

Mesane İçi Kemoterapötik İlaçların Mesane Fonksiyonu Üzerine Olan Etkileri

Investigation of Effects of Intravesical Chemotherapeutics on Bladder Functions

Sebahattin Albayrak, Esat Korğalı

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Sivas

Özet

Amaç: Yüzeysel mesane üroepitelial tümörleri tedavisinde transüretral rezeksiyon altın standarttır. Transüretral rezeksiyon sonrası gelişebilecek nüks ve ilerlemenin önlenmesi amacıyla yüzeysel mesane tümörlerinin evresine, derecesine, tek veya çok odaklı olmasına, boyutuna ve ilk ya da ikincil tedavi edilmesi gibi ölçütlere bağlı olarak intravezikal kemo/immunoterapi uygulanmaktadır. İntravezikal kemo/immunoterapi alan hastalarda alt üriner sistem semptomları sık olarak görülmektedir. Bu semptomların ortaya çıkmasının sebebi ve mekanizması bilinmemektedir. Bu çalışmadaki amacımız Mitomycin C ve Epirubicin gibi intravezikal kemoterapötik ilaçların sıçan mesane kası şeritlerinin kolinerjik ve pürinerjik ajanlara verdiği in vitro yanıtları nasıl etkilediğini araştırmaktır.

Yöntem: Bu çalışmada 30 adet Wistar Albino dişi sıçan; Mitomycin C grubu, Epirubicin ve kontrol grubu olmak üzere üçe ayrıldı. Mitomycin C grubuna 8 hafta 1 mg/mL (0.1 mL) intravezikal haftada 1 kez, Epirubicin grubuna 8 hafta 1 mg/mL (0.1 mL) intravezikal haftada 1 kez, kontrol grubuna 8 hafta 0.1 cc % 0.9 NaCl intravezikal haftada 1 kez uygulandı. Tedavinin bitiminden 1 hafta sonra tüm gruplardan alınan mesane şeritleri in vitro olarak değerlendirildi. Karbakol, KCL, ATP, ADP ve elektriksel alan uyarısı ile oluşan kasılma yanıtlarına bakıldı.

Bulgular: Çalışma sonucunda mesane şeritlerinde in vitro olarak yapılan değerlendirmelerde kontrol grubu ile Mitomycin C ve Epirubicin grubunda KCL kasılma yanıtlarında anlamlı fark bulunmazken; Karbakol, ATP ve ADP kasılma yanıtlarında kontrole göre Mitomycin C ve Epirubicin grubunda anlamlı olarak azalmış bulundu. Elektriksel alan uyarısı ile elde edilen kasılma yanıtlarında kontrol ve Epirubicin grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Mitomycin C grubunda ise kontrole göre elektriksel alan uyarısı ile elde edilen kasılma yanıtlarında anlamlı artış saptandı.

Sonuç: Kolinerjik ve pürinerjik ajanlara yanıt azalmış iken elektriksel alan uyarısı ile elde edilen kasılma yanıtlarında beklenebilecek azalmanın olmaması, Mitomycin C grubunda artış olması ve Epirubicin grubunda ise değişiklik olmaması, farklı mekanizmaların bu olayda rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu konu ile ilgili ileri araştırmalara gerek vardır.

Anahtar Kelimeler: Mesane Tümörü, Kolinerjik, Pürinerjik, Mitomycin C, Epirubicin.

Abstract

Background: Transurethral resection is the gold standard method in superficial bladder uroepithelial tumor treatment. Intravesical chemo/immunotherapy is performed in order to prevent recurrence after transurethral resection regarding tumor level and grade, multiplicity, size and first or second time treatment. Lower urinary tract symptoms are seen in patients received intravesical chemo/immunotherapy. Mechanism and causes of these symptoms are unknown. The aim of this study is to investigate if Mitomycin C and Epirubicin, two intravesical chemotherapeutic agents, change in vitro cholinergic and purinergic responses of rat bladder smooth muscle.

Method: In this study 30 wistar albino rats were separated in three groups each consisting of Mitomycin C group, Epirubicin group and control group. Mitomycin C group received 1 mg/ml (0.1ml) intravesical Mitomycin C once a week for 8 weeks, Epirubicin group received 1 mg/ml (0.1ml) intravesical Epirubicin once a week for 8 weeks, control group received 0.1 cc % 0.9 NaCl intravesical once a week for 8 weeks. One week after therapy bladder shreds was examined in vitro. Carbachole, KCL, ATP, ADP and electrical field stimulation responses were evaluated.

Results: There was no significant difference between Mitomycin C and Epirubicin groups with KCL, whereas Carbachole, ATP and ADP contraction responses were significantly decreased in Mitomycin C and Epirubicin groups as compared to control group. Electrical field stimulation contraction responses were not significantly different between Epirubicin and control groups. Contraction responses showed significant increase in Mitomycin C group with respect to control groups.

Conclusion: While the decreased response to cholinergic agent and purinergic, expected from the lack of decrease to response at contraction alert that is obtained by the electric field warning. Increase the Mitomycin C group and the lack of change in the epirubicin group suggests that different mechanisms may play a role in this case. Further research is required on this object.

Keywords: Bladder Tumor, Cholinergic, Purinergic, Mitomycin C, Epirubicin.

Giriş

Mesane tümörü, erkeklerde 4. sıklıkta kadınlarda 8. sırada izlenen yaygın tümörlerden olup, sıklığı bölgelere ve ülkelere göre değişkenlik göstermektedir (1-2). Mesane tümörlerinin yaklaşık

%70'i tanı anında yüzeyledir. Bu hastalar transüretral endoskopik tümör rezeksiyonu ile tedavi edilirler. Rezeksiyona ek olarak intravezikal kemo/immunoterapi uygulanabilir. Bunların %10-



20'si progresyon gösterip kas invaziv hale gelir (3).

Avrupa Üroloji derneğinin klavuzu ve yapılan bazı önemli çalışmaların sonucunda, mesane duvarı perforasyonu ya da şüphesi olmayan yüzeysel mesane tümörlü hastaların hepsinde post-operatif erken tek doz intravezikal kemoterapi önermektedirler (4-6). Yüzeysel mesane tümöründe kullanılan kemoterapötik ajanlar Triethylenethiophosphoramide (Thiotepa), Doxorubicin, Epirubicin ve Mitomycin C'dir. Bu ajanların etkinliği birbirine çok benzemekle beraber toksisiteleri farklıdır (7).

Sağlıklı insanlarda, kolinerjik muskarinik reseptör agonistler ve intrinsik kolinerjik sinirlerin elektiriksel olarak uyarılması ile detrusor kasının kasıldığı ve bu cevabın muskarinik reseptör antagonisti olan atropin tarafından tamamen ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (8,9).

Deneyisel hayvan çalışmalarında in vivo parasempatetik uyarıya ya da in vitro bölgesel uyarıya pürinerjik cevabın alındığı kanıtlanmıştır (10). Bununla beraber, en azından uyarılara normal tepkiler göz önüne alındığında; pürinerjik nörotanmisyonun insanda var olduğuna dair kanıtlar vardır ve ayrıca bunlar stabil olmayan mesane gibi patolojik durumlarda rol oynayabilirler (11).

Çalışmadaki amacımız mesane tümörlü hastaların tedavisinde sık olarak kullanılan Mitomycin C ve Epirubicin gibi intravezikal uygulanan kemoterapötik ilaçların tedavi sonrasında mesane kası şeritlerindeki pürinerjik ve kolinerjik yanıtları değiştirip değiştirmediğini araştırmaktır.

Materyal ve Metod

Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınarak; Temmuz 2010 - Ekim 2010 tarihleri arasında yapılan bu çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma laboratuvarından sağlanan yetişkin 30 adet dişi Wistar Albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar kontrol (n= 10), Mitomycin C (0,1 mg/gün/6 hafta(haftada 1 kez); n= 10) ve Epirubicin (0,1 mg/gün/6 hafta(haftada 1 kez); n= 10) grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

Sekiz haftalık tedavileri tamamlandıktan 1 hafta sonra bütün ratlar, 200 mg/kg pentotal sodyum

anestezisi altında sistektomi yapılarak mesane dokuları izole edildi, mukoza ve kas dokularına ek bir girişim yapılmadı. Sıçanlar servikal dislokasyon ile öldürüldü.

İzole Mesane Şeritlerinin İn Vitro Deneylere Hazırlanışı: Ratlardan alınan mesane dokuları her biri 2mm genişliğinde ve 10 mm uzunluğunda şeritler halinde kesildi. 37 °C'de ısıtılan Krebs-Bikarbonat solüsyonu içeren 10 ml'lik organ banyosuna, bir ucu organ askısına diğer ucu Grass-FT 03 Force Displacement dönüştürücüsüne bağlanarak yerleştirildi. Mesane şeritleri 2 gramlık ön gerilim altında her 15 dakikada bir kez yıkılarak 1 saat dengelenmeye bırakıldı. Bu dengelenme süresi sonunda şeritler 80 mM KCl solüsyonu ile kasıldılar. KCl uygulaması ile kontraktıl yanıtlar alındı. Daha sonra yıkanan dokular, agonist ve antagonist maddelerin uygulanması için dinlenmeye bırakıldı.

Kasılma Yanıtları

A) KCl Kasılma Yanıtları: Kontrol ve Deney gruplarından alınan izole mesane şeritleri ilaçlar verilmeden önce 80 mM KCl ile organ banyosunda muamele edildi.

B) Karbakol Kasılma Yanıtları: Kontrol ve Deney gruplarından elde edilen izole mesane şeritlerinde Karbakol ile kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-6} - 10^{-4} M) kasılma yanıtları oluşturuldu.

C) ADP ve ATP Kasılma Yanıtları: Kontrol ve Deney gruplarından elde edilen izole mesane şeritlerinde; ATP (10^{-6} - 3×10^{-4} M), ADP (10^{-6} - 3×10^{-4} M) doz bağımlı kasılma oluşturdular.

D) Elektriksel Alan Uyarısının (EFS) Oluşturduğu Kasılma Yanıtları: Her üç grupta sıçanlardan elde edilen izole mesane şeritleri dengeye ulaştıktan sonra 50 V, 1 ms; 1, 2, 4, 8, 16, 32 Hz 'lik frekanslarda toplam 10 sn süre ile uyarılar verilerek kasılma yanıtları alındı.

Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler: Deney sonuçları metin içinde aritmetik ortalama \pm standart hata olarak sunuldu. Gruplar arasında fark olup olmadığı student-T testi ile test edildi. Gruplar arasındaki farkın anlamlılığı Scheffe F testi ile araştırıldı ve p değerinin 0.05'den küçük olması halinde fark anlamlı



kabul edildi. Agonist ilaçların oluşturduğu maksimum yanıtın % 50'sini oluşturmak için gereken konsantrasyon (EC_{50}) her bir deneyim log-konsantrasyon yanıt eğrilerinden elde edildi ve aritmetik ortalama \pm standart hata olarak gösterildi.

pD₂ değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$pD_2 = \log A - \log (E_{max} / E_A - 1)$$

A=Agonist ilacın molar konsantrasyonu

E_{max} =Agonist ilacın oluşturduğu maksimum etki

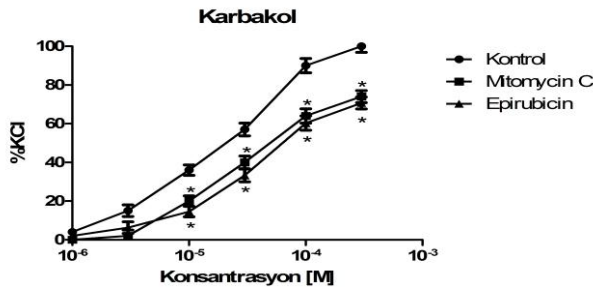
E_A =Agonist ilacın belirli bir konsantrasyon da oluşturduğu etki

Ayrıca ilaçların oluşturdukları maksimum etkileri her bir deneyden elde edilen verilerin Scatchard denkleminde uygulanması ile çizilen grafiklerden saptandı.

Bulgular

Kasılma Yanıtları

1. Karbakol Kasılma yanıtları: Mitomycin C, Epirubicin ve kontrol gruplarından elde edilen izole mesane şeritlerinde Karbakol ile kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-6} – 10^{-4} M) kasılma yanıtları oluşturuldu. Mitomycin C ve Epirubicin gruplarında dışarıdan verilen Karbakol ile kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-6} – 10^{-4} M) kasılma yanıtları kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış olarak izlendi. (Şekil 1).



Şekil 1. İzole mesane şeritlerinde Karbakol ile alınan kasılma yanıtları.

* Kontrol değerlerine göre $p < 0.05$, Kontrol (n= 10), Mitomycin C (n= 10), Epirubicin (n= 10)

2. ADP ve ATP Kasılma Yanıtları: Mitomycin C, Epirubicin ve kontrol gruplarından elde edilen izole mesane şeritlerinde; ATP (10^{-6} - 3×10^{-4} M) ve ADP (10^{-6} - 3×10^{-4} M) doz bağımlı kasılma oluşturdu.

Mitomycin C, Epirubicin grubunda dışarıdan verilen ATP ve ADP ile elde edilen (10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} , 3×10^{-5}) kasılma yanıtları, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış olarak izlendi.

3. KCL Kasılma Yanıtları: Kontrol ve Mitomycin C, Epirubicin gruplarından alınan izole mesane şeritleri ilaçlar verilmeden önce 80 mM KCL ile organ banyosunda muamele edildi. KCL ile alınan yanıtlar mg olarak grafiklendi. Deney ve kontrol grubunda anlamlı fark bulunmadı.

4. Elektriksel Alan Uyarısının (EFS) Oluşturduğu Kasılma Yanıtları: Her üç grupta sıçanlardan elde edilen izole mesane şeritleri dengeye ulaştıktan sonra 50 V, 1 msn; 2, 4, 8, 16, 32 Hz 'lik frekanslarda toplam 10 sn süre ile uyarılar verilerek kasılma yanıtları alındı.

EFS kasılma yanıtlarında, kontrol grubu yanıtlarına göre Mitomycin C grubunda anlamlı şekilde artmış olarak izlendi, Epirubicin grubunda anlamlı fark izlenmedi.

Tartışma

Bu çalışmamızda, intravezikal olarak 8 hafta Mitomycin C ve Epirubicin verilen ratlarda mesane şeritleri alınıp in vitro olarak mesanenin kolinerjik ve pürinerjik yanıtlarını inceleyerek bu tedaviler sonrası sıklıkla oluşan alt üriner sistem semptomlarının mesanenin kolinerjik ya da pürinerjik sistemindeki değişikliklerle uyumlu olup olmadığını değerlendirmeye çalıştık. Literatür taramamıza göre çalışmamız bu şekilde tasarlanan ilk çalışmadır.

Michielsen ve arkadaşlarının ratlarda çalışmada 3 hafta, haftada 1 kez 1 mg/ml dozda 0.1 ml Mitomycin C ve 1 mg/ml dozda 0.1 ml Epirubicin intravezikal olarak uygulanmıştır. İlaçların mesane fonksiyonu üzerine etkileri ürodinamik olarak incelenmiş ve Mitomycin C alan grupta mesane kapasitesi ve kompliansında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar saptanmış, Epirubicin alan grupta sadece mesane kompliansında anlamlı azalma meydana geldiği saptanmıştır (12). Post ve arkadaşlarının ratlarda yaptıkları çalışmada ise 3 hafta, haftada 1 kez 1 mg/ml dozda, 0.1 ml Mitomycin C ve haftada 1 kez 6 mg/mL dozda 0.1 ml Doxorubicin intravezikal olarak uygulanmıştır. Ratların günlük miksiyon sıklığına ve mesanedeki

histopatolojik değişikliklere bakılmıştır. Miksiyon sıklığında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmış ve histopatolojik olarak ise submukoza ve müsküler tabakada değişiklik saptanmamış, mukozada ödem ve mukozanın yüzeysel tabakasında inceltme tespit edilmiştir (13). Bizim çalışmamızda kontrol grubu ile Mitomycin C ve Epirubicin grupları arasında mesane şeritlerindeki Karbakol kasılma yanıtlarında anlamlı olarak azalma olduğu tespit edildi.

ATP ve ADP pürinerjik sistem mediatörleri olup P2X reseptörleri üzerinden kasılmaya aracılık ederler. Pürinerjik ileti, idrarın depolanması ve boşaltılmasını kontrol eden hem afferent hem de efferent sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (14). Yu ve De Groat tarafından yapılan bir çalışmada pürinerjik agonistlerin, mesane ürotelyumundaki afferent sinir uçlarını sensoriyel uyarılara karşı daha duyarlı hale getirdiği, bununda aynı siklofosamid tarafından oluşturulan sistitteki gibi semptomlar yarattığı belirtilmiştir. Bu nedenle pürinerjik sistem reseptörlerinin, hem ağrı hem de hiperaktif detrusör tedavisinde, farmakolojik çalışmalar için olası hedef olabileceği belirtilmiştir (15). Patrik ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sıçan mesanesinde pürinerjik uyarılma sonrası mesanede kontraksiyon olduğu izlenmiştir (16). Çalışmamızda kontrol grubu ile Mitomycin C ve Epirubicin grupları arasında mesane şeritlerindeki ATP ve ADP kasılma yanıtlarında anlamlı olarak azalma olduğu tespit edildi.

Sıçan mesanesine uygulanan elektriksel stimülasyon sonucu, parasempatik sinir uçlarından salgılanan asetilkolin ve ATP mesane kontraksiyonu ile sonuçlanan M3 muskarinik ve P2X1 pürinerjik reseptör aktivasyonuna neden olur. Atropin gibi muskarinik antagonistler mesane kasılmalarını tam olarak bloke edemezler çünkü mesane kasılmasında asetilkolin yanında non-kolinerjik non-adrenerjik komponentde mevcuttur (17-19). Çalışmamızda kontrol ve Epirubicin gruplarında

mesane şeritlerindeki EFS kasılma yanıtlarında anlamlı fark saptanmadı. Mitomycin C grubunda ise kontrole göre EFS kasılma yanıtlarında anlamlı artış saptandı. KCl ile hem Mitomycin C ve Epirubicin gruplarında hem de kontrol grubunda birbirinden farklı olmayan kasılma yanıtları alınmıştır. Bu da kontrol ve deney gruplarında kullanılan mesane şeritlerindeki kas yoğunluğunun birbirine eşit olduğunu göstermektedir.

Mesane düz kas tonusunun sağlanması için volta-ja bağımlı kalsiyum kanallarından hücre içine sürekli kalsiyum girişi ve potasyum kanallarından potasyum çıkışı ile hiperpolarize olması gerekmektedir (20). Çalışmamızda mesane içi uygulanan kemoterapötik ilaçlardan Mitomycin C ve Epirubicin tedavisi sonrası Karbakol, ATP ve ADP kasılma yanıtlarında anlamlı azalma izlenmiştir. Epirubicin grubunda mesane şeritlerindeki EFS ile elde edilen kasılma yanıtlarında anlamlı fark saptanmamıştır. Mitomycin C grubunda ise EFS ile elde edilen kasılma yanıtlarında anlamlı artış saptanmıştır. Kolinerjik ve pürinerjik ajanlara yanıt azalmış iken EFS ile elde edilen kasılma yanıtlarında beklenebilecek azalmanın olmaması, Mitomycin C grubunda EFS ile elde edilen kasılma yanıtlarında artış olması ve Epirubicin grubunda ise EFS ile elde edilen kasılma yanıtlarında değişiklik olmaması, farklı mekanizmaların bu olayda rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu konu ile ilgili ileri araştırmalara gerek vardır.

Sonuç olarak çalışmamızda intravezikal kemoterapi sonrası Karbakol, ATP ve ADP kasılma yanıtlarında azalma tespit edilmiştir. Epirubicin grubunda mesane şeritlerindeki EFS ile elde edilen kasılma yanıtlarında anlamlı fark saptanmamıştır. Mitomycin C grubunda ise EFS ile elde edilen kasılma yanıtlarında anlamlı artış saptanmıştır. Kolinerjik ve pürinerjik ajanlara yanıt azalmış iken EFS ile elde edilen kasılma yanıtlarında da azalma olması beklenebilir, fakat Mitomycin C grubunda EFS ile elde edilen kasılma yanıtlarındaki artış bu konu ile ilgili ileri araştırmalarla aydınlatılabilir.

KAYNAKLAR

1. Fleshner NE, Herr HW, Stewart AK, Murphy GP, Mettlin C, Menck HR. The National Cancer Data Base report on bladder carcinoma. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. Cancer 1996;78: 1505-13.
2. Kılavuz ES, Tosun M, Uras AR. Adequacy of nuclear matrix protein 22 to determine recurrences in patients with bladder cancer. Abant Med J. 2012; 1: 18-22.



3. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005;66: 4–34.
4. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J. European Association of Urology guidelines on TaT1 (non-muscle invasive) bladder cancer. Update 210. Arnhem, the Netherlands: European Association of Urology; 2010.
5. National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology: bladder cancer including upper tract tumours and urothelial carcinoma of the prostate. Version 1. Jenkintown, PA: NCCN; 2007.
6. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA, et al. High grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology* 2005;66:90–107.
7. Heney NM, Koontz WW, Barton B, et al. Intravesical thiotepa versus mitomycin C in patients with Ta, T1 and T1S transitional cell carcinoma of the bladder: a phase III prospective randomized study. *J Urol* 1988;140:1390–3.
8. Christopher Fry, The physiology of micturition; *Women's Health Medicine*, 2005 (volume2) issue 6: 53-55.
9. Harriss DR, Marsh KA, Birrningham AT, et al: Expression of muscarinic Mr receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis in human detrusor smooth muscle cells. *J Urol*1995;154:1241-8.
10. Burnstock G, Dumsday B, SymtheA: Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a pürine nucleotide. *Br J Pharmacol.* 1972 Mar ;44(3):451-61.
11. Palea S, Artibani W, Ostardo E et al: Evidence for purinergic neurotransmission in human urinary bladder affected by interstitial cystitis. *J Urol.* 1993; 150:2007-12.
12. Michielsen D, Amy JJ, Coomans D, Storme G,Wyndaele JJ, Mitomycin C and epirubicin: functional bladder damage in rats after repeat intravesical instillations. *J.Urol.*2005; 173:2166–70.
13. Post JG, te Poele JA, Oussoren Y,Stewart FA, Bladder damage in mice after single and repeated intravesical instillations of mitomycin C or doxorubicin. *J Urol.* 1993;150:1965-9.
14. Theobald, R. J., Jr. The effect of NG-monomethyl-L-arginine on bladder function. *Eur. J. Pharmacol*, 1996;311:73–78.
15. Yu Y and De Groat WC. Sensitization of pelvic afferent nerves in the in vitro urinary bladder pelvic nerve preparation of the rat by purinergic agonists or by cyclophosphamide (CYP) pretreatment. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008{294}: 1146–56.
16. Patrik Aronsson, Michael Andersson, Therese Ericsson and Daniel Giglio, Assessment and Characterization of Purinergic Contractions and Relaxations in the Rat Urinary Bladder. 2010 The Authors Journal compilation 2010 Nordic Pharmacological Society. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107, 603–13.
17. Ambache N, Zar MA. Non-cholinergic transmission by post-ganglionic motor neurones in the mammalian bladder. *J Physiol* 1970;210:761–83.
18. Somogyi GT, Zernova GV, Yoshiyama M, Yamamoto T, de Groat WC. Frequency dependence of muscarinic facilitation of transmitter release in urinary bladder strips from neurally intact or chronic spinal cord transected rats. *Br J Pharmacol* 1998;125:241–246.
19. Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble PJ, Westfal TD. Expression and functional role of ho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2003;138:757–66.
20. Darblade B, Behr-Rousel D, Oger S, Effects of potassium channel modulators on human detrusor smooth muscle myogenic phasic contractile activity: potential therapeutic targets for overactive bladder. *Urology*, 2006;68: 442-8.

