

## OKSİTOSİNLE KONTRAKTİLE EDİLEN İNVİTRO KEDİ MYOMETRİUMUNA ERİTROMİSİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Kadir SERVİ<sup>1</sup>, Haki KARA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Elazığ Sağlık Yüksek Okulu, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 19.02.2001

**Investigation of the effects of erythromycin on cat myometrium contractile with oxytocin-induced *in vitro***

### SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effects of erythromycin on cat myometrium *in vitro*. After myometrial samples were contracted with oxytocin 0.6, 1.2, 1.8, and 2.4 mM erythromycin was applied and effects on peak amplitude and frequency of contractions were investigated by 10 minute intervals. The frequency of oxytocin-induced contractions was  $11.4 \pm 0.4$  whereas  $15.4 \pm 1.4$ ,  $28 \pm 3.5$  ( $P < 0.001$ ),  $20 \pm 1.2$  ( $P < 0.001$ ) and  $4 \pm 0.6$  ( $P < 0.001$ ) after application of 0.6 mM, 1.2, 1.8 and 2.4 mM erythromycin, respectively. The mean peak amplitude of oxytocin-induced contractions was  $3.37 \pm 0.41$ , after application of 0.6 mM, 1.2, 1.8 and 2.4 mM erythromycin dose-dependently decreased the amplitude values to,  $3.4 \pm 0.25$  ( $P < 0.001$ ),  $2.56 \pm 0.22$  ( $P < 0.001$ ),  $2.17 \pm 0.18$  ( $P < 0.001$ ) and  $0.65 \pm 0.15$  ( $P < 0.001$ ), respectively. In conclusion, it was found that erythromycin in low doses inhibits amplitude of contractions but increase frequency, whereas high doses of erythromycin inhibits both amplitude and frequency of oxytocin-induced contractions of myometrium obtained from cat.

**Key words:** Erythromycin, myometrium, oxytocin, cat.

### ÖZET

Bu çalışma *in vitro* kedi myometriumu üzerine eritromisin'in farklı dozlarının etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı. Myometrial örnekler oksitosinle uyarıldıktan sonra eritromisin'in 0.6, 1.2, 1.8 ve 2.4 mM konsantrasyonları uygulanarak 10 dakikalık sürede uterus kontraksiyonlarının frekans sayısı ve pik amplitüdü incelendi. Oksitosin uygulamasıyla frekans sayısı  $11 \pm 0.4$  olduğu, 0.6 mM eritromisin verilmesiyle  $15 \pm 1.4$  ( $P < 0.001$ ) olurken, 1.2 mM dozunda  $28 \pm 3.5$  ( $P < 0.001$ ), 1.8 mM dozunda  $20 \pm 1.2$  ( $P < 0.001$ ) ve 2.4 mM dozunda ise  $4 \pm 0.6$  ( $P < 0.001$ ) olarak bulundu. Pik amplitüd değerlerinin ise oksitosin uygulaması ile  $3.37 \pm 0.41$  iken eritromisin uygulamasıyla doza bağımlı olarak azaldığı ve 2.4 mM dozunda azalma göstererek  $0.65 \pm 0.15$  grama düştüğü ( $P < 0.001$ ) belirlendi. Eritromisin'in düşük dozlarının myometrium kasılmalarının frekansını artırırken amplitüdünü düşürdüğü, yüksek konsantrasyonlarda ise hem frekansı hemde amplitüdü azalttığı sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Eritromisin, myometrium, oksitosin, kedi.

### GİRİŞ

Eritromisin *Streptomyces erythraeus* kültürlerinden elde edilen 13 karbonlu eritronolid ile bu yapıya bağlı desozamin ve klonidoz isimli iki deoksiheksos molekülünden meydana geldiği, eritro-

misinin stearat ve tiyosiyanat tuzları ile etilsüksinat, etilkarbonat ve esteolat esterleri ağız yoluyla, eritromisin glusefat ve eritromisin laktobionat tuzları parenteral olarak kullanıldığı, eritromisin'in de içinde

bulunduğu makrolid grubu antibiyotikler bakteri ribozomlarının 50 S alt birimlerine bağlanarak aynı yere tRNA molekülünün bağlanmasını ve peptid zincirinin uzamasını engellediği bildirilmektedir (5,7)

Eritromisin'in ağız yoluyla kullanımında özellikle atlarda olmak üzere otçullarda şiddetli ishale neden olduğu bildirilmektedir (7). Eritromisin ile yapılan in vitro çalışmalarda kolon, ince barsak ve midede motor aktiviteyi artırdığı ve bu etkinin eritromisin'in antibakteriyel etkisi ile ilişkili olmadığı ve gastro-intestinal kanalda oluşan bu etkinin motilin reseptörleri ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (6,13,14)

Minocha ve ark. (13), eritromisin'in koyalarda  $\alpha_2$  adrenerjik ve opiad reseptörlerinden bağımsız olarak bu türde barsaklarda inhibitör etkisinin bulunduğunu ve bu etkinin türe özgü olduğunu bildirmişlerdir.

Bazı araştırmacılar (8, 9, 10, 11), eritromisin'in bakteriyel vaginozis veya genital kanalın mikroorganizmalarla kolonizasyonu ile ilişkili bireylerde erken doğumu önlemek için etkili olabileceğini, Milwidsky ve ark.(12), erken doğumda proteaz, kollegenaz, elastaz ve fosfolipaz gibi korionik membran dayanıklılığını azaltan enzimlerin rol oynadığını ve eritromisin'in özellikle kollegenaz enzimini inhibe ettiğini, Romero ve ark. (16) ise erken doğumun önlenmesinde tokolitiklerle birlikte eritromisin'in yararlı olduğunu ve eritromisin'in gebelik süresini uzattığını bildirmektedirler.

Eritromisin in vitro olarak gebe rat myometriumunda 1 mM konsantrasyonda oksitosinle kontraktile edilenlerle karşılaştırıldığında amplitüdü %78, frekansı ise % 61 oranında azaltığı, eritromisin'in bu etkisinin  $\beta$  adrenerjik reseptörlerle ilişkisi olmadığı belirtilmiştir (3).

Gebe insan myometriumunda yapılan bir başka çalışmada (1) eritromisin'in değişik dozlarının etkileri karşılaştırıldığında 0.01 mM yoğunlukta oksitosinle kasılan myometrium kontraktilesi üzerine istatistiksel olarak etkisi görülmezken 2 mM konsantrasyonda myometrial kontraktilesi inhibe ettiği bildirilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, daha önce sıçan ve insan myometriumunda kontraksiyonları inhibe edici etkisi bildirilen eritromisin'in, farklı konsantrasyonlarının in vitro koşullarda oksitosin ile indüklenen kedi myometriumunda kontraksiyonlara etkisinin araştırılmasıdır.

## MATERYAL METOT

**Hayvan Materyali:** Bu çalışma Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Doğum Kliniğine ovariohisterektomi amacıyla getirilen kedilerin uterusundan alınan myometrial kesitlerle gerçekleştirildi.

**Cihazlar:** İzometrik transdüser (Harward Apparatus Limited, Harward, İngiltere), Ossilograf (Harward Apparatus Limited, Harward, İngiltere), İzole organ banyosu

**Kimyasal madde ve Solusyonlar:** Krebs Solusyonu; (NaCl 118 mM, KCl 4.69 mM  $MgSO_4$  0.6 mM,  $NaHCO_3$  25 mM,  $CaCl_2$  2.5 mM, Glukoz 11.1 mM) her gün taze olarak hazırlandı (1), Eritromisin (Eritromisin 50 mg / ml, Erivet, Abfar), Oksitosin (Oksitosin 5 IU/ml, Vetaş).

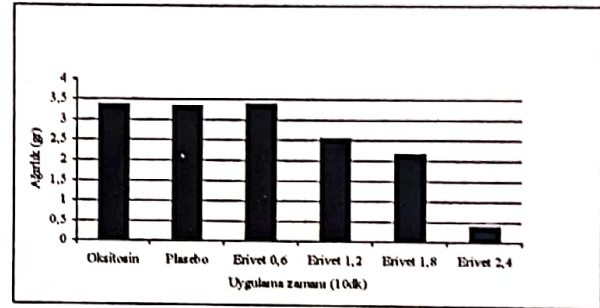
**Metot:** Gebe olmayan kedilerden alınan uterus kornularının seroza ve endometrium katları ayrılarak sadece myometrim katları bırakıldı. Myometrim kas tabakasından 10 mm x 2 mm x 2 mm ebatında kesitler alınarak işleme tabi tutuldu. İşlemler krebs solusyonu ortamında gerçekleştirildi. Herhangi bir enfeksiyon riski bulunan uteruslar deney dışı bırakıldı. Kas kesitleri ipek iplik yardımıyla alt ucu 20 ml kapasiteli, içerisinde krebs solusyonu bulunan, %5  $CO_2$  + %95  $O_2$  ile sürekli gazlandırılan izole organ banyosunun tabanındaki çengele üst ucu ise mikrometrik oynatıcı üzerine sabitleştirilmiş diğer ucu ossilografa bağlı olan transdüserle bağlandı. Kas asıldıktan sonra bir gramlık gerim uygulandı ve hesaplamalarda kalibrasyon olarak kullanıldı. Kas bu gerime uyum sağlayana kadar (60-90 dk) beklendi. Bu esnada kas her 20 dakikada bir taze krebs solusyonu ile yıkandı. Değişik eritromisin dozları denenerek etki görülen dozdan itibaren uygulamaya başlandı. Bekleme süresi sonunda oksitosin (0.01 mM) ile uyarıldı. Oksitosinle düzenli kontraksiyonların oluşturulduğu kaslarda eritromisin'in (Erivet, 50mg/1ml Eritromisin) 0.6 mM, 1.2 mM, 1.8 mM ve 2.4 mM olmak üzere dört farklı konsantrasyonunun etkisi araştırıldı. Her konsantrasyon için 10 kas örneği kullanıldı. Ayrıca 10 adet kasa da oksitosin uygulamasından sonra plasebo olarak serum fizyolojik ilavesi yapılarak kasılmalarda değişiklik olup olmadığı araştırıldı. Deneyler sırasında myometrium kaslarındaki aktivite değişiklikleri ossilograf yardımıyla milimetrik kağıtlara kaydedildi. Eritromisin uygulamasından önceki değerler kontrol değerleri olarak kabul edildi ve dozdan sonra elde edilen değerler, oksitosinle elde edilen değerler ile karşılaştırıldı.

Bütün deneylerde ölçüm olarak 10 dakikalık zaman aralıklarında değerlendirmeler yapıldı. Oksitosinle düzenli kontraksiyonlar oluşmasından 10 dakika sonra izole organ banyosuna eritromisin uygulandı. Uygulamadan önceki ve sonraki period kendi aralarında pik amplitüt ve frekans yönünden karşılaştırıldı. Amplitüt hesaplamasında bazal çizgi ile kontraksiyonun tepe noktası arasındaki mesafe mm cinsinden ölçüldü ve o deneyde kullanılan kalibrasyon gözönüne alınarak gram cinsinden değeri hesaplandı. Frekans hesaplamasında 10 dakikalık sürelerde kontraksiyonların sayısı adet olarak hesaplandı. Böylece kasılmaların hem amplitüt hemde süreleride değerlendirmeye alındı. Verilerin değerlendirmesinde SPSS (Anova) istatistik programı kullanıldı.

## BULGULAR

Çalışmadan elde edilen bulgular tablo 1 ile şekil 1 ve 2'de gösterildi. Tablo ve şekillerde oksitosinle uyarılan myometriyumların dakikadaki frekansları adet/10 dk olarak gösterildi. Myometrial örneklerle 0,01mM oksitosin uygulanmasıyla uterus kaslarında 10 dakikalık period boyunca yaklaşık 11 kasılma meydana geldiği, bir frekansın ortalama geriminin  $3,37\pm0,41$  gr olduğu belirlendi. Eritromisinin 0.6 mM dozu uygulandıktan sonra frekans sayısında artış (15/10 dk,  $P<0,001$ )

gözlenirken pik amplitütlerde önemli bir değişikliğin olmadığı tesbit edildi. Eritromisinin 1.2 mM ilavesiyle 10 dakikalık periyottaki kasılma sayısı  $28\pm3,5$  olurken pik amplitüt geriminin  $2,56\pm0,22$  ( $P<0,001$ ) grama düştüğü görülmektedir. 1.8 mM eritromisin verilmesiyle frekans sayısı  $20\pm 1,2$  ( $P<0,001$ ) olurken, amplitüt gerimlerinin de  $2,17\pm0,18$  ( $P<0,001$ ) grama düştüğü görülmektedir. 2.4 mM eritromisin verildiğinde ise  $4\pm0,6$  ( $P<0,001$ ) adet kasılma olduğu, bunların gerimlerinde  $0,65\pm0,15$  gram ( $P<0,001$ ) olduğu ve bu kasılmaların ilk birkaç dakikalık zamanda meydana geldiği, daha sonra ise kasılmaların tamamen sonlandığı tesbit edildi. Plasebo uygulanan kaslarda frekans ve amplitütlerde önemli bir değişikliğin olmadığı belirlendi.

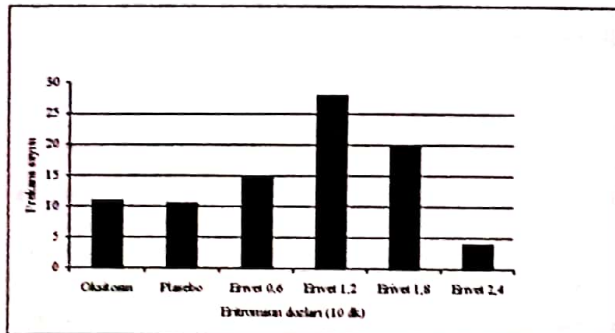


Şekil 1. Oksitosinle uyarılan invitro kedi myometriumu pik amplitütüne eritromisinin farklı dozlarının etkisi.

Tablo 1. Oksitosinle uyarılan invitro kedi myometriumu üzerine eritromisinin farklı dozlarının etkisi.

| Uygulama (n=10)   | Frekans mean $\pm$ SD | Değişim (%) | Amplitüt mean $\pm$ SD (gr) | Değişim (%) |
|-------------------|-----------------------|-------------|-----------------------------|-------------|
| Oksitosin 0.01 mM | 11 $\pm$ 0.4          | -           | 3.37 $\pm$ 0.41             | -           |
| Plasebo           | 10.5 $\pm$ 0.5        | %4          | 3.34 $\pm$ 0.22             | %0.8        |
| Eriyet 0.6 mM     | 15 $\pm$ 1.4*         | %36         | 3.4 $\pm$ 0.25              | %0.8        |
| Eriyet 1.2 mM     | 28 $\pm$ 3.5*         | %154        | 2.56 $\pm$ 0.22*            | %24         |
| Eriyet 1.8 mM     | 20 $\pm$ 1.2*         | %81         | 2.17 $\pm$ 0.18*            | %35         |
| Eriyet 2.4 mM     | 4 $\pm$ 0.6*          | %55         | 0.65 $\pm$ 0.15*            | %81         |

\*Gruplar arası farklılıklar önemli,  $P<0.001$



Şekil 2. Oksitosinle uyarılan invitro kedi myometriumu frekansına eritromisinin farklı dozlarının etkisi.

## TARTIŞMA

Çalışmamızda materyal ve metot bölümünde içeriği tarif edilen Krebs solusyonu kullanılarak oksitosinle aktive edilen myometrium kasılmaları daha önceki çalışmalarla elde edilen sonuçlarla uyumlu bulundu (1,3,17).

Eritromisinin kas içi yolla kullanımından sonra 15 dakikada etkili, 60 dakikada ise plazma doruk yoğunluğa ulaştığı ve kas içi yolla biyoyararlanımının % 60- 65 olduğu, insanlarda 500 - 1000 mg dozda damar içi infüzyonundan 1 saat sonra elde edilen plazma düzeyinin 0.013 mmol/ l olduğu bildirilmektedir ( 5,7 ).

Tablo 1 ve şekil 1, 2 incelendiğinde eritromisinin 1.2 mM konsantrasyonundan sonra oksitosinle uyarılan kontraksiyonların pik amplitütlerini doza bağımlı olarak baskıladığı, frekans sayısında ise 0.6 mM dozundan itibaren doza bağımlı bir artış meydana getirdiğini, ancak 2.4 mM dozunda hem amplitütü hem de frekans sayısını kontrol ve plasebo grublarına göre inhibe ettiği gözlenmiştir.

Eritromisinin gastro intestinal kanaldaki motilite artırıcı etkisi dikkate alındığında bulgularımızın çeliştiği ortaya çıkmaktadır. İn vivo şartlardaki bu etki makrolidlere özgü motilin agonisti etki ile meydana gelmektedir. Daha önceki çalışmalarda (2,6,13,14) eritromisinin duodenum, oddi sfinkteri, özafagus ve midede motiliteyi artırıcı etkisi ortaya konulurken sidik kesesinin tonusunda değişiklik yapmadığı, bu durumun sidik kesesinde motilin reseptörlerinin bulunmamasıyla açıklanmıştır ve in vitro olarak sidik kesesi düz kaslarında kontraksiyonları inhibe ettiği de gösterilmiştir (7,8).

Bir başka çalışmada (13), eritromisinin barsak longitudinal kaslarında elektrik, sinirsel, karbakol ve P maddesi ile uyarılan kontraksiyonları inhibe ederken, sirküler kaslarda sadece sinirsel kontraksiyonları inhibe ettiği, bu farklılığın eritromisinin etkisinin kontraksiyon mekanizmasına bağlı olarak değiştiğini bildirilmiştir. Longitudinal kaslarda kontraksiyon hücre dışındaki kalsiyumun hücre içine girmesi ile sirküler kaslarda ise hücre içinde depolanmış kalsiyumun serbest hale geçmesi ile oluşmaktadır (4).

Oksitosin hem hücre dışı kalsiyumun içeri girişi hem de hücre içinde depo kalsiyumu serbest hale getirerek hücre içerisinde serbest kalsiyum düzeyini yükselterek kontraksiyonların amplitüt ve frekansını artırmaktadır (15, 17). Longitudinal ve sirküler düz kaslardan oluşan myometrial kesitlerde oksitosin aracılı kontraksiyonlara eritromisinin etkisi, oksitosinin de etkisi göz önüne alındığında her iki kas tipinde de hücre içi serbest kalsiyum düzeyini etkilemesine bağlı olduğu kanatındeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Çelik H, Sapmaz E, Ayar, A. Oksitosinle uyarılan izole gebe insan myometriumuna eritromisinin etkisi. Fırat Tıp Dergisi, 2000, 2(2): 90- 97.
2. Frederick H, Weber JR, Robert D, Rirhards MD, Rirhard W, McCallum D. Erythromycin: A motilin agonist and gastrointestinal prokinetic agent. The Am J Gastroenterology, 1993, 88: 4-6.
3. Granovsky GS, Ilan D, Grisar D, Lavie O, Aboulofia I, Diamant S. Effect of erythromycin on contractile of isolated myometrium from pregnant rats. Am J Obstet Gynecol, 1998, 178: 171-174.
4. Grider JR, Makhlof GM. Contraction mediated by Ca<sup>++</sup> release in circular and Ca<sup>++</sup> influx in longitudinal intestinal muscle cells. J Pharmacol Exp Ther 1998, 244: 432-436.

Granovsky ve ark (3), rat myometriumunda eritromisinin oksitosin ile oluşan kontraksiyonların hem amplitütü hem de frekansını inhibe ettiğini, Çelik ve ark. (1), insan myometriumunda yaptığı çalışmada eritromisinin amplitütü inhibe ettiği ancak frekans artırdığını bildirmektedirler. Bizim çalışmamızda ise 1.2 mM dozundan itibaren amplitütlerde inhibisyon ve 0.6 mM dozundan itibaren de frekans sayısında artış gözlenmiş ancak 2.4 mM konsantrasyonda hem frekans ve hemde amplitütlerde inhibisyon gözlenmiştir. Bunun nedeni türler arası farklılık olabileceği gibi çok yüksek yoğunluklarda bu etkinin non-spesifik olduğu kanaatindeyiz. Nitekim Granovsky ve ark (3), Çelik ve ark.(1), benzer sonuçları bulmuşlardır.

Normal veya erken doğumda rol oynayan PGE<sub>2</sub> ve PGF<sub>2α</sub> aracılı kontraksiyonlarında hücre dışı kalsiyumun hücre içine girişi ile meydana geldiğinden (6) eritromisinin bu kontraksiyonları da inhibe edebileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda elde edilen bulguların in vivo tokolitik ajanlarla birlikte kullanımı için bir değerlendirme yapılırsa; inhibisyon için gereken miktarların antibakteriyel amaç için kullanılan miktarlarla elde edilen serum konsantrasyonlarından daha yüksek olduğu görülmektedir. Ancak mikrobiyel kaynaklı bir erken doğum eylemi söz konusu ve mikroorganizma eritromisine karşı duyarlı ise bu grup antibiyotiklerin tercih edilmesi, doğum sonrası olaylarda ise uterusun erken involusyonu için bu grup antibiyotiklerin kullanımından kaçınmanın yararlı olacağı kanaatindeyiz.

Bu çalışma kedi myometriumunda eritromisinin direkt etkisinin gösterildiği ilk in vitro çalışmadır. Aynı etkinin oksitosin yerine PG ve gerim ile oluşturulan kontraksiyonlarda ve in vivo koşullarda olup olmayacağının araştırılması gerekmektedir. Ayrıca eritromisinin bu etkisinin mekanizmasını tam olarak açıklayabilmek için moleküler düzeyde araştırmalara ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

5. Kapusnik-Uner JE, Sande MA, Chambers HF. Antimicrobial agents, tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin and miscellaneous antibacterial agents. In: Hardman JG, Limbird, L.E. Molinof PB., Ruddon, RW, editors. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 9 th ed. p- 1123-53, New York, McGraw-Hill; 1996.
6. Kaya, S. Kemoterapotikler, Editörler; Kaya S, Pirinçci İ, Bilgili A. Uygulamalı Veteriner Farmakoloji, 283-398, C:2, Medisan yayınevi Ankara, 1997,
7. Kirschbaum T. Antibiotics in the treatment of preterm labor. Am J Obstet Gynecol, 1993, 168: 1239-1246.
8. Kaufman HS, Ahrenndt SA, Pitt HA, Lillemoe KD. The effect of erythromycin on motility of duodenum, sphincter of oddi and gall bladder in the prairie dog. Surgery, 1993, 114: 543-548.
9. Mannisto PT, Havas HA, Komulainen VA Rauramaa V. Efficacy of Erythromycin Acistrate (2-Acetyl Erythromycin Stearate) and Erythromycin Stearate in experimental infections in mice. J Pharmacol Exp Ther, 1989, 250: 1028-1033.
10. McGregor JA, French JI, Raller LB, Todd JK Makowski EL. Adjunctive erythromycin treatment for idiopathic preterm labor: result of a randomized, double-blinden, placebo-controlled trial. Am J Obstet Gynecol, 1986, 154: 98-103.
11. McGregor JA, French JI, Seo K. Antimicrobial therapy in preterm premature rupture of membranes: result of a prospective, double-blind, placebo-controlled trial of erythromycin. Am J Obstet Gynecol, 1991, 165: 632-640.
12. Milwidsky A, Yeheskel ZF, Mayer M. Direct inhibition of proteases and servical plasminogen activator by antibiotics. Am J Obstet Gynecol, 1992, 166: 606-612.
13. Minocha A, Galligan JJ. Erythromycin inhibits contractions of nerve-muscle preparations of the guinea pig small intestine. J Pharmacol Exp Ther, 1991, 257: 1248-1253.
14. Peeters T, Matthijs G, Depoortere I, Cachet T, Hoogmartens J, Vantrappen G. Erythromycin is a motilin receptor agonist. Am J Physiol, 1989, 257: G, 470-474.
15. Pettibone DJ, Clineschmidt BV, Lis EV, Reiss DR. et al. In vitro pharmacological profile of a novel structural class of oxytocin antagonists. J Pharmacol Exp Ther, 1991, 256: 304-308.
16. Romero R, Sibai B, Caritis S, et al. Antibiotic treatment of preterm labor with intact membranes: A multicenter, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. Am J Obstet Gynecol, 1993, 169: 764-774.
17. Wray S. Uterine contraction and physiological mechanism of modulation. Am J Physiol, 1993, 264: 1-18.