tissues. However, there is need for further studies to reveal the exact roles of sildenafil and other phosphodiesterase inhibitors in the treatment of overactive bladder.

Key words: Bladder, guinea-pig, contraction, sildenafil, inhibition

ÖZET

Aşırı aktif mesane, lokal bir patoloji ve metabolik hastalık olmaksızın, detrüsör aktivitesinde artma, istemsiz kasılma ve/veya inkontinans olarak tanımlanır. Tedavide antikolinerjik ilaçların yan etkileri çokluğu nedeniyle farklı tedavi modelleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunlar arasında, düz kas tonusu regülasyonunda önemli rol oynayan fosfodiesteraz inhibitörleri de bulunmaktadır. Bu çalışmada, sildenafilin (Viagra®) izole kobay mesane kasında agonistle indüklenen kontraksiyonlara olan etkilerini incelemeyi amaçladık.

Erişkin tipte ve ağırlıkları 400-450 gr olan toplam 10 kobay (Guinea-pig) hayvanından elde edilen izole mesane kesitleri önceden hazırlanan ve içerisinde 37°C pH 7.4 fizyolojik salin solüsyonu bulunan ve devamlı olarak %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılan ısı ceketli çift çeperli izole organ banyosunda 1 gramlık pasif istirahat gerimi sağlanarak asıldı. 10 µM asetilkolin (ACh) organ banyosuna eklenerek güçlü kasılmalar indüklendi. Agonistle indüklenen kasılma amplitüdleri ve sıklıkları ile sildenafil uygulaması sonrası kasılmalarda oluşan izometrik gerilme kayıtları 10 dakikalık aralıklarla ölçüldü.

Dergiye Geliş Tarihi: 21.10.2004

Yayına Kabul Tarihi: 05.01.2005 (Düzeltilmiş hali ile)

Asetilkolinle indüklenen izole kobay mesane kesitlerinde ortalama amplitüd (SEM), 1.81 ± 0.31 g idi. Sildenafil (0.5mM) uygulaması sonrası kasılma amplitüdü anlamlı olarak azalma gösterdi ve ortalama 0.76 ± 0.15 g olarak kaydedildi. Asetilkolinle indüklenen izole kobay mesane kasına sildenafil uygulanması ile kasılma frekansında da anlamlı azalma izlendi.

İn vitro sildenafil uygulaması ile detrüör kasılmaları amplitüdünde düşme ve kasılma sıklığında azalma meydana gelişi, fosfodiesteraz inhibitörlerinin aşırı aktif mesane ve detrüör instabilitesi tedavisinde potansiyel tedavi metodları arasında yer alabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Mesane, kobay, kasılma, sildenafil, inhibisyon

GİRİŞ

Üriner inkontinans olgularının %50-70'ini oluşturan urge (sıkıştırma) inkontinans, yaşam kalitesini önemli oranda azaltan ürolojik bir patolojidir^{1,2}. Urge inkontinans tedavisinde en çok kabul gören farmakolojik tedavi ise antikolinergik ajanlardır. Ancak muskarinik reseptör blokerleri yeterli doku selektivitesi göstermediklerinden klinik uygulamalarda pek çok yan etki ortaya çıkmakta; bu da tedaviye uyumu %30'lara düşürmektedir^{1,3}. Son yıllarda, detrüör instabilitesinin farmakolojik tedavisinde farklı tedavi modelleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunlar arasında, düz kas tonusu regülasyonunda önemli rol oynayan ve farklı dokularda farklı izoenzimlerle etkin olan fosfodiesteraz inhibitörleri, klinik ve deneysel pek çok çalışmada incelenmektedir⁴⁻⁶.

Fosfodiesteraz (FDE) inhibitörleri, ikincil haberciler olan siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) yolu ile damar, korpus kavernozum ve trakea'daki farklı düz kasları etkileme özelliğine sahiptirler⁷⁻⁹. İnsan, domuz ve tavşan detrüör kasında cAMP yolu ile relaksasyonların gerçekleştirildiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiş ancak detrüör-cGMP ilişkisi farklı türdeki canlılarda tam olarak ortaya konulmamıştır⁵. Cartledge ve Eardley, fosfodiesteraz tip 5'in düz kas gevşemesinin önemli bir düzenleyicisi olduklarını bildirmişlerdir¹⁰. Fosfodiesteraz izoenzim tip 5'in spesifik inhibitörü olan sildenafil ile yapılan çalışmalarda, sildenafille kavernoza dokudaki gevşemenin yanı sıra rat uterus tonusunda azalma, pulmoner damar genişlemesi ve tavşan detrüör gevşemesini sağlanabileceği de bildirilmiştir⁴⁻⁶. Bu deneysel çalışmada, sildenafilin (Viagra®) izole kobay mesane kasında agonist ile indüklenen kontraksiyonlara olan etkilerini incelemeyi amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada uygulanan protokol Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Deney hayvanları ve Detrüör Doku hazırlanması: Erişkin tipte ve ağırlıkları 400-450 gr olan toplam 10 kobay (Guinea-pig) hayvanı dekapite edildi. Abdominal insizyonla mesane çevre dokulardan ayrıldı ve intakt olarak dışarıya alınarak daha önceden özel olarak hazırlanmış fizyolojik salin solüsyonuna (FSS) konuldu. Bu solüsyon içeriğinde (mM); NaCl 120, KCl 5.9, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.1, NaHCO₃ 15, NaH₂PO₄ 1.2, glukoz 11 ve HEPES 10 mevcuttu.

Solüsyon içerisindeki izole kobay mesanesinden longitudinal olarak 10 mm uzunluğunda ve 2 mm genişliğinde detrüör stripleri hazırlandı. Kesitler üzerindeki yağ ve bağ dokuları dikkatli diseksiyonla ayrıştırıldı. Hazırlanan kobay mesane kesitleri daha sonra içerisinde 37°C pH 7.4 fizyolojik salin solüsyonu bulunan ve devamlı olarak %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılan ısı ceketli çift çeperli izole organ banyosunda 1 gramlık pasif istirahat gerimi sağlanarak asıldı.

İzovolumetrik kontraksiyonlar: Hazırlanan detrüör kesitleri istirahat geriminde 60 dakika süre ile denge açısından bekletildi. Bu süre içerisinde her 10 dakikada bir FSS değiştirildi. Uyum periyodu sonrası kesitlerde düşük amplitüdü spontan kasılmalar izlendi ve daha sonra bir agonist olan asetilkolin (ACh) (10 µM) organ banyosuna eklenerek güçlü kasılmalar indüklendi. Asetilkolinle elde edilen kasılmalar Ossilograf (Harvard Apparatus Ltd, Kent, İngiltere) aracılığı ile yazdırılarak ölçüm ve değerlendirmeler bu kayıtlar üzerinde yapıldı. Kasılma amplitüdüleri gram (g) olarak, frekansları ise kasılma sayısı/10 dakika olarak hesaplandı. Agonist ile indüklenen kasılma amplitüdüleri ve sıklıkları ile sildenafil uygulaması sonrası kasılmalarda oluşan izomet-

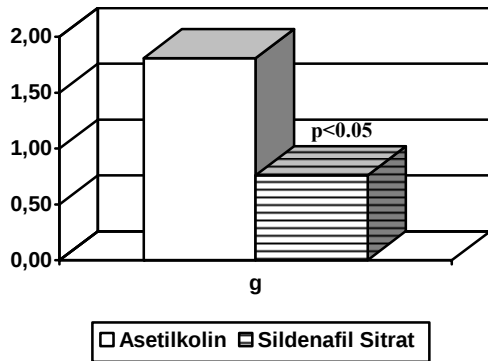
rik gerilme kayıtları 10 dakikalık aralıklarla ölçüldü.

Sildenafil uygulaması: Sildenafil, saf olarak üretici firma (Pfizer, ABD) tarafından çalışmamızda özel olarak kullanılmak üzere sağlandı. Toz halindeki sildenafil, FSS'de çözünür hale getirilerek organ banyosuna eklendi.

İstatistiksel analiz: Tüm istatistiksel analizler Microcal Origin 5.00 (Microcal Software Inc, Northampton, MA) programı kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

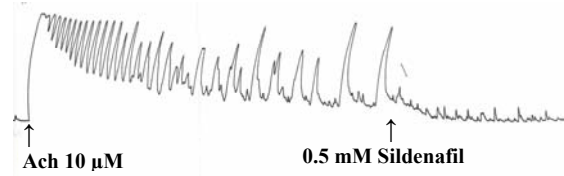
İstirahat geriminde bekletilen detrüör kesitlerinde düşük amplitüdü spontan kasılmaların olduğu izlendi. Organ banyosuna $10 \mu\text{M}$ konsantrasyonda uygulanan Ach ile güçlü detrüör kasılmaları elde edildi (Şekil 1). Bu uygulama ile elde edilen kontraksiyonlar ve sildenafil ile verilen cevabın ölçümünde kasılma eğrileri altında kalan alan esas olarak alındı. Asetilkolinle indüklenen kontraksiyonların ortalama amplitüdü (SEM) 1.81 ± 0.31 g idi. 0.5 mM Sildenafil (Viagra®) uygulaması sonrasında ise kasılma amplitüdü anlamlı olarak azalma gösterdi ve ortalama 0.76 ± 0.15 g olarak kaydedildi. Asetilkolinle indüklenen izole kobay mesane kasına sildenafil (Viagra®) uygulanması ile kasılmanın anlamlı olarak inhibe edildiği görüldü (Şekil 1).



Şekil 1. İzole kobay mesane kasında Asetilkolin ve sildenafil (Viagra®) uygulamalarının karşılaştırılması (g: gram, $p < 0.05$: İstatistiksel olarak anlamlı)

Şekil 2'de Ach'le elde edilen güçlü kobay detrüör kontraksiyonlarındaki sıklık ve daha sonra sildenafil (Viagra®) uygulaması ile bu kontraksiyonlardaki inhibisyon görülmektedir.

Asetilkolinle indüklenen kontraksiyonların frekansında da 0.5 mM sildenafil sonrası %34 oranında azalma saptandı.



Şekil 2. İzole kobay mesane kasında asetilkolinle indüklenen mesane kasılması ve sildenafil (Viagra®) uygulanması ile kasılma amplitüdü ve frekansında anlamlı azalma (Orjinal trase)

TARTIŞMA

Fosfodiesteraz (FDE) inhibitörleri, düz kas tonusunda düzenleyici rol oynamaları nedeni ile günümüzde farklı patolojilerde yaygın olarak araştırılan moleküllerdir³. Son yıllarda FDE inhibitörlerinin konjestif kalp yetmezliği, romatolojik hastalıklar, astım, koagülopati, depresyon, üriner sistem taş hastalığı, erektil disfonksiyon ve mesane çıkım obstrüksiyonuna bağlı oluşan alt üriner sistem semptomlarının tedavisinde etkili olduklarına dair çalışmalar mevcuttur¹¹⁻¹³. FDE inhibitörlerinin etkili oldukları bir başka konu ise düz kastır. Düz kas relaksasyonunda en önemli iki mediatör cAMP ve cGMP'dir¹⁴. Mesane detrüör gevşemesinde de cAMP ve cGMP önemli rol oynar ve ortamda artmış cAMP ve cGMP bulunması, intrasellüler serbest kalsiyumu düşürerek düz kas relaksasyonu sağlar yada relaksasyonu devam ettirir³. cAMP ve cGMP'nin 5'-nükleotid monofosfatlara çevrilerek inaktive edilmeleri fosfodiesterazlar yolu ile olur ve sonuçta intrasellüler kalsiyum (Ca^{2+}) düzeyi artarak düz kaslarda kasılma meydana gelir. Dolayısıyla; intrasellüler düzeyde gevşeme/kasılma dengesinin sağlanmasında önemli mediyatörlerden biri FDE enzim kompleksidir³.

FDE izoenzimlerine yönelik inhibitörler farklı tipteki düz kasların relaksasyonunda kullanılmaktadırlar³. FDE inhibisyonu ile düz kaslarda oluşan relaksasyonda çeşitli mekanizmalar söz konusudur. FDE inhibisyonu ile intrasellüler cAMP ve cGMP artışı sağlanır. Artmış cAMP ve cGMP, intrasellüler Ca^{2+} azalmasına, Ca^{2+} konsantrasyonundaki azalma ile voltaj bağımlı K^+ kanallarının açılarak hücre membranında hiperpolarizasyon ve buna bağlı gevşemeye yol açar.

Aynı şekilde, cGMP'ye bağımlı protein kinazın intrasellüler proteinleri fosforillemesi ile de gevşeme oluşur. Diğer mekanizmalar arasında; protein kinazın membran üzerindeki Ca^{2+} kanallarını direk inhibe ederek hücre içine Ca^{2+} girişini engellemesi, hücre dışına Ca^{2+} atılımını sağlayan Ca^{2+} /ATPase pompasının cGMP yolu ile aktivasyonu, Ca^{2+} 'nin hücre içinde artışına yol açan inositol trifosfat (IP_3) reseptörlerinin inhibisyonu ve IP_3 üretiminin azaltılması, artmış cGMP yolu ile kontraktıl sistemin Ca^{2+} 'ye karşı desensitizasyonu düz kaslarda cGMP ve FDE inhibisyonu ile gerçekleşen gevşemenin başlıca mekanizmalarıdır.¹⁴

İzole organ banyosunda tavşan detrüör kası üzerinde bir agonist ajan olan karbakol ile yapılan çalışmalarda, tavşan detrüör kasında FDE tip 1'den tip 5'e kadar olan tüm izoenzimler saptanmış ve relaksasyonun cAMP yolu ile olduğu bildirilmiştir⁵. İn vitro insan üreteral düz kas tonusunun farklı tipteki FDE inhibitörlerine olan yanıtlarının incelendiği diğer bir çalışmada ise; KCl ile indüklenen kasılmaların FDE tip 4 ve tip 5 inhibitörleri tarafından anlamlı olarak azaltıldığı saptanmıştır¹⁵. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda; tip 5 FDE inhibitörü olan sildenafilin penil korpus kavernoza dokusu üzerindeki anlamlı vazodilatör etkileri yanı sıra, diğer düz kas dokularında da relaksasyon sağlama özelliğinde olduğu bildirilmiştir^{4,16}. Bunlar arasında; özafagus kontraktilesinde azalma, özafagus sfinkter tonusunda düşme, oral uygulama ile güçlü ve selektif pulmoner vazodilatasyon, pulmoner arter basıncında azalma, konjestif kalp yetmezliğinde iyileşme ve portopulmoner hipertansiyona bağlı karaciğer transplantasyonunda oluşturduğu ilave yararlar sayılabilir^{17,18}. Prostaglandin E_2 , oksitosin ve Ach gibi farklı stimulanlarla elde edilen in vitro uterus kasılmalarında sildenafil (30 ve 100nM) uygulaması ile her üç stimulanla oluşturulan kontraksiyonların inhibe edildiği bildirilmiştir⁴. Sildenafilin uterus üzerindeki bu gevşetici etkisinin konsantrasyona bağlı olduğu ve primer olarak cGMP yolu ile gevşeme sağladığı öne sürülmüştür⁴. Çalışmamızda da in vitro kobay mesane kesitlerinde agonist ile indüklenen kasılmaların sildenafil ile anlamlı olarak azaltıldığı literatürde ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca, sildenafil ile detrüör kasılma frekansında da %34 oranında azalma saptandı.

SONUÇ

Urge üriner inkontinans ve/veya detrüör instabilitesi üriner inkontinansın en sık saptanan formudur^{1,2}. Antimuskarinik ajanlarla uygulanan tedavi metodları urge üriner inkontinans ta yan etkilerinin çokluğu nedeni ile istenilen etkinlikte değildir. Çalışmamızda, izole kobay mesane detrüör kesitlerinde bir FDE izoenzim inhibitörü olan sildenafilin (Viagra®) detrüör kasılmalarını amplitüd ve frekans olarak anlamlı olarak inhibe ettiği saptandı. İn vitro sildenafil uygulaması ile detrüör kasılmalarında amplitüdde düşme ve kasılma sıklığında azalma meydana geliş, FDE inhibitörlerinin aşırı aktif mesane ve detrüör instabilitesi tedavisinde potansiyel tedavi metodları arasında yer alabileceğini desteklemektedir. Sildenafil (Viagra®) ve diğer FDE inhibitörlerinin mesane kontraktilesi ve aşırı aktif mesane tedavisindeki rollerini saptayacak daha geniş serili klinik ve deneysel çalışmalarla yeni tedavi alternatifleri gündeme gelebilecektir.

KAYNAKLAR

- 1- **Woods M, Carson N, Norton NW, Sheldon JH, Argentieri TM:** Efficacy of the β_3 -adrenergic receptor agonist CL-316243 on experimental bladder hyperreflexia and detrusor instability in the rat. *J Urol.* 166: 1142-1147, 2001.
- 2- **Ergen A, Arıkan N, Arslan M:** Jinekolojik Üroloji. "Temel Üroloji" Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N (edt): Güneş Kitabevi, Ankara, 411-447, 1998.
- 3- **Truss MC, Stief CG, Ückert S, et al:** Phosphodiesterase 1 inhibition in the treatment of lower urinary tract dysfunction: From bench to bedside. *World J Urol.* 19: 344-350, 2001.
- 4- **Agha AM, Taha RA:** Sildenafil inhibits agonist-evoked rat uterine contractility: Influence of guanylyl cyclase inhibition. *Eur J Pharmacol.* 428: 343-348, 2001.
- 5- **Qiu Y, Kraft P, Craig EC, Liu X, Haynes-Johnson D:** Cyclic nucleotide phosphodiesterases in rabbit detrusor smooth muscle. *Urology.* 59: 145-149, 2002.
- 6- **Michelakis E, Tymchak W, Lien D, et al:** Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 105: 2398-2403, 2002.
- 7- **Torphy JT, Cieslinski LB:** Characterization and selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes in canine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 37: 206-214, 1989.

- 8- **Eardley I:** The role of phosphodiesterase inhibitors in impotence. *Exp Opin Invest Drugs.* 6: 1803-1810. 1997.
- 9- **Polson JB, Strada SJ:** Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36: 403-427. 1996.
- 10- **Cartledge J, Eardley I:** Sildenafil. *Expert Opin Pharmacotherm.* 1: 137-147. 1999.
- 11- **Hall IP:** Isoenzyme selective phosphodiesterase inhibitors: Potential clinical uses. *Br J Clin Pharmacol.* 35: 1-7. 1993.
- 12- **Nicholson CD, Challiss RA, Shahid M:** Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci.* 12: 19-27. 1991.
- 13- **Schudt C, Dent G, Rabe KF:** Phosphodiesterase inhibitors. In: Page E (ed). *The handbook of immunopharmacology.* Academic Press, London. 1996.
- 14- **Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP:** Molecular mechanism of cGMP mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 184: 409-420. 2000.
- 15- **Kühn R, Ückert S, Stief CG, et al:** Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide-dependent pathways. *Urol Res.* 28: 110-115. 2000.
- 16- **Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, et al:** Sildenafil: An orally active type-5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 8: 47-52. 1996.
- 17- **Makisalo H, Koivusalo A, Vakkuri A, Hockerstedt K:** Sildenafil for portopulmonary hypertension in a patient undergoing liver transplantation. *Liver Transpl.* 10: 945-950. 2004.
- 18- **Bortolotti M, Mari C, Lopilato C, La Rovera L, Miglioli M:** Sildenafil inhibits gastroduodenal motility. *Aliment Pharmacol Ther.* 15: 157-161. 2001.