

Diazepam ve baklofenin kobaylarda sidik kesesi düz kası üzerine etkileri*

Murat SERT¹, İlsin PİŞKİN²

¹Ankara Üniversitesi, Sağlık Kültür ve Spor Dairesi Başkanlığı, Ankara; ²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fiziyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Özet: Bu araştırmada, diazepam ve baklofenin kobaylarda sidik kesesi düz kası üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada 250-300 gram ağırlığında 15 kobaydan izole edilen her bir sidik kesesinden hazırlanan şerit şeklinde preparatlar, içerisinde "Tyrode" çözeltisi bulunan organ banyosuna yerleştirildi. Asetilkolinin (ACh) yalnız (10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 10^{-4} M), diazepam (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) ve baklofenin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında denemesiyle oluşturduğu cevaplar alındı. Sidik kesesi düz kasında ACh'nin üç farklı konsantrasyonunun oluşturduğu cevapların amplitütlerinde, en büyük kasılımları 10^{-4} M'lık ACh'nin verdiği belirlendi. Diazepamın en yüksek dozunun (10^{-4} M) varlığında ACh'nin farklı üç konsantrasyonuna alınan cevapların, ACh'nin yalnız kullanılmasına göre kasılımları %60-75 oranında azalttığı tespit edildi. Latent sürelerde ise ACh'nin iki dozuna (10^{-5} M, 3×10^{-5} M) göre en büyük derişiminin (10^{-4} M) verdiği cevap süresinin %59-64 kısaldığı görüldü. Diazepamın (10^{-4} M), kobay sidik kesesi düz kası kasılımlarını, artan ACh konsantrasyonu ile yarışmalı bir şekilde baskılayabildiği saptandı. Baklofenin üç farklı dozunun varlığında, ACh'nin üç farklı derişiminin oluşturduğu cevaplarda ise ACh'nin yalnız denemesine göre hem latent süreler hem de kasılımlarda önemli farklılığın bulunmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak, *in vitro* koşullarda kobay sidik kesesi düz kasında ACh kaynaklı kasılımları diazepamın doza bağlı olarak inhibe ettiği, baklofenin ise bu kasılımları etkilemediği belirlendi.

Anahtar sözcükler: Baklofen, diazepam, düz kas, kobay, sidik kesesi

The effects of diazepam and baclofen on the smooth muscle of urinary bladder in guinea pigs

Summary: This study was carried out to observe the effects of diazepam and baclofen on the urinary bladder smooth muscle of guinea pigs. In the study, 15 guinea pigs weighing 250-300 g were used. The ribbon-like tissue samples were prepared from the isolated urinary bladder. The tissue strips were placed into the isolated organ bath as in Tyrode solution. The contractions were induced by acetylcholine (ACh) at the concentrations of 10^{-5} M, 3×10^{-5} M and 10^{-4} M alone and in the presences of diazepam and baclofen at the concentrations 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M and 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M respectively. As a result, it was observed that of ACh after using at three different concentrations on the urinary bladder, the biggest contraction was obtained with 10^{-4} M ACh. On the other hand, the contraction responses obtained with acetylcholine at three different concentrations in the presence of the highest concentration of diazepam (10^{-4} M) were decreased at the rate of 60-75% compared to those obtained in using ACh in same concentrations alone. In the matter of latent duration, it was decreased with 10^{-4} M ACh at the rate of 59-64% compared to the other doses (3×10^{-5} M and 10^{-4} M). It was noticed that diazepam (10^{-4} M) could decrease the motility of urinary bladder by competing with increased concentrations of ACh. On the other hand, there were not significant differences between using ACh at three different concentrations alone and in the presence of three concentrations of baclofen in both latent durations and amplitudes. As a conclusion, it was observed that diazepam inhibits ACh-induced contractions in the smooth muscle of urinary bladder of guinea pig *in vitro* depending on its concentrations, while baclofen at three different concentrations does not affect those contractions.

Key words: Baclofen, diazepam, guinea pig, smooth muscle, urinary bladder

Giriş

Diazepam, son yıllarda bütün dünyada veteriner hekimlikte kedi, köpek, sığır, koyun ve atlarda, preanestezik, kas gevşetici, iştah artırıcı, nöroleptik ağrı kesici, sakinleştirici etkinliğiyle hayvanların daha uysal hale gelmelerini sağlamak amacıyla yatıştırıcı olarak ve üretral tıkanma ile üretra büzgeci tonusunun arttığı durumların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca yabani memelilerin hareketsiz bırakılarak yakalanmaları ile

bunların sağaltım ve zoolojik işlemlerini kolaylaştırma, hareketsiz kılıcı madde olarak yararlanılmaktadır (1,3,4,9). Bundan başka insanlarda geniş ölçekli kas gevşetici, antikonvülzan, anksiyolitik ve hipnotik amaçlarla uygulandığı da bilinmektedir (7,8,19).

Diazepam, merkezi benzodiazepin bağlanma bölgesine bağlanarak gama amino butirik asit (GABA) reseptörü ile birleşmekte ve GABA'nın reseptör ayarlayıcı cevabını güçlendirmektedir. Enterik gabaerjik nöronlar

* Bu araştırma aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir.

gibi sidik kesesinde bulunan hem muskarinik hem de adrenerjik reseptörlerin sidik kesesinden salınan GABA'yı inhibe ettiği bildirilmektedir. Muskarinik reseptörlerin beş tipi tanımlanmıştır, ancak M₁ reseptör tipinin GABA salınımını düzenleyen, GABA_A reseptöre uygunluk gösterdiği saptanmıştır. GABA_A reseptör kompleksinin α alt birimi üzerinde benzodiazepin reseptörleri bağlanma bölgesi bulunmaktadır (2,3,11,13,22).

Baklofen, çizgili kaslarda spazm, rijidite ve klonus ile birlikte olan nörolojik hastalıkların sağaltımında kullanılmak için çıkarılmış oldukça yeni bir ilaçtır. Bu amaçla, multipl sikleroz, spazmatik spinal felç, omurilik kompresyonu ve serebral kaynaklı kas spazmlarına karşı ve sidik kesesi eksternal sfinkterinin spazmına bağlı idrar retansiyonunun tedavisinde kullanılmaktadır (1,15,16,18, 21). Kusunoki ve ark. (13) kobay sidik kesesinde, endojen kaynaklı GABA'nın postganglionik kolinerjik nöronlardan salınan ACh'yi GABA_A reseptörlerinin aktivasyonu ile baskıladığını ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada, merkezi sinir sistemi etkili, aynı zamanda başlıca sidikle atıldığı bilinen çizgili kas gevşeticilerinden diazepam ile baklofenin sidik kesesi düz kası üzerine etkilerinin *in vitro* ortamda incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada, 250-350 gram ağırlığında 15 kobay kullanıldı. Hayvanlar %2.5'lük sodyum pentotal solüsyonundan 25 mg/kg periton içi uygulanarak anestezi edildi ve boyun eklemlerinin dislokasyonu ile öldürüldü. Hemen sonra karın bölgeleri makasla kesilerek açıldı ve sidik kesesine zarar verilmeden bağlantılarından ve çevre dokulardan temizlenerek çıkarıldı. İzole edilen her bir sidik kesesi "Tyrode" çözeltisi (mM cinsinden, NaCl, 136,9; KCl, 2,7; CaCl₂, 1,8; MgCl₂, 1,0; NaHCO₃, 11,9; NaH₂PO₄, 0,4; glikoz, 5,0) içerisine alındı. Sonra sidik kesesi etrafındaki mezenter ve yağ dokudan dikkatli bir şekilde temizlenerek 1.5 cm x 0.5 cm boyutlarında şerit şeklinde doku parçaları elde edildi (20). Hazırlanan bu preparatlar, 37°C sıcaklıkta ve %95 O₂ - %5 CO₂ gaz karışımı ile sürekli havalandırılan 15 ml "Tyrode" çözeltisi içerisinde olacak şekilde izole organ banyosunun kadehinde alt ve üst uçlarından bağlanarak tespit edildikten sonra izometrik düz kas hareketleri "force transducer" (Force Displacement Transducer 10-A) ve "acquisition system" (MP30 Model Biopac WSW) yardımı ile bilgisayarda görüntülenerek kaydedildi. Başlangıçta doku parçalarına 2 gramlık bir gerim uygulanarak, ortama alışmaları için en az 1 saat süreyle ve her 15 dakikada bir değiştirmek koşulu ile "Tyrode" çözeltisi içerisinde bekletildi. Bu sırada "Tyrode" ile asetilkolin (SIGMA, A-7000), diazepam (SIGMA, D-9900) ve baklofenin (SIGMA, B-5399) çözeltileri hazırlandı. Uyum süresini takiben dokunun bulunduğu çözelti içerisine asetilkolinin *in vitro* ortamda etkili olduğu bildirilen

(20), 3 farklı dozundan (10⁻⁵M, 3x10⁻⁵M ve 10⁻⁴M) önce 10⁻⁵M konsantrasyonda verildi ve cevabın alınmasından sonra "Tyrode" çözeltisi ikişer dakika arayla iki kez değiştirilerek dokunun önceki tonusuna ulaşması sağlandı. Sonra asetilkolinin 3x10⁻⁵M ve 10⁻⁴M konsantrasyonları ilave edildi, cevabın alınmasını takiben bir önceki yıkama işlemleri tekrar edilerek dokunun başlangıç gerimine kavuşması ve 10 dakika bekletilerek dinlenmesi sağlandı.

İzole organ banyosuna diazepamın literatürlerde bildirilen (1,8) 10⁻⁶M, 10⁻⁵M ve 10⁻⁴M'lık konsantrasyonlarından ilki olan 10⁻⁶M diazepam çözelti içerisine katılarak, iki dakika beklenildi, üzerine 10⁻⁵M konsantrasyonda asetilkolin eklenerek cevap alındıktan sonra "Tyrode" çözeltisi ikişer dakika arayla iki kez değiştirilerek dokunun önceki tonusuna ulaşması sağlandı. Diazepamın 10⁻⁶M'lık konsantrasyonunun çözeltiye katılmasından iki dakika sonra olacak şekilde sırasıyla asetilkolinin 3x10⁻⁵M ve 10⁻⁴M'lık konsantrasyonları ayrı ayrı eklendi ve cevabın alınmasını takiben her uygulama sonrası yıkama işlemleri tekrarlandı. Dokunun başlangıçtaki tonusuna kavuşması için 10 dakika "Tyrode" çözeltisi içerisinde bekletildi. Bu süre sonunda, diazepamın 10⁻⁵M ve 10⁻⁴M'lık konsantrasyonları varlığında asetilkolinin 10⁻⁵M, 3x10⁻⁵M ve 10⁻⁴M'lık dozlarına, her birinin ayrı ayrı verdikleri cevaplar kaydedilerek yıkama işlemleri tekrar edildi.

Doku, dinlenmesi için 1 saat "Tyrode" çözeltisi içerisinde bekletildi. Baklofenin literatürlerde bildirilen (8,21) 10⁻⁵M, 10⁻⁴M ve 10⁻³M'lık konsantrasyonlarından her biri için asetilkolinin üç dozunun (10⁻⁵M, 3x10⁻⁵M, 10⁻⁴M) oluşturduğu cevaplar ayrı ayrı kaydedildi. Uygulamalar arası "Tyrode" çözeltisi ile ikişer dakika arayla iki kez yapılan yıkama işlemleri tekrar edildi.

Bu araştırmanın yapılabilmesi için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı alındı.

Veri olarak, asetilkolinin yalnız kullanılması ayrıca diazepam ve baklofenin varlığında uygulanması sonucu oluşan cevaplar (amplitüt), gram cinsinden ve asetilkolinin verilmesi ile cevabın oluşmaya başladığı ana kadar geçen süre (latent süre) saniye cinsinden değerlendirildi. İstatistiksel yöntem olarak, her sidik kesesi preparatı için ayrı olacak şekilde elde edilen amplitüt ve latent süre değerleri arasında yapılan karşılaştırmalarda "Varyans analizi" ile "Duncan" testleri uygulandı ve p < 0.05 fark düzeyi çalışmada önemli kabul edildi.

Bulgular

Asetilkolinin (10⁻⁵M, 3x10⁻⁵M, 10⁻⁴M) yalnız, diazepam (10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M) ve baklofenin (10⁻⁵M, 10⁻⁴M, 10⁻³M) varlığında kobay sidik kesesi düz kasına uygulanmasıyla elde edilen amplitüt (g) ve latent süre (sn) değerleri, tablo 1 ve 2'de verilmiştir.

Kobay sidik kesesi düz kası üzerinde asetilkolinin 10⁻⁵M, 3x10⁻⁵M ve 10⁻⁴M'lık konsantrasyonlarının oluş-

turduğu kasılımların amplitütleri ve latent süreleri kendi içinde karşılaştırıldığında cevaplar arasında latent süre bakımından küçük farklar elde edilmesine rağmen istatistiksel yönden farklı olmadığı görüldü (Tablo 2). Amplitütler arasında ise konsantrasyonun yükselmesine bağlı olarak değerlerde rakamsal bir artış izlenirken, istatistiksel yönden farklılığın ($p<0.05$) ACh'nin 10^{-5} M ile 10^{-4} M'lık dozlarına alınan cevaplar arasında olduğu gözlemlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Kobaylarda asetilkolinin (10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 10^{-4} M) yalnız, diazepam (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) ve baklofenin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında sidik kesesi düz kasına verilmesiyle elde edilen amplitüt (g) değerleri (n= 30).

Table 1. The amplitude (g) values obtained from administering acetylcholine (10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 10^{-4} M) alone and in the presences of diazepam (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) and baclofen (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) on the smooth muscle of urinary bladder of guinea pigs (n=30).

	Amplitüt (gram)		
	ACh 10^{-5} M	ACh 3×10^{-5} M	ACh 10^{-4} M
Asetilkolin	3.04 ± 0.37^a	3.61 ± 0.47^b	4.76 ± 0.40^c
Diazepam 10^{-6} M	2.56 ± 0.38^d	3.59 ± 0.31^e	5.46 ± 0.44^f
Diazepam 10^{-5} M	2.16 ± 0.34^g	2.93 ± 0.29^h	4.74 ± 0.51^i
Diazepam 10^{-4} M	0.78 ± 0.14^j	0.88 ± 0.12^k	1.90 ± 0.20^l
Baklofen 10^{-5} M	2.35 ± 0.32^m	3.77 ± 0.42^n	5.63 ± 0.44^o
Baklofen 10^{-4} M	2.43 ± 0.23^p	4.00 ± 0.45^r	5.58 ± 0.47^s
Baklofen 10^{-3} M	2.81 ± 0.28^t	4.15 ± 0.43^u	5.48 ± 0.48^v

$p<0.05$: a-c, a-j, b-k, c-l, d-f, d-j, e-f, e-k, f-l, g-i, g-j, h-i, h-k, h-u, i-l, j-l, j-m, j-p, j-t, k-n, k-r, k-u, l-o, l-s, l-v, m-n, m-o, n-o, p-r, p-s, r-s, t-u, t-v, u-v'den farklıdır.

Diazepamın, 10^{-6} M'lık konsantrasyonunun varlığında asetilkolinin üç farklı dozuna verdiği cevaplar karşılaştırıldığında ACh'nin 10^{-5} M ile 10^{-4} M konsantrasyonları arasında latent süreler bakımından bir kısalma ($p<0.05$), ACh'nin 10^{-5} M ve 10^{-4} M ile ACh'nin 3×10^{-5} M ve 10^{-4} M'lık dozlarının oluşturduğu amplitütlerde ise bir artma ($p<0.05$) olduğu belirlendi (Tablo 1 ve 2).

Diazepamın 10^{-5} M'lık konsantrasyonunun varlığında yine asetilkolinin farklı üç derişimine alınan cevaplar da, ACh'nin 10^{-5} M ve 10^{-4} M'lık dozlarının latent süreleri arasında %45 oranında bir kısalma ($p<0.05$), amplitütler yönünden de ACh'nin 10^{-5} M ve 10^{-4} M konsantrasyonlarından alınan cevaplarda iki katı ve ACh'nin 3×10^{-5} M ve 10^{-4} M'lık dozlarının cevapları arasında ise 1.5 katı kadar artma ($p<0.05$) olduğu tespit edildi (Tablo 1 ve 2).

Diazepamın 10^{-4} M'lık konsantrasyonu varlığında asetilkolinin farklı üç dozuyla elde edilen cevaplar karşılaştırıldığında, asetilkolinin 10^{-5} M ile 10^{-4} M ve 3×10^{-5} M ile 10^{-4} M dozları arasında sırasıyla % 64 ve % 59 oranında latent sürenin kısaldığı ($p<0.05$) belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Kobaylarda asetilkolinin (10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 10^{-4} M) yalnız, diazepam (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) ve baklofenin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında sidik kesesi düz kasına verilmesiyle elde edilen latent süre (sn) değerleri (n=30).

Table 2. The latent duration (s) values obtained from administering acetylcholine (10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 10^{-4} M) alone and in the presences of diazepam (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) and baclofen (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) on the smooth muscle of urinary bladder of guinea pigs (n=30).

	Latent süre (saniye)		
	ACh 10^{-5} M	ACh 3×10^{-5} M	ACh 10^{-4} M
Asetilkolin	4.08 ± 0.67^a	4.36 ± 0.63^b	4.30 ± 0.60^c
Diazepam 10^{-6} M	6.07 ± 0.99^d	3.54 ± 0.47^e	2.90 ± 0.32^f
Diazepam 10^{-5} M	5.81 ± 1.19^g	4.05 ± 0.61^h	2.62 ± 0.30^i
Diazepam 10^{-4} M	8.22 ± 1.43^j	7.24 ± 1.21^k	2.97 ± 0.44^l
Baklofen 10^{-5} M	5.93 ± 0.87^m	4.14 ± 0.71^n	4.71 ± 0.78^o
Baklofen 10^{-4} M	5.20 ± 0.54^p	4.74 ± 0.76^r	2.86 ± 0.35^s
Baklofen 10^{-3} M	4.91 ± 0.72^t	5.00 ± 0.77^u	4.16 ± 0.49^v

$P<0.05$: a-j, b-k, d-f, e-k, g-i, g-j, h-k, j-l, j-p, j-t, k-l, k-n, k-r'den farklıdır.

Asetilkolinin üç farklı dozunun, 10^{-6} M ve 10^{-5} M'lık diazepam varlığında kullanılmasından elde edilen amplitütler arasında fark olmamasına rağmen 10^{-4} M'lık diazepam varlığında oluşturduğu cevaplarla karşılaştırıldığında kasılımların %60-75 oranında azaldığı ($p<0.05$) gözlemlendi (Tablo 1).

Baklofenin 10^{-5} M, 10^{-4} M ve 10^{-3} M'lık derişimleri varlığında, tüm asetilkolin dozlarının denemeleriyle elde edilen latent süreler arasında bir farklılığın olmadığı saptandı (Tablo 2). Baklofenin üç farklı konsantrasyonunun varlığında ACh'nin farklı üç dozunun uygulanmasıyla, ACh'nin 10^{-5} M ve 3×10^{-5} M, ACh'nin 10^{-5} M ve 10^{-4} M ile ACh'nin 3×10^{-5} M ve 10^{-4} M derişimlerine oluşan cevapların amplitütleri arasında 1.5-2 katı artışlar ($p<0.05$) olduğu tespit edildi (Tablo 1).

Tartışma ve Sonuç

Araştırmada, merkezi sinir sistemi etkili çizgili kas gevşeticilerinden benzodiazepin türevi olan diazepam ile yapı yönünden GABA'nın bir türevi olan baklofenin kobay izole sidik kesesi düz kası üzerine etkileri incelendi.

ACh'nin yüksek dozunun (10^{-4} M) en fazla kasılımlı oluşturduğu ve düşük ACh (10^{-5} M) dozuna verilen cevap arasında istatistiki önem taşıyan farklılığın bulunduğu tespit edildi. Kasılımların latent süreleri arasında ise önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi. Çalışmada, ACh uygulamalarından elde edilen kasılımların kobay sidik kesesi düz kasında bulunan muskarinik reseptörler aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Sidik kesesinde yaygın olarak M_2 ve M_3 muskarinik reseptörleri bulunduğu ve bunların ACh sayesinde detrusor kasının kasılmasını sağladığı bildirimleri (5,11,23), ACh'nin

gözlemlenen etkilerinin muskarinik reseptörler aracılığıyla gerçekleştiği düşüncesini güçlendirmektedir.

Düşük diazepam dozlarının ($10^{-6}M$ ve $10^{-5}M$) varlığında ACh'nin üç farklı derişiminin uygulanmasıyla elde edilen kasılmalar ile yalnız ACh kullanımıyla oluşan kasılmalar arasında önem ifade eden bir farklılığın bulunmamış olması, diazepamın düşük konsantrasyonlarının kobay sidik kesesi düz kası üzerinde ACh kaynaklı kasılmaları inhibe etmediğini gösterdi. Hatta diazepamın bu dozlarının varlığında ACh'nin düşükten yüksek derişime doğru belirlenen latent sürelerinde kısalma ($p<0.05$) olduğu tespit edildi. Aynı diazepam konsantrasyonları rat vas deferens ve kobay kalp kasına (atria) uygulandığında, çok küçük baskılayıcı etkiler yaptığı (3), yine bu dozların kobay safra kesesi düz kasında inhibisyon yapmadığı (12) ve düşük dozlarda kobay ileumu ile safra kesesi düz kaslarında inhibe edici bir etkisinin olmadığı (17) bildirimleri elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Çalışmada, ACh'nin üç farklı dozunun yalnız ve düşük diazepam ($10^{-6}M$, $10^{-5}M$) derişimleri varlığında uygulanmasıyla elde edilen kasılmalar ile diazepamın en yüksek dozunun ($10^{-4}M$) varlığında oluşan kasılmalar arasında %60-75 oranında azalmalar olduğu gözlemlendi. Diazepamın ($10^{-4}M$) varlığında, ACh'nin iki derişimine ($10^{-5}M$, $3 \times 10^{-5}M$) göre en yüksek dozunun ($10^{-4}M$) oluşturduğu cevap süresinin ACh'nin konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak %59-64 oranında kıaldığı, benzer biçimde gerçekleşen kasılmaların da düşük ACh derişiminde ($10^{-5}M$) %74.3, en yüksek derişiminde ($10^{-4}M$) ise %60 oranında azaldığı belirlendi. Bu sonuçlar, diazepamın ($10^{-4}M$), kobay sidik kesesi düz kası kasılmalarını artan ACh konsantrasyonu ile ancak yarışmalı bir şekilde baskılayabildiğini göstermektedir. Yapılan literatür taramalarında diazepamın kobay sidik kesesi düz kasına etkilerini içeren araştırmalara rastlanılmadığı, fakat diazepamın kobay ileumu ve safra kesesinde sadece yüksek dozda kasılımları baskıladığı (17), kobaylardan elde edilen izole *taenia coli*'de yüksek potasyum derişiminin oluşturduğu kasılmaların hem tonik hem de fazik cevaplarını $3 \times 10^{-4}M$ 'lık dozda tamamen inhibe ettiği, izole kobay ileumu uzunlamasına kas preparatında ise $10^{-4}M$ 'lık derişimde hem tonik hem de fazik cevapları %97.8 oranında inhibe ettiği (10) bildirimleri araştırmayı destekler niteliktedir.

Araştırmada kobay sidik kesesi düz kasının kolinerjik bileşeni olan ACh'nin oluşturduğu kasılmaları diazepamın doza bağlı olarak inhibe edebildiği sonucu gözlemlendi. Bu sonuç, postgangliyonik nöronların uyarılmasındaki GABA etkisinin, eksitator uyarımın kolinerjik bileşenine özgü olduğu bildirimleri (21,24) ile açıklanabilmektedir.

Kobay sidik kesesinin gövde kısmında bulunan gabaerjik nöronların postgangliyonik kolinerjik nöronlar olduğu, GABA'nın hem periferik hem de merkezi sinir sistemindeki etkisinin GABA_A ve GABA_B reseptörlerince gerçekleştirildiği bilinmektedir. Shirakawa ve ark.

(22) kobay sidik kesesinde bulunan muskarinik reseptör tipinin, GABA salınımını düzenleyen GABA_A reseptörlere uygunluk gösterdiğini, GABA salınımının bikukuline duyarlı GABA_A reseptörler, M₁ muskarinik ve α_2 -adrenerjik reseptörler aracılığıyla düzenlendiğini bildirmektedirler. Buna göre kobay sidik kesesinde diazepamın, benzodiazepin bağlanma bölgesine bağlanarak GABA_A reseptörlerinin aktivasyonu ile postgangliyonik kolinerjik nöronlardan salınan ACh'yi inhibe ettiği ve böylece kasılmaları baskıladığı düşünülmektedir. GABA reseptörlerinin sidik kesesinin düzenleyici inhibitörü olduğu bildirimleri de (3,13,17,22) bu düşünceleri destekler niteliktedir.

Çalışmada, ACh'nin iki derişiminin ($10^{-5}M$, $3 \times 10^{-5}M$) yalnız kullanımındaki latent sürenin en yüksek diazepam dozu ($10^{-4}M$) varlığında uygulanmasıyla yaklaşık iki katına çıktığı ($p<0.05$), kasılmaların ise %75 oranında azaldığı ($p<0.05$) gözlemlendi. ACh'nin en büyük dozunun ($10^{-4}M$) yalnız ve diazepam ($10^{-4}M$) varlığında denenmesiyle latent sürede istatistiksel önemi olmayan bir kısalma olduğu ve kasılımın %60 oranında azaldığı ($p<0.05$) belirlendi. Bu bulgulardan hareketle diazepamın etki süresinin ve inhibisyon derecesinin, canlı organizmadaki yoğunluğuna göre değişebileceği kanaatine varılmıştır.

Araştırmada baklofenin farklı üç derişiminin varlığında ACh'nin üç farklı dozunun oluşturduğu cevaplarla, ACh'nin yalnız denenmesiyle elde edilen cevaplar arasında hem latent süreler hem de kasılmalar açısından istatistiksel önemi olan farklılıkların bulunmadığı gözlemlenerek baklofenin ACh kaynaklı kasılmaları etkilemediği belirlendi. Ayrıca baklofenin tüm dozlarının varlığında ACh'nin üç farklı derişiminin oluşturduğu kasılmaların, ACh'nin yalnız denenmesiyle gerçekleşen kasılmalarla %5-15 oranında değişimler olmasının istatistiksel önem ifade etmediği de tespit edildi. Ayyat ve ark. (1)'nin baklofenin hem *in vivo* hem *in vitro* ortamlarda rat, tavşan ve insan sidik kesesi düz kası üzerine inhibe edici bir etkisinin olmadığı bildirimleri de yukarıda değinilen bulguları destekler niteliktedir.

Çalışmada baklofenin üç farklı dozunun varlığında ACh'nin farklı üç derişiminin uygulanması ile gerçekleşen kasılmalarda, ACh dozunun artmasına bağlı olarak istatistiksel yönden önem ifade eden artışlar olduğu gözlemlendi. Ancak bu artışların ACh'nin tüm dozlarının yalnız kullanılmasıyla oluşturduğu kasılmalarla istatistiksel yönden farklı olmadığı tespit edilerek baklofenin kobay sidik kesesi düz kasında ACh salınımına bağlı kasılmaları etkilemediği saptandı. Kobaylarda hem sidik kesesinde hem de ileumda, baklofenin ACh salınımında baskılayıcı bir etki göstermediği (16), tavşan sidik kesesi düz kasında ACh'e bağlı kasılmalarda baklofenin inhibisyon yapmadığı (21) bildirimleri de araştırmada elde edilen bulgularla paralellik göstermektedir.

Araştırmada baklofenin tüm dozlarının varlığında ACh'nin en düşük dozunun (10^{-5} M) oluşturduğu kasılmalarla, ACh'nin bu dozunun yalnız kullanımıyla elde edilen kasımlarda istatistiksel olarak önemli olmayan azalmalar gözlemlenmesine rağmen uygulanan diğer ACh derişimlerinin (3×10^{-5} M, 10^{-4} M) gerçekleştirdiği kasılmaları etkilemediği tespit edildi. Kobay ileumu düz kası (6) ve sidik kesesi düz kasında (15) baklofenin $GABA_B$ reseptörlerin uyarımında tamamen etkili olduğu ve alan stimülasyonuna bağlı kasımlarda çok az inhibisyon yaptığı bildirilmektedir. $GABA_B$ reseptörlerin değil de $GABA_A$ reseptörlerin ACh kaynaklı kasılmaları baskıladığı (13,16,21) bildirimlerini araştırmada elde edilen sonuçlar güçlendirmektedir. Çünkü, baklofen $GABA_B$ reseptör agonisti olduğu için ACh kaynaklı kasılmaları etkilemediği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, merkezi sinir sistemi etkili çizgili kas gevşeticilerinden diazepamın, *in vitro* koşullarda kobay sidik kesesi düz kasında ACh kaynaklı kasılmaları inhibe edici etkisinin olduğu belirlenen araştırmada, baklofenin ise bu kasılmaları etkilemediği tespit edilmiştir. Diazepamın inhibe edici etkisinin kobay sidik kesesinde bulunan muskarinik reseptörler ile $GABA_A$ reseptörlerin aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Diazepamın, doza bağlı olarak sidik kesesinde bulunan postgangliyonik kolinerjik nöron işlevlerini inhibe ederek, sidik kesesi motilitesini azaltabileceği böylece sidik kesesinin depolama hacminin artmasına ve sidüğün tutulmasına yardımcı olabileceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Ayyat FM, Lloyd LK, Kuhlemeier KV (1984): *Effect of skeletal muscle relaxants on bladder smooth muscle*. J Urology, **132**, 372-375.
2. Chapple CR (2000): *Muscarinic receptor antagonists in the treatment of overactive bladder*. Urology, **55**, 33-46.
3. Clanachan AS, Marshall RJ (1980): *Potential of effects of adenosine on isolated cardiac and smooth muscle by diazepam*. Br J Pharmacol, **71**, 459-466.
4. Doyle PT, Briscoe CE (1976): *The effects of drugs and anaesthetic agents on the urinary bladder and sphincters*. Br J of Urology, **48**, 329-335.
5. Giglio D, Delbro DS, Tobin G (2001): *On the functional role of muscarinic M_2 receptors in cholinergic and purinergic responses in the rat urinary bladder*. Eur J Pharm, **428**, 357-364.
6. Giotti A, Luzzi S, Spagnesi S, Ziletti L (1983): *$GABA_A$ and $GABA_B$ receptor mediated effects in guinea-pig ileum*. Br J Pharmacol, **78**, 469-478.
7. Gosling JA, Gilpin SA, Dixon JS, Gilpin CJ (1986): *Decrease in the autonomic innervation of human detrusor muscle in outflow obstruction*. J Urology, **136**, 501-504.
8. Ha JH, Lee KY, Kim WJ (1993): *The action of diazepam in the isolated rat detrusor muscle*. J Urology, **150**, 229-234.
9. Hullihan JP, Spector S, Taniguchi T, Wang JKT (1983): *The binding of [3 H]-diazepam to guinea-pig ileal longitudinal muscle and the *in vitro* inhibition of contraction by benzodiazepines*. Br J Pharmacol, **78**, 321-327.
10. Ishii K, Kano M, Akutagawa M, Makino M, Tanaka T, Ando J (1982): *Effects of flurazepam and diazepam in isolated guinea-pig taenia coli and longitudinal muscle*. Eur J Pharm, **83**, 329-333.
11. Kobayashi S, Ikeda K, Miyata K, Yamada T, Honda K (2001): *A method for measurement of muscarinic receptor-mediated responses in dissociated single colon longitudinal smooth muscle cells*. J Pharm and Toxicol Methods, **45**, 199-205.
12. Kubota K, Sugaya K, Sunagane N, Matsuda I, Uruno T (1985): *Cholecystokinin antagonism by benzodiazepines in the contractile response of the isolated guinea-pig gallbladder*. Eur J Pharm, **110**, 225-231.
13. Kusunoki M, Taniyama K, Tanaka C (1984): *Neuronal GABA release and GABA inhibition of ACh release in guinea pig urinary bladder*. Am Physiol Soc, 502-509.
14. Longhurst PA, Uvelius B (2001): *Pharmacological techniques for the *in vitro* study of the urinary bladder*. J Pharm and Toxicol Methods, **45**, 91-108.
15. Maggi AC, Santicioli P, Meli A (1985a): *$GABA_A$ and $GABA_B$ receptors in detrusor strips from guinea-pig bladder dome*. J Autom Pharmac, **5**, 55-64.
16. Maggi AC, Santicioli P, Meli A (1985b): *Dual effect of GABA on the contractile activity of the guinea-pig isolated urinary bladder*. J Autom Pharmac, **5**, 131-141.
17. Meldrum LA, Bojarski JC, Calam J (1986): *Effects of benzodiazepines on responses of guinea-pig ileum and gall-bladder and rat pancreatic acini to cholecystokinin*. Eur J Pharm, **123**, 427-432.
18. Pencheva N, Itzev D, Milanov P (1999): *Comparison of γ -aminobutyric acid effect in different parts of the cat ileum*. Eur J Pharm, **368**, 49-56.
19. Rampe D, Triggle DJ (1987): *Benzodiazepine interactions at neuronal and smooth muscle Ca^{2+} channels*. Eur J Pharm, **134**, 189-197.
20. Sağmanlıgil V, Etlük Ö, Pişkin İ, Tomur A (1999): *The effects of cyclophosphamide and its uroprotective agents, mesna and hyperbaric oxygen, on motility of urinary bladder in guinea pigs*. Acta Vet Hungarica, **47**, 451-460.
21. Santicioli P, Maggi CA, Meli A (1984): *$GABA_B$ receptor mediated inhibition of field stimulation-induced contraction of rabbit bladder muscle *in-vitro**. J Pharm Pharmacol, **36**, 378-381.
22. Shirakawa J, Taniyama K, Iwai S, Tanaka C (1988): *Regulation of [3 H]GABA release from strips of guinea pig urinary bladder*. Am J Physiol Soc, 888-893.
23. Steers WD, Chai TC (1996): *Neurophysiology of micturition and continence*. Urol Clin N Am, **23**, 221.
24. Taniyama K, Kusunoki M, Tanaka C (1983): *γ -Aminobutyric acid inhibits motility of the isolated guinea-pig urinary bladder*. Eur J Pharm, **89**, 163-166.

Geliş tarihi: 23.09.2003 / Kabul tarihi: 05.02.2004

Yazışma adresi:

Doç.Dr. İlksin Pişkin
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
06110 Dışkapı, Ankara